
Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP

CAMILA FERREIRA RONCARI

**INTERAÇÃO ENTRE OSMORRECEPTORES E MECANISMOS
COLINÉRGICOS E ANGIOTENSINÉRGICOS PROENCEFÁLICOS
NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

ARARAQUARA

2014

Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP

CAMILA FERREIRA RONCARI

**INTERAÇÃO ENTRE OSMORRECEPTORES E MECANISMOS
COLINÉRGICOS E ANGIOTENSINÉRGICOS PROENCEFÁLICOS
NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

**Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas PIPGCF
UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Fisiológicas.**

Orientador: José Vanderlei Menani

ARARAQUARA

2014

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

R769io Roncari, Camila Ferreira.
Interação entre osmorreceptores e mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos no controle da ingestão de sódio / Camila Ferreira Roncari. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
121 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Núcleo parabraquial lateral. 3. Órgão subfornical. 4. Angiotensina II. 5. Carbacol. 6. Hiperosmolaridade. 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 Camila Ferreira Roncari

Dia 26/08/2014

Prof. Dr. José Vanderlei Menani.....

Prof. Dr. Eduardo Colombari.....

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

Profa. Dra. Juliana Irani Fratucci De Gobbi.....

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

Dedicatória

A Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

À minha mãe e meu pai, que me trouxeram a esse mundo com muito amor e carinho.

Aos meus irmãos pela amizade eterna e pelo apoio incondicional.

Ao Richard, pelo amor, compreensão e companheirismo.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani pela orientação desde a iniciação científica e por todo o conhecimento transmitido ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. Alan Kim Johnson, pela oportunidade de realizar estágio em seu laboratório na Universidade de Iowa, Iowa City, EUA. Ao Terry Beltz e Ralph F. Johnson por me ensinarem as técnicas aprendidas durante esse período. À Marylin J. Dennis, pelo carinho e amizade.

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

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela amizade.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq por tornarem possível a realização deste trabalho. Especialmente agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado no país (2010/20407-0) e à CAPES pela bolsa de estágio no exterior (0054/11-9).

RESUMO

A ingestão de sódio é induzida por sinais facilitatórios, como angiotensina II (ANG II) e aldosterona. A hiperosmolaridade e a estimulação colinérgica central, estímulos classicamente considerados antinatriorexigênicos, também induzem ingestão de NaCl quando os mecanismos inibitórios do núcleo parabraquial lateral (NPBL) são bloqueados. No presente estudo, investigamos a possível interação entre osmorreceptores e mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos centrais no controle da ingestão de água e NaCl induzida por diferentes estímulos dipsogênicos e/ou natriorexigênicos combinados com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL. Em ratos com cânulas de aço inoxidável implantadas no ventrículo lateral (VL) ou órgão subfornical (OSF) e bilateralmente no NPBL, foram estudados os efeitos de injeções de atropina (antagonista colinérgico muscarínico), losartan ou ZD 7155 (antagonistas de receptores AT₁) no VL ou diretamente no OSF na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de moxonidina (agonista adrenérgico α_2 /imidazólico) no NPBL combinadas com: a) hiperosmolaridade plasmática induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M; b) injeções de carbacol (agonista colinérgico) no VL ou OSF; c) injeções subcutâneas de furosemida (FURO) e captopril (CAP); d) injeção de ANG II no VL. Adicionalmente, também foi investigado se a aplicação aguda de estímulos osmóticos, angiotensinérgico e colinérgico ativariam neurônios dissociados do OSF mantidos em cultura e se um mesmo neurônio seria ativado por diferentes estímulos. Em ratos tratados com NaCl 2 M ig, injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram a ingestão de água e NaCl 0,3 M. Injeções no VL ou OSF de atropina (20 nmol/1,0 μ l e 2 nmol/0,1 μ l, respectivamente) ou losartan (100 μ g/1,0 μ l e 1 μ g/0,1 μ l, respectivamente) aboliram a ingestão de água e NaCl em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções de moxonidina no NPBL. Injeções de moxonidina também aumentaram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP, injeções de ANG II (50 ng/1,0 μ l) e carbacol (4 nmol/1,0 μ l) no VL ou carbacol (0,5 nmol/0,1 μ l) no OSF. O bloqueio de receptores AT₁ com injeções de losartan no VL ou ZD 7155 (1 μ g/0,1 μ l) no OSF aboliu a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com injeção de carbacol no VL ou OSF combinada com injeções de moxonidina no NPBL. No entanto, injeção de atropina no VL, apesar de reduzir a ingestão de água, não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP ou injeção de ANG II no VL combinados com injeções de moxonidina no NPBL. Injeções de losartan no VL reduziram a ingestão de sacarose 0,06 M, mas não alteraram a ingestão de ração induzida por privação alimentar por 24 h. Finalmente, os estudos *in vitro* mostraram que estímulos osmóticos, angiotensinérgico e colinérgico ativam as células dissociadas do OSF e

que diferentes estímulos podem ativar uma mesma célula do OSF. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que diferentes estímulos, tais como hiperosmolaridade e ativação colinérgica central, facilitam a ingestão de NaCl através da ativação de mecanismos angiotensinérgicos centrais.

Palavras-chave: Núcleo parabraquial lateral; órgão subfornical; angiotensina II; carbacol; hiperosmolaridade.

ABSTRACT

Sodium intake is induced by facilitatory signals, such as angiotensin II (ANG II) and aldosterone. Hyperosmolarity and central cholinergic activation, classic antinatriorexigenic stimuli, also induce NaCl intake when the inhibitory mechanisms of the lateral parabrachial nucleus (LPBN) are deactivated. In the present study, we investigated the possible interaction between osmoreceptors and cholinergic and angiotensinergic mechanisms in the control of water and NaCl intake induced by different dipsogenic and/or natriorexigenic stimuli combined with the blockade of LPBN inhibitory mechanisms. Rats with stainless steel cannulas implanted in the lateral ventricle (LV) or subfornical organ (SFO) and bilaterally into the LPBN were used to study the effects of injections of atropine (muscarinic cholinergic antagonist), losartan or ZD 7155 (AT₁ receptor antagonists) into the LV or SFO on water and 0.3 M NaCl intake induced by bilateral injections of moxonidine (α_2 -adrenoceptor/imidazoline agonist) into the LPBN combined with a) plasma hyperosmolarity induced by intragastric (ig) 2 M NaCl; b) injections of carbachol (cholinergic agonist) into the LV or SFO; c) subcutaneous injections of furosemide (FURO) and captopril (CAP); d) injection of ANG II into the LV. Additionally, we also investigated whether acute application of osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimuli would activate cultured SFO dissociated cells and if the same cell would be activated by different stimuli. In rats treated with ig 2 M NaCl, injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN increased water and 0.3 M NaCl intake. Injections into the LV or SFO of atropine (20 nmol/1.0 μ l and 2 nmol/0.1 μ l, respectively) or losartan (100 μ g/1.0 μ l and 1 μ g/0.1 μ l, respectively) abolished water and 0.3 M NaCl intake in rats treated with ig 2 M NaCl combined with moxonidine into the LPBN. Moxonidine injected into the LPBN also increased water and 0.3 M NaCl intake induced by FURO + CAP, injections of ANG II (50 ng/1.0 μ l) and carbachol (4 nmol/1.0 μ l) into the LV or carbachol (0.5 nmol/0.1 μ l) into the SFO. The blockade of AT₁ receptors with injections of losartan into the LV or ZD 7155 (1 μ g/0.1 μ l) into the SFO abolished water and 0.3 M NaCl intake in rats treated with carbachol into the LV or SFO combined with LPBN injections of moxonidine. However, atropine injected into the LV, despite reducing water intake, did not change 0.3 M NaCl intake in rats treated with FURO + CAP or injection of ANG II into the LV combined with injections of moxonidine into the LPBN. Injections of losartan into the LV reduced 0.06 M sucrose intake, but did not change food intake induced by 24 h of food deprivation. Finally, *in vitro* studies showed that osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimuli activate SFO dissociated cells and that different stimuli can activate the same SFO cell. Therefore, the results of the present study suggest that different stimuli, such as

hyperosmolarity and central cholinergic activation, facilitate NaCl intake through activation of central angiotensinergic mechanisms.

Keywords: Lateral parabrachial nucleus; subfornical organ; angiotensin II; carbachol; hyperosmolarity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diagrama esquemático baseado em estudos em ratos mostrando a modulação dos mecanismos inibitórios do NPBL por diferentes neurotransmissores e a interação entre os mecanismos inibitórios do NPBL e mecanismos facilitatórios prosencefálicos envolvidos no controle da ingestão de água e NaCl. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; ATP, trifosfato de adenosina; CCK, colecistocinina; CeA, núcleo central da amígdala; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; GABA, ácido γ -aminobutírico; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal. Baseado em Menani e colaboradores¹⁸².....32
- Figura 2** – Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas). pcs, pedúnculo cerebelar superior.....48
- Figura 3** – Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no OSF (indicado pela seta).....49
- Figura 4** - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (20 nmol/1,0 μ l) ou losartan (100 μ g/1,0 μ l) no VL. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de animais.51
- Figura 5** - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol (4 nmol/1,0 μ l) no VL que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (20 nmol/1,0 μ l) ou losartan (100 μ g/1,0 μ l) no VL. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de animais.53
- Figura 6** - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos que receberam injeções de salina ou atropina (20 nmol/1,0 μ l) no VL combinadas com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de animais.55
- Figura 7** - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de ANG II (50 ng/1,0 μ l) no VL que receberam injeções bilaterais de
-
-

veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina ou atropina (20 nmol/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais..... 57

Figura 8 - Ingestão cumulativa de (A) sacarose 0,06 M e (B) água em ratos normohidratados que receberam injeção de salina ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais. 59

Figura 9 - Ingestão cumulativa de (A) ração e (B) água em ratos privados de ração por 24 horas que receberam injeção de salina ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais. 61

Figura 10 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (2 nmol/0,1 µl) ou losartan (1 µg/0,1 µl) no OSF. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais..... 64

Figura 11 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol (0,5 nmol/0,1 µl) no OSF que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (2 nmol/0,1 µl) ou ZD 7155 (1 µg/0,1 µl) no OSF. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais. 70

Figura 12 – Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de LCEa com diferentes osmolalidades (308, 313 e 321 mOsm/kg). Os solutos utilizados para aumentar a osmolalidade do LCEa foram NaCl (barra preta) e manitol (barra cinza). Valores são representados como média ± EPM; número de células representado entre parênteses. 77

Figura 13 – (A) Imagem representativa de uma célula do OSF mostrando a intensidade de fluorescência do Fluo-4 durante o período basal (esquerda) e após aplicação de ANG II (meio) ou LCEa hiperosmótico (LCEa hiper; direita). (B) Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de ANG II 0,1 µM ou LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg). Valores são representados como média ± EPM; n = número de células..... 79

Figura 14 – (A) Imagem representativa de uma célula do OSF mostrando a intensidade de fluorescência do Fluo-4 durante o período basal (esquerda) e após aplicação de carbacol (meio) ou LCEa hiperosmótico (LCEa hiper; direita). (B) Alteração na intensidade de

fluorescência induzida pela aplicação aguda de carbacol 100 μ M ou LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg). Valores são representados como média \pm EPM; n = número de células..... 81

Figura 15 – (A) Imagem representativa de uma célula do OSF mostrando a intensidade de fluorescência do Fluo-4 durante o período basal (esquerda) e após aplicação de ANG II (meio) ou carbacol (direita). (B) Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de ANG II 0,1 μ M ou carbacol 100 μ M. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de células. 83

Figura 16 - Diagrama esquemático baseado em estudos prévios em ratos e nos resultados da presente tese mostrando a modulação dos mecanismos inibitórios do NPBL por diferentes neurotransmissores e a interação entre os mecanismos inibitórios do NPBL e mecanismos facilitatórios prosencefálicos envolvidos no controle da ingestão de água e NaCl. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; ATP, trifosfato de adenosina; CCK, colecistocinina; CeA, núcleo central da amígdala; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; GABA, ácido γ -aminobutírico; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan na ASM.	65
Tabela 2 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no III-V.....	66
Tabela 3 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no tecido adjacente ao OSF.....	67
Tabela 4 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol na ASM que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou ZD 7155 na ASM.	71
Tabela 5 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol no tecido adjacente ao OSF que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou ZD 7155 no tecido adjacente ao OSF.	72
Tabela 6 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no VL.	74
Tabela 7 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol no VL que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no VL.	75
Tabela 8 – Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de LCEa com diferentes osmolalidades.....	77
Tabela 9 - Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de ANG II e/ou LCEa hiperosmótico.	79

Tabela 10 – Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de carbacol e/ou LCEa hiperosmótico.....81

Tabela 11 – Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de ANG II e/ou carbacol.....83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[Ca²⁺]_i – concentração intracelular de cálcio;
μl – micrograma(s);
μl – microlitro(s);
μm – micrometro(s);
5-HIAA – ácido hidroxiindolacético;
5-HT – serotonina;
ANG I – angiotensina I;
ANG II – angiotensina II;
ANOVA – análise de variância;
ANP – peptídeo natriurético atrial;
AP – área postrema;
ASM – área septal medial;
ATP – trifosfato de adenosina;
AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo;
CAP – captopril;
CCK – colecistocinina;
CeA – núcleo central da amígdala;
CRH – hormônio liberador de corticotrofina;
DOCA – desoxicorticosterona;
ECA – enzima conversora de angiotensina;
ENaC – canal epitelial de sódio;
EPM – erro padrão da média;
FURO – furosemida;
g – grama(s);
GABA – ácido γ-aminobutírico;
h – hora(s);
HL – hipotálamo lateral;
HSD2 – enzima 11-β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2;
icv – intracerebroventricular;
ig – intragástrico;
III-V – terceiro ventrículo;
kg – quilograma(s);
LCE – líquido cerebrospinal;

LCEa – líquido cerebrospinal artificial;
M – molar
mg – miligrama(s);
ml – mililitro(s);
mm – milímetro(s);
mM – milimolar(es);
MnPO – núcleo pré-óptico mediano;
mOsm – miliosmol(es);
ng – nanograma(s);
nmol – nanomol(es);
NPB – núcleo parabraquial;
NPBL – núcleo parabraquial lateral;
NPV – núcleo paraventricular;
NSO – núcleo supra-óptico;
NTS – núcleo do trato solitário;
OCVs – órgãos circunventriculares;
OSF – órgão subfornical;
OT – ocitocina;
OVLT – órgão vascularizado da lâmina terminal;
pcs – pedúnculo cerebelar superior;
TRPV – receptor de potencial transiente vanilóide;
VL – ventrículo lateral.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVO.....	34
3. MATERIAL E MÉTODO.....	35
3.1. Animais.....	35
3.2. Cirurgia encefálica.....	35
3.3. Injeção de drogas no encéfalo.....	36
3.4. Drogas injetadas centralmente.....	36
3.5. Aumento na osmolaridade plasmática induzido por sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico.....	37
3.6. Teste de ingestão de água e NaCl 0,3 M.....	37
3.7. Teste de ingestão de sacarose 0,06 M e água.....	37
3.8. Teste de ingestão de ração e água.....	38
3.9. Análise histológica.....	38
3.10. Cultura de células do OSF.....	38
3.11. Medida da concentração intracelular de cálcio.....	39
3.12. Análise estatística.....	40
3.13. Protocolos experimentais testados.....	40
3.13.1. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no VL.....	40
3.13.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de carbacol no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de atropina ou losartan no VL.....	41
3.13.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.....	41

3.13.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de ANG II no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.	42
3.13.5. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos normohidratados tratados com injeções de losartan no VL.	42
3.13.6. Ingestão de ração e água induzida por privação alimentar por 24 horas em ratos normohidratados tratados com injeções de losartan no VL.	43
3.13.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no OSF.	43
3.13.8. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de carbacol no OSF que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de atropina ou ZD 7155 no OSF.	44
3.13.9. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com LCEa hiperosmótico.	44
3.13.10. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e LCEa hiperosmótico.	45
3.13.11. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com carbacol e LCEa hiperosmótico.	45
3.13.12. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e carbacol.	45
4. RESULTADO	47
4.1. Análise histológica	47
4.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no VL.	50
4.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de carbacol no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no VL.	52
4.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.	54

4.5. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de ANG II no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.	56
4.6. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos normohidratados tratados com injeção de losartan no VL.	58
4.7. Ingestão de ração e água induzida por privação alimentar por 24 horas em ratos normohidratados tratados com injeção de losartan no VL.	60
4.8. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no OSF.	62
4.8.1. Efeito de injeções corretamente posicionadas no OSF e NPBL.	62
4.8.2. Efeito de injeções posicionadas na ASM e NPBL.	62
4.8.3. Efeito de injeções corretamente posicionadas no NPBL, mas fora do OSF ou da ASM.	62
4.9. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol no OSF que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou ZD 7155 no OSF.	68
4.9.1. Efeito de injeções corretamente posicionadas no OSF e NPBL.	68
4.9.2. Efeito de injeções posicionadas na ASM e NPBL.	68
4.9.3. Efeito de injeções corretamente posicionadas no NPBL, mas fora do OSF ou da ASM.	68
4.10. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL após diferentes pré-tratamentos.	73
4.11. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com LCEa hiperosmótico.	76
4.12. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e LCEa hiperosmótico. .	78
4.13. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com carbacol e LCEa hiperosmótico. .	80
4.14. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e carbacol.	82
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÃO	97

7. REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE	122

1. INTRODUÇÃO

A manutenção do volume e da osmolaridade dos líquidos corporais é uma condição necessária ao funcionamento celular. A água compõe cerca de 60% do corpo de um indivíduo adulto e, muito embora grande parte da água esteja contida no interior das células, cerca de um terço ocupa os espaços em torno das células, sendo chamado de líquido extracelular¹. O sódio é o principal íon constituinte do líquido extracelular e a sua concentração é mantida em uma estreita faixa de variação (138 a 146 mmol/l), visto que o sódio contribui amplamente para a determinação da osmolaridade do líquido extracelular¹. Portanto, como a água e o sódio são os principais determinantes do volume e osmolaridade do líquido extracelular, deve haver um balanço entre ingestão e excreção de água e sódio. Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento da pressão osmótica efetiva no líquido extracelular, o que promoverá o movimento de água para fora das células e, conseqüentemente, redução do volume de líquido contido dentro das células. A redução do volume do líquido celular é característica da desidratação celular. A desidratação celular pode ser induzida experimentalmente por infusão de soluções hipertônicas por via endovenosa ou parenteral. No caso da privação hídrica, por exemplo, além de perda de água do compartimento intracelular, também há perda de água do compartimento extracelular e, nesse caso, a desidratação é dita absoluta. Por outro lado, quando há perda de água e solutos apenas do compartimento extracelular, como nos casos de hemorragia, diarreia e vômito, a desidratação é dita extracelular. Nessas situações de alterações de volume ou osmolaridade dos líquidos corporais, diferentes mecanismos são ativados para promover ajustes na ingestão e excreção de água e sódio, o que normalmente permite restabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico do organismo. Receptores localizados em diversas partes do organismo (por exemplo, receptores localizados no sistema cardiovascular e osmorreceptores) ou hormônios produzidos sinalizam para algumas regiões específicas do cérebro que, uma vez ativadas, desencadeiam respostas renais e/ou comportais de ingestão de água e sódio^{2,3}. As respostas comportamentais de busca e ingestão de água e sódio dependem de estados motivacionais denominados sede e apetite ao sódio. O apetite ao sódio é operacionalmente definido como ingestão de soluções hipertônicas de NaCl em concentrações consideradas aversivas por animais normohidratados^{4,5}.

A sede é uma sensação causada pela necessidade de água e mesmo um pequeno aumento de 1 a 2% na osmolaridade plasmática já é suficiente para motivar o animal a procurar, obter e consumir água. Além de sede, a hiperosmolaridade também induz secreção de vasopressina para prevenir a excreção urinária de água, inibe a ingestão adicional de

solução hipertônica de NaCl e aumenta a excreção urinária de sódio⁶⁻¹⁴. A coordenação dessas respostas neuroendócrinas sugere a existência de um mecanismo capaz de detectar as alterações na osmolaridade do líquido extracelular. Em um estudo clássico, Verney descreveu o controle osmótico da liberação de vasopressina e introduziu o termo “osmorreceptor” para designar os elementos sensoriais capazes de detectar alterações na osmolaridade do líquido extracelular e gerar sinais elétricos para desencadear uma resposta adequada¹⁵. Em 1977, Andersson e colaboradores questionaram a existência dos osmorreceptores e propuseram a existência de receptores sensíveis a alterações na concentração de sódio nas áreas periventriculares¹⁶. Esse questionamento foi motivado por resultados que mostraram que a infusão de solução hipertônica de NaCl no ventrículo lateral (VL) ou no terceiro ventrículo (III-V) aumenta a ingestão de água e reduz o volume urinário, enquanto que a infusão de solução hipertônica de sacarose não produz esses efeitos¹⁶. No entanto, estudos posteriores mostraram que a infusão intracerebroventricular (icv) de soluções pode alterar tanto a osmolaridade quanto a concentração de sódio no líquido cerebrospinal (LCE)¹⁷. Os autores ainda mostraram que a infusão icv de NaCl 0,5 M, que aumenta a osmolaridade e a concentração de sódio no LCE, produz efeitos de maior magnitude quando comparado à infusão icv de solução de sacarose 0,7 M contendo sódio em concentração isotônica, que aumenta apenas a osmolaridade¹⁷. Dessa forma, foi postulado que os osmorreceptores e os receptores de sódio participam do controle da ingestão de água e secreção de vasopressina.

Os osmorreceptores são definidos funcionalmente como células com habilidade intrínseca de detectar alterações na osmolaridade do líquido extracelular e, embora os osmorreceptores centrais tenham um papel importante no controle da osmolaridade dos líquidos corporais, sabe-se que os osmorreceptores periféricos também contribuem para o balanço hidroeletrolítico. Estudos em humanos e animais mostraram que os osmorreceptores periféricos estão localizados na parede da cavidade orofaríngea¹⁸ e do trato gastrointestinal^{19,20}, nos vasos sanguíneos que irrigam o intestino²¹ e na veia porta hepática²². As informações dos osmorreceptores periféricos chegam ao sistema nervoso central através de fibras ascendentes do nervo vago²³⁻²⁸. Em relação aos osmorreceptores centrais, existem evidências de que uma importante população de osmorreceptores esteja localizada em regiões encefálicas livres de barreira hematoencefálica, como os órgãos circunventriculares (OCVs)²⁹. Os OCVs são estruturas altamente vascularizadas e os capilares que irrigam os OCVs possuem fenestras, o que permite o íntimo contato dos OCVs com as substâncias circulantes no sangue. A localização dos OCVs ainda permite uma grande proximidade dessas áreas com os solutos presentes no LCE que flui pelos ventrículos encefálicos. Trabalhos pioneiros mostraram um

importante papel da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) no controle da ingestão de água, pois nos primeiros cinco dias após a lesão da região AV3V ocorre uma abrupta abolição na ingestão diária de água^{30,31}. Passada a fase inicial, a ingestão diária de água retorna aos valores normais, mas a ingestão de água induzida por hiperosmolaridade é abolida³⁰. A região AV3V é constituída pelo órgão vasculoso da lâmina terminal (OVL), tecido periventricular da região pré-óptica, porção anterior da área hipotalâmica anterior e pela região ventral do núcleo pré-óptico mediano (MnPO). Estudos eletrofisiológicos e imunohistoquímicos em ratos confirmaram a existência de neurônios intrinsecamente sensíveis a alterações na osmolaridade no órgão subfornical (OSF)³²⁻³⁴ e OVL³⁵. O OSF e o OVL são órgãos circunventriculares e, juntamente com o MnPO, são parte da lâmina terminal.

Assim como a hiperosmolaridade, a estimulação colinérgica central também é um potente estímulo para a ingestão de água. Um dos primeiros trabalhos a descrever o efeito dipsogênico da estimulação colinérgica mostrou que a aplicação de acetilcolina em forma cristalina ou do agonista colinérgico carbacol no hipotálamo lateral (HL) induz ingestão de água em ratos normohidratados³⁶. Trabalhos posteriores mostraram que injeções de acetilcolina ou carbacol no III-V ou no OSF também induz ingestão de água³⁷⁻³⁹. A lesão da região AV3V ou do OSF reduz significativamente as respostas induzidas por injeção icv de carbacol^{38,40}. Outra região encefálica importante para as respostas pressora e dipsogênica do carbacol é a área septal medial (ASM), visto que a lesão ou a injeção do antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos atropina na ASM reduz o aumento na pressão arterial e a ingestão de água induzidos por injeção de carbacol no VL^{41,42}. A ASM possui conexões anatômicas e funcionais com áreas cerebrais envolvidas com o controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico, tais como o HL e o OSF⁴³⁻⁴⁵. Também já foram demonstrados efeitos pressor e natriurético, bem como aumento da secreção de vasopressina e inibição da ingestão de NaCl após injeção icv de carbacol⁴⁶⁻⁵⁰. Pela semelhança das respostas induzidas por hiperosmolaridade e por ativação colinérgica central, acredita-se que a acetilcolina possa ser um dos neurotransmissores utilizados pelas vias ativadas pela hiperosmolaridade.

O sistema renina angiotensina periférico também é importante para a manutenção da concentração de sódio no líquido extracelular. A molécula precursora da angiotensina é o angiotensinogênio, uma globulina produzida pelo fígado. O angiotensinogênio é clivado pela renina, uma enzima proteolítica sintetizada e armazenada pelas células justaglomerulares dos rins, produzindo a angiotensina I (ANG I). Em segundos, a ANG I é, por sua vez, convertida em angiotensina II (ANG II) pela ação da enzima

conversora de angiotensina (ECA), localizada especialmente nos pulmões, sendo também encontrada nos rins e nas células endoteliais do sistema vascular sistêmico¹. A secreção de renina pelas células justaglomerulares é aumentada em situações em que há diminuição da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio que alcança as células da mácula densa ou estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos renais⁵¹. Por outro lado, ANG II e vasopressina inibem a secreção de renina⁵¹. Curiosamente, a concentração de ANG II no encéfalo de ratos encontra-se aumentada mesmo após a nefrectomia bilateral⁵², sugerindo que a ANG II possa ser sintetizada no sistema nervoso central⁵³. Já foi demonstrado que astrócitos secretam angiotensinogênio no espaço intersticial e no LCE^{54,55} e alguns estudos sugerem que os neurônios do núcleo paraventricular (NPV)⁵⁶ e OSF⁵⁷ também são capazes de produzir angiotensinogênio. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a renina⁵⁸⁻⁶⁰ e a ECA⁶¹ também são produzidas no sistema nervoso central. Ou seja, todos os componentes do sistema renina angiotensina, incluindo precursores e enzimas necessárias para a produção de ANG II, já foram identificados no encéfalo, sugerindo que a ANG II possa agir como neurotransmissor no sistema nervoso central⁵³.

A ANG II possui inúmeras funções fisiológicas, como regulação da pressão arterial e secreção de vasopressina e de aldosterona, além de estimular a ingestão de água e/ou NaCl, tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona), quanto pela ação direta em algumas áreas do cérebro^{62,63}. O receptor AT₁ é o receptor para ANG II mais importante para seu efeito dipsogênico e a distribuição desse receptor no sistema nervoso central coincide com as diversas áreas encefálicas que sabidamente estão envolvidas com o controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico, sendo que há uma grande expressão de RNAm para o receptor AT₁ no OSF e na região AV3V⁶⁴⁻⁶⁶. Acredita-se que o OSF é o principal local de ação central da ANG II circulante, visto que a lesão dessa área abole completamente a sede induzida por infusão sistêmica de ANG II^{63,67}. Estudos anatômicos mostraram que o OSF emite projeções para outras estruturas da lâmina terminal, como OVLT e MnPO^{4,68}. A interrupção da projeção do OSF para o MnPO através de cortes horizontais no encéfalo de ratos abole completamente a ingestão de água induzida por injeções subcutâneas de ANG II⁶⁹. Dessa forma, o efeito dipsogênico da ANG II parece depender da ativação dos neurônios do MnPO por um sinal excitatório proveniente dos neurônios do OSF que são ativados pela ação da ANG II circulante nos receptores AT₁. Em relação à ingestão de NaCl, já foi demonstrado que a administração periférica ou icv de inibidores da ECA ou injeção icv de losartan (antagonistas de receptores AT₁) diminui a ingestão de NaCl em animais depletados de sódio ou privados de água^{63,70-73}. Ainda, a injeção icv de ANG II aumenta a

ingestão de NaCl induzida por hipovolemia⁴⁹. O tratamento com injeções subcutâneas do diurético furosemida (FURO) e do bloqueador da ECA captopril (CAP) induz ingestão de NaCl em curto prazo devido à hipotensão associada a um aumento da formação central de ANG II^{3,74} e já foi demonstrado o aumento da expressão da proteína Fos em estruturas como o OSF, OVLT e MnPO após o tratamento com FURO + CAP⁷⁵. Assim, verifica-se que a ANG II tem um importante papel no controle da ingestão de NaCl.

A aldosterona, um mineralocorticoide, também tem papel fundamental na conservação do sódio no organismo. A secreção de aldosterona pela zona fasciculada da adrenal é induzida pela ANG II e pela redução na concentração plasmática de sódio^{76,77}. A aldosterona tem ações renais, regulando a reabsorção de sódio e secreção de potássio⁷⁶, e ações em áreas centrais como o núcleo central da amígdala (CeA), induzindo o apetite ao sódio⁷⁸⁻⁸⁰. O núcleo do trato solitário (NTS) contém uma subpopulação de neurônios que coexpressam receptores de mineralocorticoides e a enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (HSD2)⁸¹⁻⁸⁴. A enzima HSD2 inativa os glicocorticoides endógenos, o que torna esses neurônios sensíveis apenas à aldosterona⁸⁵. Os neurônios HSD2 enviam projeções para o núcleo parabraquial lateral (NPBL) e CeA^{82,83}. A infusão crônica de aldosterona no quarto ventrículo aumenta a ingestão diária de NaCl, enquanto que a injeção do antagonista de mineralocorticoide RU 28318 no quarto ventrículo reduz a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio, sugerindo que os neurônios HSD2 do NTS também estão envolvidos na modulação do apetite ao sódio⁸⁶.

Paralelamente à atuação dos mecanismos que facilitam a ingestão de água e de NaCl, como os citados acima, o organismo também dispõe de mecanismos inibitórios da ingestão de água e de NaCl que atuam limitando a ingestão nas situações em que o equilíbrio está presente, ou seja, esses mecanismos sinalizam para que ocorra a saciedade. Os mecanismos inibitórios podem envolver sinais neurais que se originam em receptores viscerais periféricos como receptores gustativos ou aqueles localizados no sistema cardiovascular ou gastrointestinal ou a atuação de hormônios como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e a ocitocina (OT).

As informações dos barorreceptores arteriais e receptores cardiopulmonares são importantes para o controle da ingestão de água e NaCl^{2,4,5,87}. O aumento da pressão arterial inibe a ingestão de água e NaCl, enquanto que a redução da pressão arterial facilita esta ingestão⁸⁸. A ingestão de água induzida por infusão sistêmica de ANG II é aumentada pelo bloqueio da concomitante resposta pressora por injeção sistêmica do vasodilatador minoxidil⁸⁸. Em ratos, quando um balão é inflado na junção da veia cava superior com o átrio

direito, simulando um aumento do retorno venoso, os receptores cardiopulmonares são ativados⁸⁹. Essa ativação dos receptores cardiopulmonares reduz a ingestão de água induzida por privação hídrica e a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio ou pelo tratamento subcutâneo com desoxicorticosterona (DOCA – composto esteroide com propriedades semelhantes à aldosterona)^{89,90}. Em cães, a redução do retorno venoso por meio de um balão inflado na veia cava inferior induz ingestão de água com início da ingestão entre 6 a 28 minutos após o balão ser inflado⁹¹. Esses resultados sugerem que os receptores cardiopulmonares sinalizam para a inibição da ingestão de água e NaCl quando o volume do líquido extracelular está aumentado.

O ANP e a OT são secretados na circulação sanguínea durante expansão de volume, particularmente durante expansão hipertônica, e ambos têm ação natriurética⁹². Ou seja, o ANP e a OT atuam no sentido de reduzir a volemia e a concentração de sódio, ações opostas às da ANG II e aldosterona. O ANP, um peptídeo sintetizado pelos miócitos atriais, participa da manutenção do volume por produzir diurese e natriurese⁹³. Além dessas ações renais, o ANP também age centralmente inibindo a sede e o apetite ao sódio. Estudos demonstraram que a ingestão de água e NaCl induzida por privação hídrica, depleção de sódio ou injeção central de ANG II é abolida por injeção de ANP no III-V^{92,94} e o tratamento central com anticorpo para ANP aumenta a ingestão de NaCl induzida por injeção icv de ANG II ou hipovolemia^{13,95}. A OT tem efeitos similares aos do ANP. A OT é sintetizada no corpo celular de neurônios magnocelulares do NPV e do núcleo supra-óptico (NSO) e transportada pelos axônios até a neuro-hipófise, de onde é liberada para a corrente sanguínea em situações de hiperosmolaridade. A injeção icv de OT reduz a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio⁹⁶ e alguns estudos sugerem que a ativação de receptores ocitocinérgicos centrais seja responsável pela inibição da ingestão de NaCl observada em ratos com osmolaridade plasmática aumentada^{13,97}. A hiperosmolaridade e a estimulação colinérgica ou angiotensinérgica central aumentam a concentração plasmática de OT e a expressão da proteína Fos no NPV e no NSO, sugerindo que o mecanismo inibitório ocitocinérgico é ativado durante esses tratamentos⁹⁸. A ativação do mecanismo inibitório ocitocinérgico pela ANG II seria a razão pela qual inicialmente apenas a ingestão de água é induzida quando a ANG II é injetada centralmente, enquanto que a ingestão de NaCl é inibida. No entanto, a ingestão de água promovendo a diluição dos líquidos corporais inibiria o mecanismo ocitocinérgico, liberando a ingestão de NaCl^{97,99}.

Mecanismos centrais adrenérgicos também são importantes para o controle da ingestão de água e NaCl exercendo ações inibitórias ou facilitatórias dependendo do tipo de

receptor ativado. A injeção icv da neurotoxina 6-hidroxidopamina, uma neurotoxina que causa a morte de neurônios catecolaminérgicos, abole a ingestão de água e a resposta pressora induzida por ANG II, sugerindo que os neurônios adrenérgicos das estruturas situadas na lâmina terminal devem estar intactos, exercendo ações facilitatórias para que a ANG II produza suas ações centrais¹⁰⁰⁻¹⁰². A injeção de prazosin (antagonista de receptores adrenérgicos α_1) na ASM reduz a resposta dipsogênica induzida por injeção icv de ANG II, mostrando que a noradrenalina age em receptores adrenérgicos α_1 para mediar as ações da ANG II⁴¹. Por outro lado, a ingestão de água e NaCl induzida pelos mais diferentes tipos de estímulos até hoje testados é altamente influenciada por um mecanismo inibitório relacionado com receptores adrenérgicos α_2 . Os receptores adrenérgicos α_2 estão localizados na membrana pré- e pós-sináptica de neurônios em diversas áreas do sistema nervoso central^{103,104}. Esses receptores estão negativamente acoplados à adenilato ciclase e, quando ativados, os níveis de AMPc e a atividade dos canais de cálcio são reduzidos. Isto gera uma cadeia de eventos que, por fim, resulta na inibição da síntese e liberação de noradrenalina¹⁰⁴. Além de agirem como autorreceptores, os receptores adrenérgicos α_2 também podem agir como heterorreceptores e alguns estudos mostram a presença desses heterorreceptores em neurônios serotoninérgicos¹⁰⁵. Dessa forma, a ativação do receptor adrenérgico α_2 pela noradrenalina pode inibir a liberação de serotonina (5-HT)¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

A noradrenalina atuando em receptores adrenérgicos α_2 prosencefálicos inibe a ingestão de água e NaCl¹⁰⁹. A moxonidina e a clonidina, agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, são fármacos anti-hipertensivos que administrados em áreas prosencefálicas inibem a ingestão de água e NaCl induzida por diferentes estímulos¹⁰⁹⁻¹²⁴. Injeções de clonidina periféricamente ou em áreas prosencefálicas reduzem a ingestão de água induzida por hiperosmolaridade, privação hídrica ou injeções de ANG II ou carbacol¹¹⁶⁻¹¹⁸. Ainda, a ingestão de NaCl induzida por diferentes estímulos natriorexigênicos também é inibida pelos agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos administrados em áreas prosencefálicas^{109-111,114,121}. Clonidina e moxonidina possuem afinidade tanto para receptores adrenérgicos α_2 , como para receptores imidazólicos e isso levou à dúvida se o efeito inibitório dessas drogas sobre a ingestão de água e NaCl seria decorrente da ligação aos receptores adrenérgicos α_2 ou aos receptores imidazólicos. A noradrenalina, o ligante endógeno dos receptores adrenérgicos α_2 , não possui afinidade pelos receptores imidazólicos e, portanto, estudos utilizando injeções de noradrenalina solucionariam essa dúvida¹²⁵. A injeção de noradrenalina no III-V reduz a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio, sugerindo que a inibição da ingestão de água e NaCl seja decorrente da ativação dos receptores adrenérgicos α_2 e não de receptores

imidazólicos¹¹². No entanto, a maior eficácia dos agonistas e antagonistas adrenérgicos α_2 que também possuem afinidade pelos receptores imidazólicos sugere um sinergismo entre os receptores adrenérgicos α_2 e os receptores imidazólicos no controle da ingestão de água e NaCl^{112,121}. Ainda, os resultados de estudos com injeção de agonistas adrenérgicos α_2 no VL, III-V, ASM, área pré-óptica lateral e HL sugerem que os receptores adrenérgicos α_2 que inibem a ingestão de água e NaCl estão localizados no prosencéfalo^{109,112,114,119-121,123,124,126}.

Recentemente foi descoberto um importante mecanismo inibitório da ingestão de água e NaCl no NPBL¹²⁷⁻¹³⁴. O NPBL é uma subdivisão do núcleo parabraquial (NPB), uma estrutura pontina composta por grupamentos celulares localizados ao redor do pedúnculo cerebelar superior. O NTS e a área postrema (AP) recebem informações viscerais através de aferências dos receptores cardiovasculares, osmorreceptores periféricos e substâncias circulantes no sangue e enviam essas informações por meio de projeções eferentes ao NPB¹³⁵⁻¹³⁹. O NPB, por sua vez, possui conexões recíprocas com o NTS e AP, além de fazer conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico, tais como NPV, CeA e MnPO¹⁴⁰⁻¹⁴². Assim, um papel importante do NPBL seria integrar as informações ascendentes do NTS e AP que, por sua vez, poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

O NPB também participa da integração das informações originadas nos receptores gustatórios. Os neurônios do NPB são ativados após a aplicação de NaCl 0,3 M na língua ou pela ingestão de NaCl^{139,143,144}. Ainda, a lesão do NPB previne a aquisição da aversão condicionada ao sabor quando a solução de NaCl é usada como estímulo condicionado e também inibe a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio¹⁴⁵, sugerindo que o NPB recebe informações relacionadas ao sabor salgado. Essas informações chegam ao NPB através de projeções da porção rostral do NTS, área encefálica que recebe informações relativas ao sabor salgado através do nervo facial^{143,146}. A secção do ramo corda do tímpano do nervo facial reduz a preferência por soluções contendo o íon sódio em animais depletados de sódio, sugerindo que esses animais não conseguem discriminar o NaCl de outras soluções¹⁴⁷.

O NPB recebe projeções de diversas áreas encefálicas e os neurotransmissores envolvidos em algumas dessas projeções já foram descritos. Neurônios serotoninérgicos, catecolaminérgicos, glutamatérgicos, colecistocinérgicos e opioidérgicos estão presentes nas projeções do NTS e da AP para o NPBL¹⁴⁸⁻¹⁵⁴. Neurônios gabaérgicos e imunorreativos para hormônio liberador de corticotrofina (CRH) estão presentes nas projeções do CeA para o

NPBL^{155,156}. Neurônios imunorreativos para encefalina, dinorfina e CRH também já foram demonstrados nas projeções de núcleos hipotalâmicos para o NPB¹⁵⁷.

Estudos pioneiros mostraram que as lesões eletrolíticas ou químicas e a injeção de lidocaína no NPBL aumentam a ingestão de água induzida por injeção central ou periférica de ANG II, bem como por outros estímulos relacionados com a formação de ANG II, sugerindo um papel inibitório do NPBL sobre o controle da ingestão de água^{129,133,158,159}. Em um estudo subsequente, Menani e colaboradores mostraram que injeções bilaterais no NPBL de metisergida, um antagonista de receptores serotoninérgicos, aumentam a ingestão de água induzida por injeção icv de ANG II¹³⁰. Por outro lado, injeções de 5-HT ou DOI (agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) no NPBL reduzem a ingestão de água induzida por ANG II injetada no VL¹³⁰. Esses resultados corroboram com os resultados anteriores que demonstram o envolvimento do NPBL com os mecanismos inibitórios da ingestão de água e sugerem que vias serotoninérgicas participam desse efeito. A participação do NPBL nos mecanismos que inibem a ingestão de NaCl também foi evidenciada por estudos que demonstraram que injeções bilaterais de metisergida no NPBL também aumentam a ingestão de NaCl induzida pela ANG II injetada no VL ou no OSF^{132,160}. As injeções de metisergida no NPBL também aumentam a ingestão de NaCl induzida por FURO + CAP, depleção de sódio ou tratamento subcutâneo com DOCA^{132,161-164}. Por outro lado, a ativação dos receptores serotoninérgicos com injeção de DOI no NPBL reduz a ingestão de NaCl induzida por FURO + CAP e DOCA^{132,164}. Estudos utilizando a técnica de microdiálise também mostraram que a concentração de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA (ácido hidroxindolacético) no NPBL está reduzida em ratos tratados com FURO + CAP, enquanto que a ingestão de água e NaCl 0,3 M aumenta significativamente a concentração de 5-HT e 5-HIAA nessa mesma região¹⁶⁵.

Além da 5-HT, a colecistocinina (CCK) também tem um papel inibitório na ingestão de água e NaCl¹³¹, demonstrando-se, inclusive, uma interdependência e cooperatividade entre 5-HT e CCK no NPBL no controle da ingestão de água e NaCl¹⁶⁶. Estudos mais recentes mostraram que paralelamente à 5-HT e CCK, vários outros neurotransmissores e receptores participam do controle da ingestão de NaCl no NPBL. Dentre esses neurotransmissores, o CRH e o glutamato ativam esse mecanismo inibitório reduzindo ou limitando a ingestão de NaCl, enquanto a ativação de receptores gabaérgicos, opioidérgicos, adrenérgicos α_2 e purinérgicos no NPBL bloqueiam o mecanismo inibitório levando a uma intensa ingestão de NaCl por ratos normohidratados ou estimulados a ingerir NaCl^{127,128,167-170}. Portanto, pelo que se sabe até hoje parecem existir neurotransmissores que

ativam e outros que desativam ou bloqueiam o mecanismo inibitório da ingestão de NaCl presente no NPBL.

Um aumento paradoxal da ingestão de NaCl hipertônico foi recentemente descrito após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL. Após a injeção de metisergida ou moxonidina no NPBL, ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, além de ingerir água, também ingerem NaCl^{171,172}. A sobrecarga intragástrica e a ingestão de NaCl hipertônico aumentam a expressão da proteína Fos em neurônios do NPBL, sugerindo que provavelmente as informações viscerais e gustatórias e a osmolaridade ativam uma via dependente do NPBL que poderia influenciar a ingestão de NaCl^{137,138}. Segundo modelo proposto por De Luca Jr. e colaboradores¹⁷², a hiperosmolaridade ativa mecanismos que induzem a sede e o apetite ao sódio; porém, há uma inibição paralela do apetite ao sódio pelos mecanismos inibitórios do NPBL que neutralizariam os efeitos facilitatórios da ingestão de NaCl produzidos pela hiperosmolaridade. À semelhança do que ocorre com hiperosmolaridade, a injeção icv de carbacol, além de induzir ingestão de água, também induz ingestão de NaCl quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão bloqueados¹⁷³. Dessa forma, é possível que o modelo proposto para explicar a ingestão de NaCl induzida por hiperosmolaridade também seja válido para explicar os efeitos induzidos pela ativação colinérgica central.

Injeções de antagonistas da 5-HT, CCK, CRH e glutamato, assim como agonistas de receptores adrenérgicos α_2 e purinérgicos no NPBL aumentam a ingestão de NaCl em ratos submetidos a protocolos dipsogênicos e/ou natriorexigênicos^{127,131,132,161,164,168-171}. Porém, em ratos normohidratados esses mesmos tratamentos não produzem nenhum efeito na ingestão de NaCl^{127,131,132,170}. Isso levou à hipótese de que a ingestão de NaCl só ocorreria quando, simultaneamente, mecanismos facilitatórios fossem ativados e mecanismos inibitórios fossem desativados. No entanto, resultados mais recentes mostraram que somente injeções bilaterais de agonistas gabaérgicos ou opioidérgicos no NPBL induzem uma intensa ingestão de NaCl em ratos normohidratados^{128,167,174}. Esses estudos demonstraram que injeções bilaterais no NPBL de muscimol (agonista de receptores GABA_A), baclofen (agonista de receptores GABA_B) ou β -endorfina (agonista de receptores opioidérgicos) induzem intensa ingestão de NaCl e água em ratos normohidratados e sem nenhum tratamento prévio^{128,167,174}. Esses resultados sugerem o envolvimento do aminoácido inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) e de opioides endógenos no NPBL no controle da ingestão de NaCl e também a existência de um mecanismo inibitório tônico que age restringindo a ingestão de NaCl e água.

O bloqueio dos receptores AT₁ no OSF reduz a ingestão de água e NaCl induzida por injeção de ANG II no OSF ou por FURO + CAP combinados com injeções de metisergida no NPBL, mostrando que há uma interação entre o NPBL e os mecanismos facilitatórios prosencefálicos^{160,162}. Além disso, recentemente demonstrou-se que a ingestão de NaCl e água induzida por injeções de muscimol no NPBL é reduzida por injeções de atropina ou losartan no VL ou mais especificamente no OSF^{175,176}, sugerindo que a ingestão de NaCl e água induzida por injeções de muscimol no NPBL não depende apenas do bloqueio dos mecanismos inibitórios, mas também de sinais facilitatórios gerados pelos mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos. Até o momento, ainda não se sabe se esses sinais facilitatórios dos mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos são tônicos ou fásicos, ou seja, se esses mecanismos estão sempre ativados ou se o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL gera a ativação desses mecanismos. Uma possível explicação é que a ingestão inicial de NaCl após o tratamento com muscimol no NPBL mesmo que não seja muito intensa possa causar um pequeno aumento na osmolaridade plasmática e, conseqüentemente, ativação de osmorreceptores que, por sua vez, gerariam sinais facilitatórios que intensificariam a ingestão de NaCl em ratos tratados com muscimol no NPBL, da mesma forma que ocorre em ratos com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M tratados com metisergida ou moxonidina no NPBL. Sendo assim, o efeito inicial do muscimol no NPBL seria multiplicado pela ativação dos osmorreceptores, gerando uma intensa ingestão de NaCl. Por sua vez, o bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos ou angiotensinérgicos removeria sinais facilitatórios responsáveis pela ingestão inicial de NaCl ou mesmo talvez os efeitos causados pela ativação dos osmorreceptores, reduzindo a ingestão de NaCl induzida por muscimol no NPBL.

A interação entre os mecanismos inibitórios do NPBL e os mecanismos facilitatórios também foi descrita por estudos que mostraram a interação do NPBL e do CeA para o controle da ingestão de NaCl. A lesão do CeA reduz a ingestão de NaCl induzida por diferentes tratamentos, tais como depleção de sódio, injeção icv de renina ou injeção subcutânea de DOCA, sugerindo que mecanismos facilitatórios para a ingestão de NaCl possam ser integrados no CeA^{78,80,177-179}. Como demonstrado recentemente, a lesão do CeA também abole a ingestão de NaCl induzida por injeções de muscimol em animais normohidratados ou por injeções de moxonidina ou metisergida em ratos tratados com FURO + CAP^{180,181}. Portanto, a atividade de mecanismos facilitatórios no CeA é necessária para o aumento na ingestão de NaCl induzido por bloqueio dos mecanismos no NPBL.

Os mecanismos envolvidos no controle da ingestão de NaCl descritos acima estão resumidos no modelo esquemático apresentado na Figura 1. Neste modelo, o NPBL faz parte de um circuito encefálico cuja principal função é inibir a ingestão de NaCl. Os sinais viscerais ou humorais chegam ao NPBL através de projeções vindas do NTS e da AP. No NPBL, esses sinais promovem a liberação de diversos neurotransmissores, sendo que alguns deles ativam (5-HT, CCK, CRH, e glutamato), enquanto outros desativam (opioides, noradrenalina, ATP e GABA) o mecanismo inibitório do NPBL. A interação entre os mecanismos inibitórios do NPBL e os mecanismos facilitatórios para a ingestão de NaCl se dá em áreas integrativas, sendo que uma área possivelmente relacionada com a integração de sinais é a amígdala, particularmente o CeA. Nas áreas integrativas, os sinais vindos do NPBL inibem os sinais facilitatórios produzidos, por exemplo, pela ação da ANG II ou hiperosmolaridade no OSF e/ou OVLT.

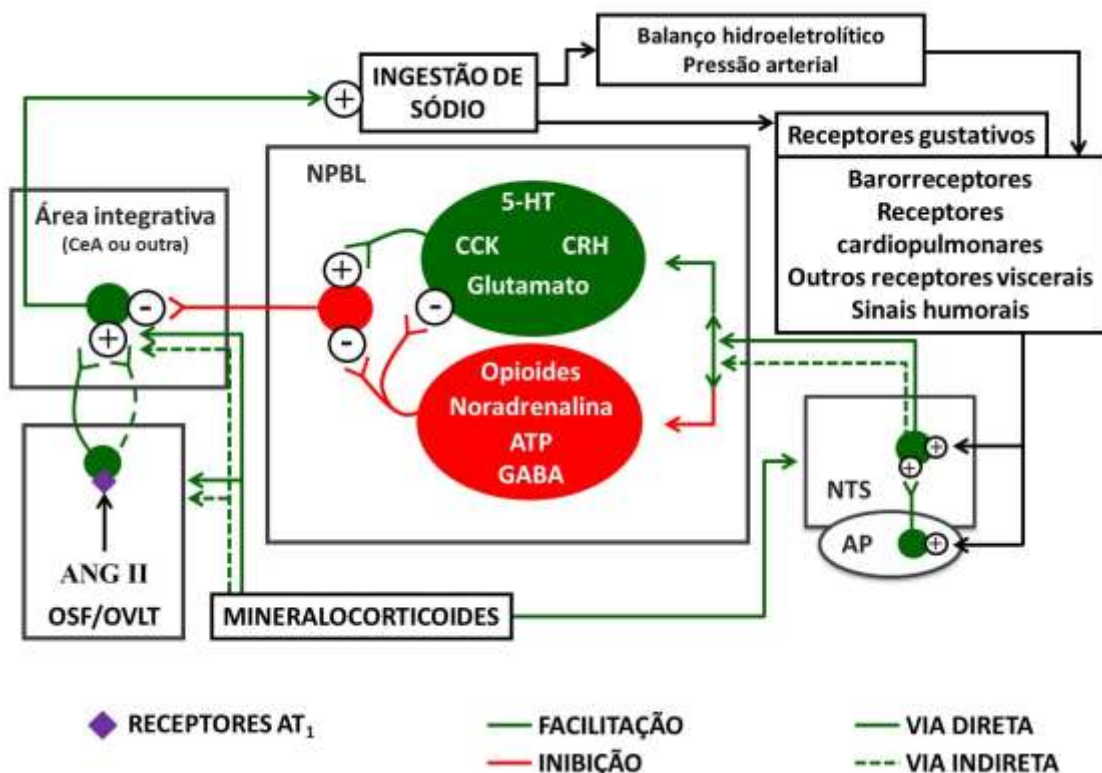


Figura 1 – Diagrama esquemático baseado em estudos em ratos mostrando a modulação dos mecanismos inibitórios do NPBL por diferentes neurotransmissores e a interação entre os mecanismos inibitórios do NPBL e mecanismos facilitatórios prosencefálicos envolvidos no controle da ingestão de água e NaCl. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; ATP, trifosfato de adenosina; CCK, colecistocinina; CeA, núcleo central da amígdala; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; GABA, ácido γ -aminobutírico; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical; OVLT, órgão vasculoso da lâmina terminal. Baseado em Menani e colaboradores¹⁸².

Além de interagir com os mecanismos inibitórios do NPBL, existem evidências de que os mecanismos facilitatórios prosencefálicos também interagem entre si. Já foi

demonstrado que o aumento da osmolaridade plasmática ativa regiões prosencefálicas também ativadas pela ANG II^{20,183-185}. Além disso, a ANG II potencializa o aumento na frequência de disparos induzido por estímulo osmótico em células osmossensíveis do NSO¹⁸⁶. O mecanismo angiotensinérgico também possui interação com o mecanismo colinérgico, já tendo sido demonstrada a participação dos receptores colinérgicos na resposta pressora induzida por ANG II¹⁸⁷ e participação dos receptores angiotensinérgicos na resposta pressora induzida por carbacol^{188,189}. No entanto, a interação entre os mecanismos facilitatórios prosencefálicos para o controle da ingestão de NaCl ainda não foi estudada. Os mecanismos ativados pelos osmorreceptores para facilitar a ingestão de NaCl aparentemente são os mesmos envolvidos na ingestão de água. Porém, ainda nenhum estudo confirmou quais são os mecanismos ativados pelos osmorreceptores para gerar sinais facilitatórios para a ingestão de NaCl ou mesmo se existem áreas prosencefálicas específicas envolvidas nestes efeitos.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar a interação entre os mecanismos colinérgico e angiotensinérgico e as vias osmossensíveis no controle da ingestão de água e NaCl induzida por diferentes protocolos dipsogênicos e/ou natriorexigênicos combinados com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL.

Para isso investigamos se injeções de atropina ou losartan e ZD 7155 (antagonista de receptores AT_1) no VL ou diretamente no OSF alterariam a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com: a) hiperosmolaridade plasmática induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M; b) ativação dos receptores colinérgicos com injeções de carbacol no VL ou OSF; c) tratamento subcutâneo com FURO + CAP; d) ativação dos receptores angiotensinérgicos com injeções de ANG II no VL.

Adicionalmente, devido à importância do OSF para as respostas induzidas por hiperosmolaridade e estimulação angiotensinérgica e colinérgica, também foi investigado se a aplicação aguda de estímulos osmóticos, angiotensinérgico e colinérgico alteraria a concentração citosólica de cálcio (uma indicação de aumento da atividade neuronal) em neurônios dissociados do OSF mantidos em cultura e se um mesmo neurônio seria ativado por diferentes estímulos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 290 e 310 g provenientes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP para os experimentos *in vivo*. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração (Bio Base, Águas Frias, Brasil) e dois bebedouros contendo água e solução de NaCl 0,3 M e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de 23 ± 2 °C e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas às 7 h). Os experimentos *in vivo* foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Proc. CEUA n° 01/2011). Para os experimentos *in vitro* realizados no Departamento de Psicologia da Universidade de Iowa (EUA), foram utilizados filhotes machos de rato Sprague-Dawley (18 a 20 dias; Harlan Laboratories, Indianápolis, EUA). Antes de serem utilizados, os filhotes foram mantidos no ambiente do laboratório junto com a mãe por 4 a 7 dias e tiveram livre acesso a ração (7013 NIH-31 modified rat diet) e água. Os experimentos *in vitro* foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade de Iowa.

3.2. Cirurgia encefálica

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg de peso corporal; Agener União, Embu-Guaçu, Brasil) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal; Agener União) e posicionados em um aparelho estereotáxico (Kopf, Tujunga, EUA). O bregma e o lambda foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos ratos e se determinar os pontos de introdução das cânulas-guia de aço inoxidável. Nesse ponto foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. As cânulas de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,5 mm e comprimento de 12 mm foram posicionadas no cérebro de acordo com coordenadas estereotáxicas pré-estabelecidas para a área a ser estudada e fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica aderida a dois parafusos presos na calota craniana. Para o NPBL, foram implantadas cânulas bilateralmente, posicionadas de acordo com as seguintes coordenadas: 9,7 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 3,2 mm abaixo da dura-máter. Para as injeções no VL, uma cânula foi implantada de acordo com as seguintes coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,5 mm lateral à linha mediana e 4,0 mm abaixo da dura-máter. Para as injeções no OSF também foi implantada uma cânula em direção a essa área, posicionada de acordo com as seguintes coordenadas: 1,1 mm caudal ao bregma, na linha mediana e 2,8 mm abaixo da dura-máter. As extremidades das cânulas-guia foram

posicionadas no encéfalo 2 mm acima dos locais que receberam a injeção. Exceto durante as injeções, um mandril de metal foi utilizado para o preenchimento e fechamento da extremidade externa das cânulas-guia. Ao fim da cirurgia, os ratos receberam injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil) e injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, Brasil). Após a cirurgia, os ratos foram manipulados diariamente e treinados para o procedimento experimental. Os experimentos foram iniciados cinco dias após a cirurgia encefálica.

3.3. Injeção de drogas no encéfalo

As injeções no NPBL, VL e OSF foram feitas utilizando-se seringa Hamilton de 5 µl (Hamilton, Reno, EUA), conectada por um tubo de polietileno (PE-10; Clay Adams, Parsippany, EUA) a uma agulha injetora. Para a execução dos experimentos, os ratos foram retirados das gaiolas, o mandril de metal foi removido e a agulha injetora (2 mm mais longa que a cânula-guia) foi introduzida no encéfalo através da cânula-guia. O volume de injeção foi de 0,2 µl no NPBL (em cada lado), 1,0 µl no VL e 0,1 µl no OSF. Após as injeções, o mandril de metal foi recolocado e os ratos devolvidos para as gaiolas.

3.4. Drogas injetadas centralmente

Angiotensina II (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foi dissolvida em salina isotônica estéril e administrada no VL na concentração de 50 ng/1,0 µl.

Cloridrato de carbacol (Sigma-Aldrich), agonista colinérgico, foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no VL na concentração de 4 nmol/1,0 µl e no OSF na concentração de 0,5 nmol/0,1 µl.

Cloridrato de moxonidina (Sigma-Aldrich), agonista adrenérgico α_2 /imidazólico, foi dissolvido em veículo (propilenoglicol e água 2:1) e administrado no NPBL na concentração de 0,5 nmol/0,2 µl.

Metilbrometo de atropina (Sigma-Aldrich), antagonista colinérgico muscarínico, foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no VL na concentração de 20 nmol/1,0 µl e no OSF na concentração de 2 nmol/0,1 µl.

Losartan potássico (Sigma-Aldrich), antagonista de receptores AT₁, foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no VL na concentração de 100 µg/1,0 µl e no OSF na concentração de 1 µg/0,1 µl.

ZD 7155 (Tocris Bioscience, Bristol, Inglaterra), antagonista de receptores AT_1 , foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no OSF na concentração de 1 $\mu\text{g}/0,1 \mu\text{l}$.

3.5. Aumento na osmolaridade plasmática induzido por sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico

Ração e bebedouros contendo água e NaCl 0,3 M foram removidos e, por meio de uma sonda de polietileno, os animais receberam uma sobrecarga intragástrica de 2 ml de NaCl 2 M. Este tratamento aumenta em 4% a concentração sérica de sódio e a osmolaridade plasmática⁶. Todos os animais foram previamente treinados com a introdução da sonda intragastricamente e infusão de 0,5 ml de água uma vez por dia, por cinco dias.

3.6. Teste de ingestão de água e NaCl 0,3 M

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas e durante a execução dos experimentos os ratos não tiveram acesso a ração. Após as injeções de drogas no encéfalo (ver protocolos experimentais no item 3.13 para detalhamento sobre as drogas injetadas), duas buretas de vidro graduadas (subdivisões de 0,1 ml) acopladas com bicos de aço inoxidável, uma contendo água e outra NaCl 0,3 M, foram oferecidas aos animais. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Foi guardado um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.7. Teste de ingestão de sacarose 0,06 M e água

Após o período de recuperação da cirurgia encefálica, os animais foram treinados para a ingestão de sacarose 0,06 M. Para isso, os animais tiveram à disposição solução de sacarose 0,06 M por 2 horas diariamente. Assim que se observou uma estabilidade no volume ingerido de sacarose 0,06 M foram feitos os experimentos. A ingestão de sacarose 0,06 M e água foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas. Durante a execução dos experimentos, os ratos não tiveram acesso a ração. Após as injeções de drogas no encéfalo (ver protocolo experimental no item 3.13.5 para detalhamento), duas buretas de vidro graduadas (subdivisões de 0,1 ml) acopladas com bicos de aço inoxidável, uma contendo sacarose 0,06 M e outra água, foram oferecidas aos animais. A ingestão de sacarose 0,06 M e água foi medida aos 30, 60, 90 e 120 minutos. Foi guardado um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.8. Teste de ingestão de ração e água

A ingestão de ração e água foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas. Os animais permaneceram sem ração, mas com acesso a água por 24 horas. Após esse período, as buretas com água foram removidas e foram feitas injeções de drogas no encéfalo (ver protocolos experimentais no item 3.13.6 para detalhamento). Um comedouro contendo uma quantidade pré-pesada de ração e uma bureta de vidro graduada (subdivisões de 0,1 ml) acoplada com bico de aço inoxidável contendo água foram oferecidos aos animais. A ingestão de ração e água foi medida aos 30, 60, 90 e 120 minutos, recolhendo-se antes das pesagens qualquer resíduo de ração espalhado pelos animais. Foi guardado um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.9. Análise histológica

Terminados os experimentos, 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 ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal; Cristália, Itapira, Brasil) e perfundidos por meio de injeção no coração de 50 ml de solução de formalina 10%. A seguir, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Após a fixação, foram feitos cortes coronais (60 µm de espessura) nos pontos de injeção. Os cortes histológicos foram montados em lâminas, corados pelo método Giemsa e analisados em microscópio para a localização dos sítios de injeção no NPBL, VL e OSF.

3.10. Cultura de células do OSF

Para obtenção das células do OSF, filhotes de rato Sprague-Dawley foram decapitados. A cabeça dos animais foi imediatamente colocada em etanol 70% gelado por alguns segundos e, em seguida, o cérebro foi rapidamente removido e colocado em uma placa de Petri com uma solução contendo sacarose 220 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 0,2 mM, dextrose 10 mM, MgSO₄ 6 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM e NaHCO₃ 26 mM. Foi feito um corte coronal espesso utilizando o quiasma óptico como referência anatômica e, com o auxílio de um microscópio estereoscópio binocular (Olympus, Center Valley, EUA), o OSF foi identificado e removido. Os tecidos do OSF de 5 a 6 filhotes foram agrupados, colocados em um tubo contendo solução salina balanceada de Earle (Sigma-Aldrich) e dispase I (4 U/2 ml; Roche, Indianapolis, EUA) e incubados nessa solução por 1 h a 37 °C. Após três lavagens em meio de cultura, uma suspensão de células foi preparada por trituração dos fragmentos com o

auxílio de uma pipeta de Pasteur até que os fragmentos de tecido fossem visivelmente dissociados. Lamínulas circulares (22 mm) foram revestidas com poli-L-lisina (0,1 mg poli-L-lisina/ml; Sigma-Aldrich) e colocadas em placas de Petri esterilizadas. Quatro a cinco gotas da suspensão de células foram colocadas sobre as lamínulas e incubadas a 37 °C em ambiente umidificado para que as células aderissem à lamínula. Após 2 a 4 h, foi adicionado meio de cultura à placa de Petri suficiente para cobrir a lamínula. O meio de cultura utilizado foi o meio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma-Aldrich) com 10% de soro bovino fetal (inativado por calor a 56 °C durante 30 minutos; Sigma-Aldrich) e 1% de solução de L-glutamina-penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich).

3.11. Medida da concentração intracelular de cálcio

A concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) foi medida utilizando o indicador fluorescente de cálcio Fluo-4AM (Invitrogen, Carlsbad, EUA). No dia do experimento, as células foram incubadas em líquido cerebrospinal artificial (LCEa; NaCl 126 mM, KCl 3 mM, $CaCl_2$ 2 mM, dextrose 10 mM, $MgSO_4$ 1 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM e $NaHCO_3$ 26 mM) contendo 0,02 mM de Fluo-4AM durante 60 minutos a 37 °C. Durante a incubação, o Fluo-4AM é absorvido pelas células e convertido em Fluo-4, um composto não permeante na membrana celular. Para as medidas da $[Ca^{2+}]_i$ e manipulações farmacológicas, a lamínula contendo as células do OSF foi colocada em uma câmara acoplada à platina do microscópio. Um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ produz um aumento na intensidade de fluorescência do Fluo-4. A intensidade de fluorescência foi medida usando um sistema digital de análise de imagem (microscópio confocal FluoView 500; Olympus) usando um laser de Argon (comprimento de onda de 488 nm) como fonte de excitação. Ao final do experimento, a viabilidade das células foi verificada aplicando LCEa contendo KCl 50 mM (substituindo uma quantidade equimolar de NaCl). Os dados foram analisados e a intensidade de fluorescência convertida em valores numéricos. A resposta à estimulação foi discernida como um aumento súbito na intensidade da fluorescência e representada como porcentagem em relação à fluorescência basal. A substituição da solução que banha as células induz uma pequena alteração na intensidade de fluorescência ($2,99 \pm 0,67\%$) e, portanto, alterações na intensidade de fluorescência menores do que 8,7% (média somada a dois desvios padrões) foram consideradas como artefato da manipulação. Apenas as células que apresentavam uma mudança na intensidade de fluorescência maior do que 8,7% foram considerados como sendo sensíveis à solução aplicada. As medidas da $[Ca^{2+}]_i$ foram realizadas à temperatura ambiente (24 ± 2 °C) em sala escura e 3 dias após a dissociação e cultura das células do OSF. A

osmolalidade das soluções testadas foi determinada pelo ponto de congelamento utilizando o osmômetro μ OSMETTE™ (Precision Systems Inc., Natick, EUA).

3.12. Análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média (EPM) foram representados em gráficos ou tabelas. A análise de variância (ANOVA) de 1 fator (tratamento) e o pós-teste de Student-Newman-Keuls foram utilizados para a análise da intensidade de fluorescência em testes de medida da $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF. ANOVA de 2 fatores (tratamento e tempo) e o pós-teste de Student-Newman-Keuls foram utilizados para a análise da ingestão de água, NaCl 0,3 M, sacarose 0,06 M e ração. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

3.13. Protocolos experimentais testados

3.13.1. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no VL.

Os ratos portadores de cânulas implantadas no VL e NPBL receberam sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml/rato) para induzir aumento da osmolaridade plasmática e logo em seguida salina, atropina (20 nmol/1,0 μ l) ou losartan (100 μ g/1,0 μ l) foram injetados no VL. Quarenta e cinco minutos após a sobrecarga e injeções no VL, os animais receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso às buretas contendo água e NaCl 0,3 M. Os ratos tratados com NaCl 2 M ig foram submetidos a quatro testes nos quais receberam as seguintes combinações de tratamentos centrais:

- 1) salina VL + veículo NPBL;
- 2) salina VL + moxonidina NPBL;
- 3) atropina VL + moxonidina NPBL;
- 4) losartan VL + moxonidina NPBL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima. As combinações de tratamentos em cada subgrupo foram testadas de maneira aleatória e, ao final de todos os experimentos, cada animal recebeu todas as combinações de tratamentos.

3.13.2. *Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de carbacol no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de atropina ou losartan no VL.*

Os ratos normohidratados portadores de cânulas implantadas no VL e NPBL receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e injeção de salina, atropina (20 nmol/1,0 µl) ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Após quinze minutos, os animais receberam injeção de carbacol (4 nmol/1,0 µl) no VL e imediatamente após a injeção no VL, os ratos tiveram acesso às buretas contendo água e NaCl 0,3 M. Os ratos foram submetidos a quatro experimentos, envolvendo as seguintes combinações de tratamentos centrais:

- 1) salina + carbacol VL + veículo NPBL;
- 2) salina + carbacol VL + moxonidina NPBL;
- 3) atropina + carbacol VL + moxonidina NPBL;
- 3) losartan + carbacol VL + moxonidina NPBL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima. As combinações de tratamentos em cada subgrupo foram testadas de maneira aleatória e, ao final de todos os experimentos, cada animal recebeu todas as combinações de tratamentos.

3.13.3. *Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.*

Os ratos portadores de cânulas implantadas no VL e NPBL receberam injeções subcutâneas de FURO (10 mg/kg de peso corporal) + CAP (5 mg/kg de peso corporal) e logo em seguida, salina ou atropina (20 nmol/1,0 µl) foram injetados no VL. Quarenta e cinco minutos após o tratamento com FURO + CAP e injeções no VL, os animais receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso às buretas contendo água e NaCl 0,3 M. Os ratos foram submetidos a três testes nos quais receberam as seguintes combinações de tratamentos centrais:

- 1) salina VL + veículo NPBL;
- 2) salina VL + moxonidina NPBL;
- 3) atropina VL + moxonidina NPBL;

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima. As combinações de tratamentos em

cada subgrupo foram testadas de maneira aleatória e, ao final de todos os experimentos, cada animal recebeu todas as combinações de tratamentos.

3.13.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de ANG II no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.

Os ratos normohidratados portadores de cânulas implantadas no VL e NPBL receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e injeção de salina ou atropina (20 nmol/1,0 µl) no VL. Após quinze minutos, os animais receberam injeção de ANG II (50 ng/1,0 µl) no VL e imediatamente após a injeção, os ratos tiveram acesso às buretas contendo água e NaCl 0,3 M. Os ratos foram submetidos a três experimentos, envolvendo uma das seguintes combinações de tratamentos centrais:

- 1) salina + ANG II VL + veículo NPBL;
- 2) salina + ANG II VL + moxonidina NPBL;
- 3) atropina + ANG II VL + moxonidina NPBL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima. As combinações de tratamentos em cada subgrupo foram testadas de maneira aleatória e, ao final de todos os experimentos, cada animal recebeu todas as combinações de tratamentos.

3.13.5. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos normohidratados tratados com injeções de losartan no VL.

Os ratos normohidratados portadores de cânulas implantadas no VL receberam injeções de salina ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Após quinze minutos, os animais tiveram acesso às buretas contendo sacarose 0,06 M e água. Os ratos foram submetidos a dois experimentos, envolvendo um dos seguintes tratamentos centrais:

- 1) salina VL;
- 2) losartan VL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima de maneira contrabalanceada nos dois testes.

3.13.6. Ingestão de ração e água induzida por privação alimentar por 24 horas em ratos normohidratados tratados com injeções de losartan no VL.

Os ratos normohidratados portadores de cânulas implantadas no VL permaneceram sem ração, mas com acesso a água por 24 horas. Após esse período, as buretas contendo água foram removidas e os animais receberam injeções de salina ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Após quinze minutos, os animais tiveram acesso a uma quantidade conhecida de ração e bureta contendo água. Os ratos foram submetidos a dois experimentos, envolvendo um dos seguintes tratamentos centrais:

- 1) salina VL;
- 2) losartan VL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima de maneira contrabalanceada nos dois testes.

3.13.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no OSF.

Os ratos portadores de cânulas implantadas no OSF e NPBL receberam sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml/rato) para induzir aumento da osmolaridade plasmática e logo em seguida salina, atropina (2 nmol/0,1 µl) ou losartan (1 µg/0,1 µl) foram injetados no OSF. Quarenta e cinco minutos após a sobrecarga e injeções no OSF, os animais receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso às buretas contendo água e NaCl 0,3 M. Os ratos tratados com NaCl 2 M ig foram submetidos a quatro testes nos quais receberam as seguintes combinações de tratamentos centrais:

- 1) salina OSF + veículo NPBL;
- 2) salina OSF + moxonidina NPBL;
- 3) atropina OSF + moxonidina NPBL;
- 4) losartan OSF + moxonidina NPBL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima. As combinações de tratamentos em cada subgrupo foram testadas de maneira aleatória e, ao final de todos os experimentos, cada animal recebeu todas as combinações de tratamentos.

3.13.8. *Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de carbacol no OSF que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de atropina ou ZD 7155 no OSF.*

Os ratos normohidratados portadores de cânulas implantadas no OSF e NPBL receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e injeção de salina, atropina (2 nmol/0,1 µl) ou ZD 7155 (1 µg/0,1 µl) no OSF. Após quinze minutos, os animais receberam injeção de carbacol (0,5 nmol/0,1 µl) no OSF e imediatamente após a injeção, os ratos tiveram acesso às buretas contendo água e NaCl 0,3 M. Os ratos foram submetidos a quatro experimentos, envolvendo uma das seguintes combinações de tratamentos centrais:

- 1) salina + carbacol OSF + veículo NPBL;
- 2) salina + carbacol OSF + moxonidina NPBL;
- 3) atropina + carbacol OSF + moxonidina NPBL;
- 3) losartan + carbacol OSF + moxonidina NPBL.

Em cada teste, o grupo de animais foi subdividido em dois subgrupos e cada subgrupo recebeu uma das combinações indicadas acima. As combinações de tratamentos em cada subgrupo foram testadas de maneira aleatória e, ao final de todos os experimentos, cada animal recebeu todas as combinações de tratamentos.

3.13.9. *Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com LCEa hiperosmótico.*

Após o período de incubação com o Fluo-4AM, a lamínula contendo as células do OSF foram fixadas na câmara acoplada à platina do microscópio. As células foram banhadas com LCEa isosmótico (292 mOsm/kg) e a intensidade de fluorescência basal foi registrada. Após a registro da fluorescência basal, a solução que banhava as células foi substituída por LCEa isosmótico (controle) ou LCEa com osmolalidades de 308, 313 e 321 mOsm/kg. Os solutos utilizados para aumentar a osmolalidade do LCEa foram NaCl e manitol. A intensidade da fluorescência foi registrada novamente um minuto após a aplicação do LCEa hiperosmótico. A resposta foi analisada e representada como porcentagem de alteração na intensidade de fluorescência em relação ao basal. O número total de células no campo focal e o número de células sensíveis ao estímulo aplicado também foram quantificados.

3.13.10. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e LCEa hiperosmótico.

Após o período de incubação com o Fluo-4AM, a lamínula contendo as células do OSF foram fixadas na câmara acoplada à platina do microscópio. As células foram banhadas com LCEa isosmótico (292 mOsm/kg) e a intensidade de fluorescência basal foi registrada. Após a registro da fluorescência basal, a solução que banhava as células foi substituída por LCEa isosmótico (controle), LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg) ou ANG II 0,1 μ M. O soluto utilizado para aumentar a osmolalidade do LCEa foi NaCl. A intensidade da fluorescência foi registrada novamente um minuto após a aplicação do LCEa hiperosmótico ou ANG II. As soluções foram testadas de maneira contrabalanceada e com intervalo de 10 minutos entre os testes. A resposta foi analisada e representada como porcentagem de alteração na intensidade de fluorescência em relação ao basal. O número total de células no campo focal e o número de células sensíveis aos estímulos aplicados também foram quantificados.

3.13.11. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com carbacol e LCEa hiperosmótico.

Após o período de incubação com o Fluo-4AM, a lamínula contendo as células do OSF foram fixadas na câmara acoplada à platina do microscópio. As células foram banhadas com LCEa isosmótico (292 mOsm/kg) e a intensidade de fluorescência basal foi registrada. Após a registro da fluorescência basal, a solução que banhava as células foi substituída por LCEa isosmótico (controle), LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg) ou carbacol 100 μ M. O soluto utilizado para aumentar a osmolalidade do LCEa foi NaCl. A intensidade da fluorescência foi registrada novamente um minuto após a aplicação do LCEa hiperosmótico ou carbacol. As soluções foram testadas de maneira contrabalanceada e com intervalo de 10 minutos entre os testes. A resposta foi analisada e representada como porcentagem de alteração na intensidade de fluorescência em relação ao basal. O número total de células no campo focal e o número de células sensíveis aos estímulos aplicados também foram quantificados.

3.13.12. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e carbacol.

Após o período de incubação com o Fluo-4AM, a lamínula contendo as células do OSF foram fixadas na câmara acoplada à platina do microscópio. As células foram banhadas com LCEa e a intensidade de fluorescência basal foi registrada. Após a registro da

fluorescência basal, a solução que banhava as células foi substituída por LCEa (controle), ANG II 0,1 μM ou carbacol 100 μM . A intensidade da fluorescência foi registrada novamente um minuto após a aplicação de ANG II ou carbacol. As soluções foram testadas de maneira contrabalanceada e com intervalo de 10 minutos entre os testes. A resposta foi analisada e representada como porcentagem de alteração na intensidade de fluorescência em relação ao basal. O número total de células no campo focal e o número de células sensíveis aos estímulos aplicados também foram quantificados.

4. RESULTADO

4.1. Análise histológica

As injeções foram consideradas posicionadas corretamente quando localizadas nas porções lateral dorsal e central do NPBL (ver Fulwiler e Saper¹⁹⁰ para definição dos subnúcleos do NPBL) (Figura 2). Os sítios de injeção no NPBL do presente estudo são similares aos utilizados em estudos prévios que mostraram efeito das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL^{7,127,171,181,191,192}. As injeções no VL foram consideradas corretamente posicionadas quando a cânula estava direcionada para a porção central ou posterior do VL. Injeções no OSF foram consideradas corretamente posicionadas quando o corante estava visível apenas no parênquima do OSF, não havendo ruptura do epêndima que separa o OSF da porção dorsal do III-V (Figura 3). Nos animais cujos sítios de injeção não atingiram o OSF, estas foram classificadas como: a) injeção na ASM, quando as injeções atingiram a região situada na linha média entre os cornos anteriores dos ventrículos laterais, corpo caloso e comissura anterior; b) injeção na porção dorsal do III-V, quando o epêndima apresentava-se rompido e não havia sinal de injeção no parênquima do OSF; c) injeção no tecido adjacente ao OSF, quando o sítio de injeção não fora o tecido do OSF ou da ASM ou o III-V. Os ratos com sítio de injeção localizado na extremidade ventral do OSF em uma posição em que pudesse ter ocorrido vazamento para o III-V foram excluídos da análise, já que não era possível classificá-los como tendo injeção apenas no OSF ou apenas no III-V.

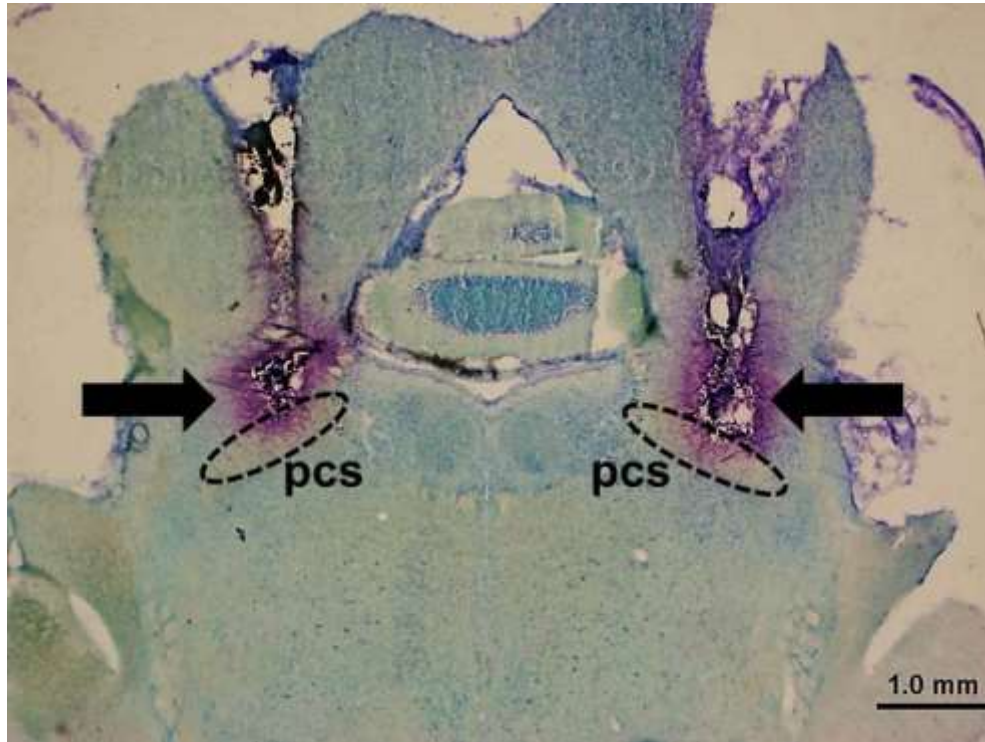


Figura 2 – Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas). pcs, pedúnculo cerebelar superior.

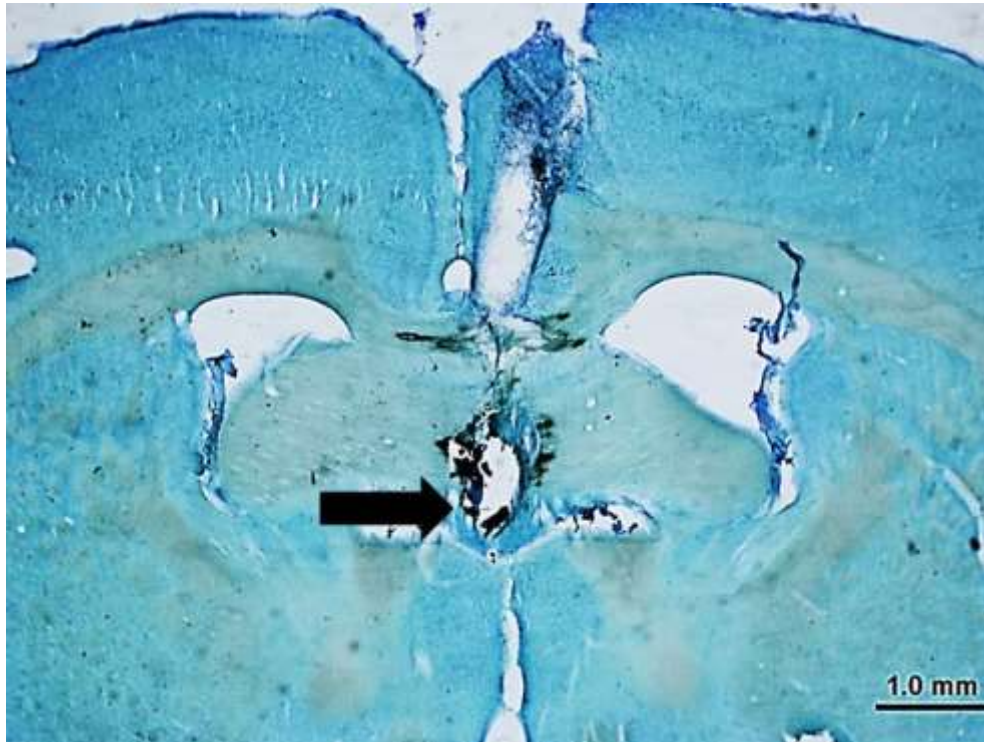


Figura 3 – Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no OSF (indicado pela seta).

4.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no VL.

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL de ratos tratados com NaCl 2 M ig aumentaram significativamente a ingestão de água (13,0 ± 4,4 ml/2 h, vs. veículo no NPBL: 6,9 ± 1,0 ml/2 h) [F(3,24) = 7,00; P < 0,05] e NaCl 0,3 M (18,6 ± 5,2 ml/2 h, vs. veículo no NPBL: 0,2 ± 0,1 ml/2 h) [F(3,24) = 10,96; P < 0,05]. O pré-tratamento com injeções de atropina (20 nmol/1,0 µl) ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL aboliu a ingestão de água (0,7 ± 0,3 ml/2 h e 0,9 ± 0,8 ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M (1,3 ± 0,4 ml/2 h e 0,6 ± 0,3 ml/2 h, respectivamente) induzida por hiperosmolaridade combinada com moxonidina injetada no NPBL (Figura 4).

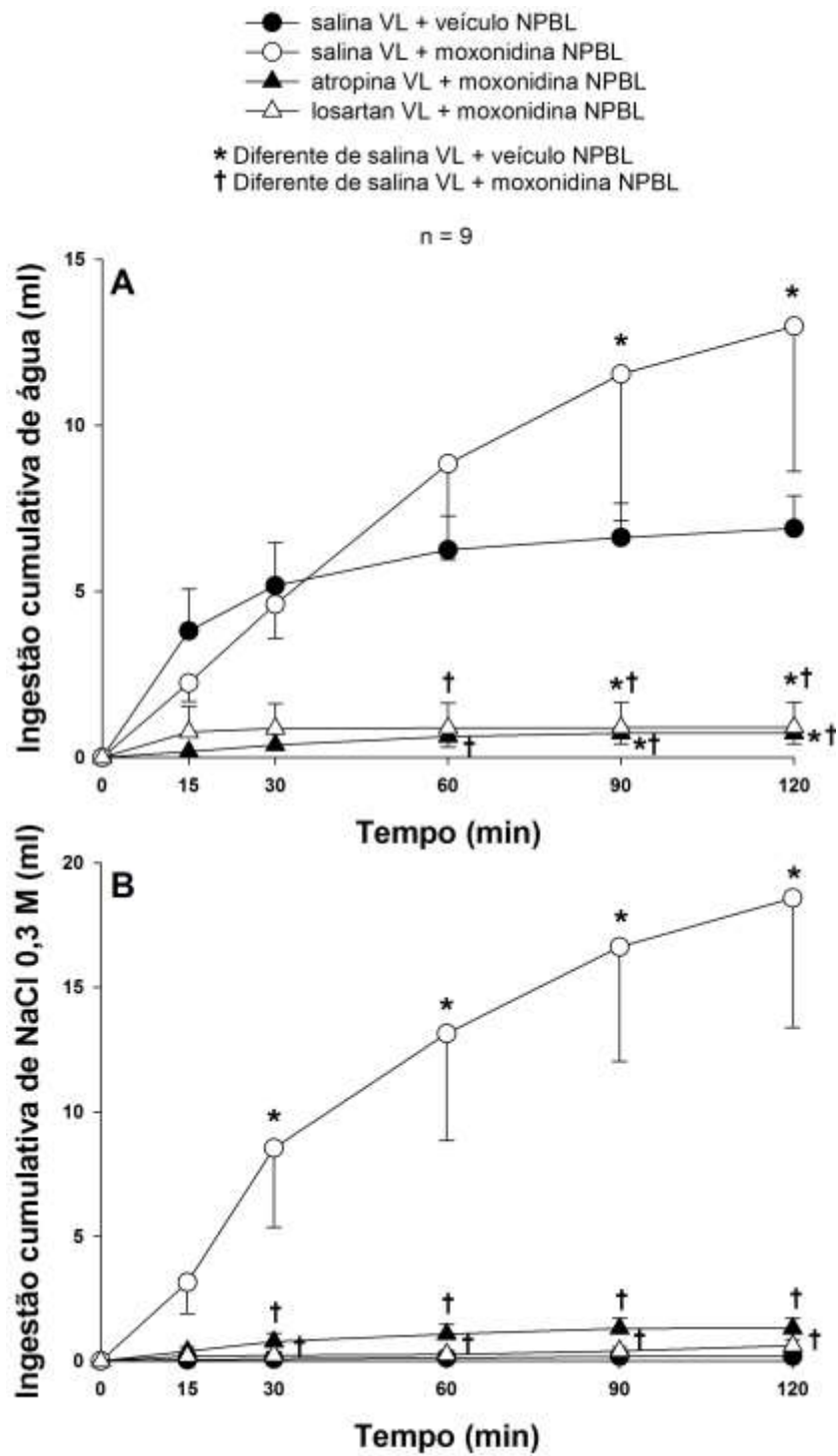


Figura 4 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (20 nmol/1,0 μ l) ou losartan (100 μ g/1,0 μ l) no VL. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de animais.

4.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções de carbacol no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no VL.

A injeção de carbacol (4 nmol/1,0 µl) no VL de ratos normohidratados que receberam injeções de veículo no NPBL induziu ingestão de água ($5,0 \pm 1,2$ ml/2 h) e uma pequena ingestão de NaCl 0,3 M ($1,0 \pm 0,2$ ml/2 h). Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de água ($11,1 \pm 3,6$ ml/2 h) [$F(3,27) = 7,98$; $P < 0,05$] e NaCl 0,3 M ($16,6 \pm 5,8$ ml/2 h) [$F(3,27) = 6,12$; $P < 0,05$] em animais tratados com injeção de carbacol no VL. O pré-tratamento com injeções de atropina (20 nmol/1,0 µl) ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL aboliu a ingestão de água ($0,9 \pm 0,6$ ml/2 h e $1,2 \pm 0,6$ ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M ($2,4 \pm 1,3$ ml/2 h e $4,0 \pm 2,0$ ml/2 h, respectivamente) de ratos tratados com injeção de carbacol no VL que receberam injeções de moxonidina no NPBL (Figura 5).

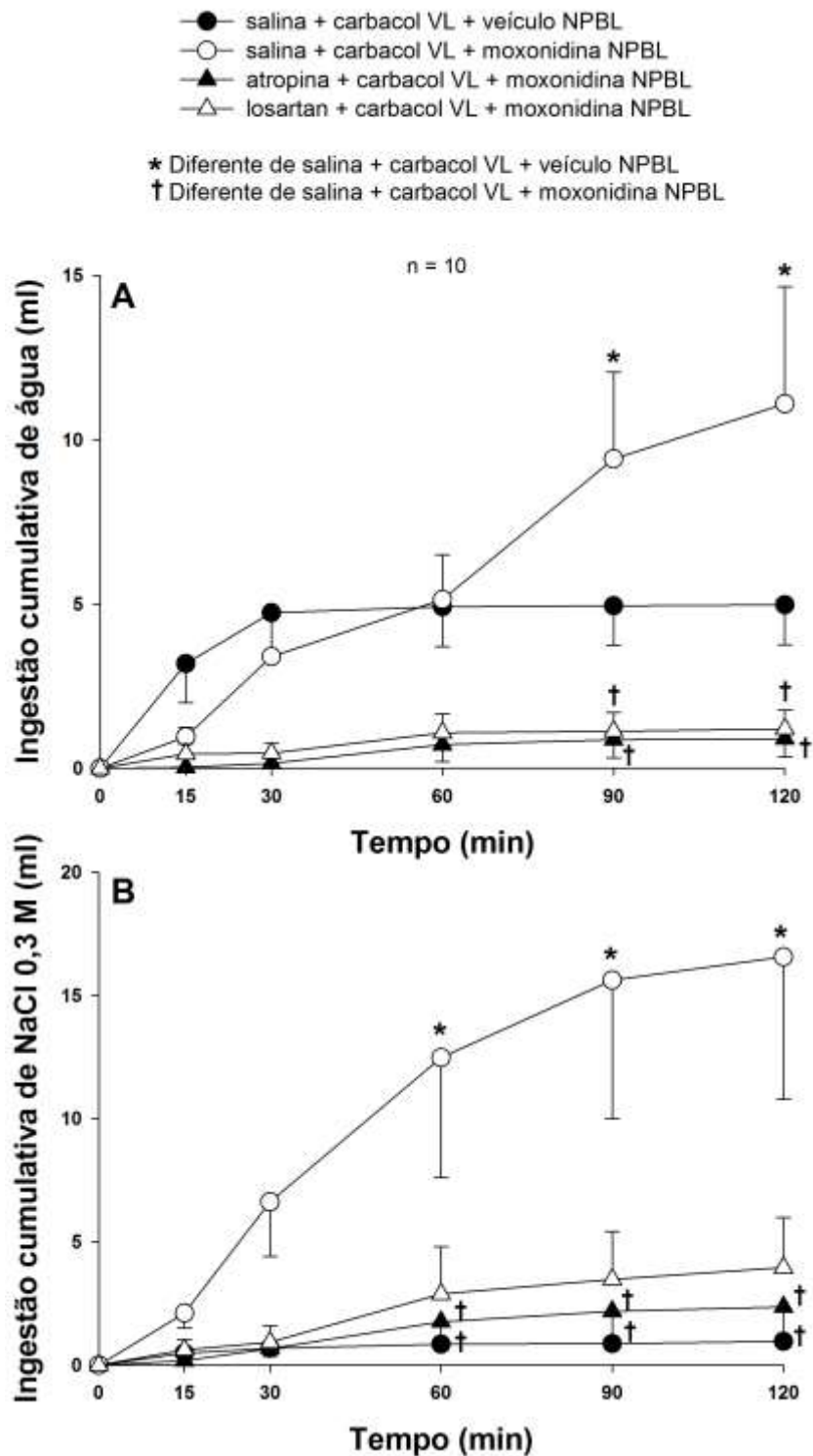


Figura 5 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol (4 nmol/1,0 µl) no VL que receberam injeções bilaterais de veiculo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (20 nmol/1,0 µl) ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

4.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.

Em ratos tratados com salina icv, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de água ($23,0 \pm 3,2$ ml/2 h, vs. veículo no NPBL: $8,9 \pm 1,0$ ml/2 h) [F(2,16) = 10,04; P < 0,05] e NaCl 0,3 M ($27,8 \pm 4,8$ ml/2 h, vs. veículo no NPBL: $4,5 \pm 0,7$ ml/2 h) [F(2,16) = 14,05; P < 0,05] induzida por FURO + CAP. O pré-tratamento com injeção de atropina (20 nmol/1,0 µl) não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M ($27,5 \pm 3,8$ ml/2 h), porém reduziu a ingestão de água ($14,7 \pm 2,2$ ml/2 h) induzida por FURO + CAP combinado com injeções de moxonidina no NPBL (Figura 6).

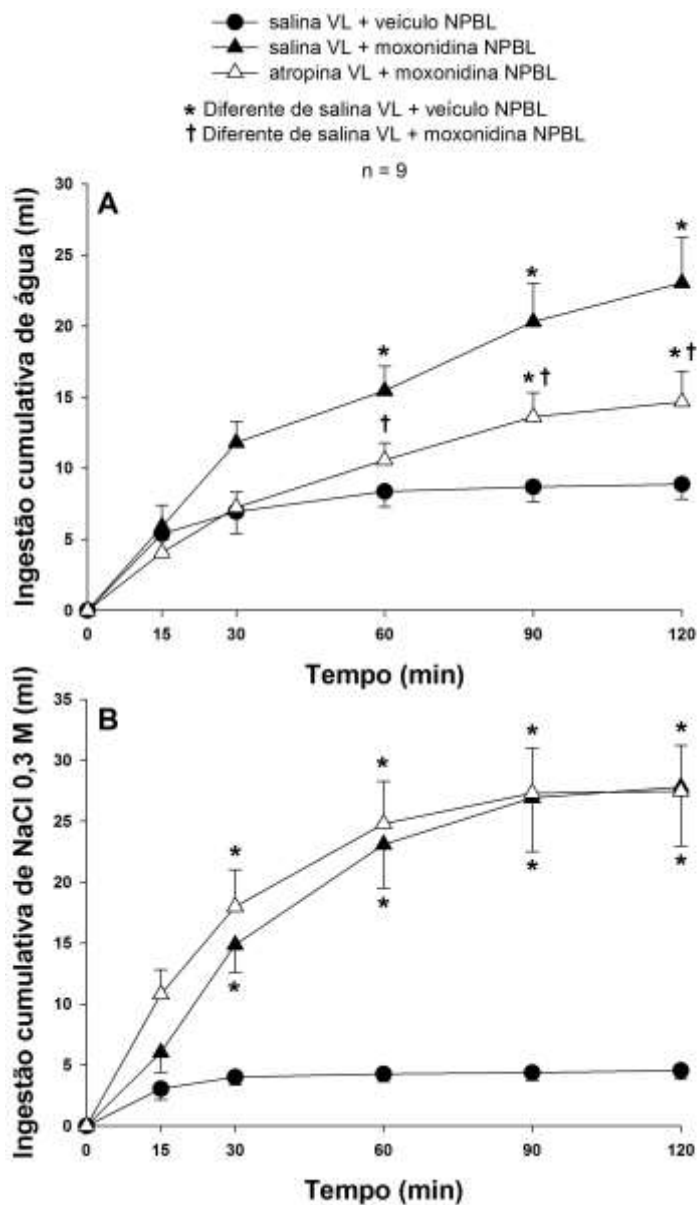


Figura 6 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos que receberam injeções de salina ou atropina (20 nmol/1,0 µl) no VL combinadas com injeções bilaterais de veiculo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

4.5. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de ANG II no VL que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina no VL.

A injeção de ANG II (50 ng/1,0 μ l) no VL de ratos normohidratados que receberam injeção de veículo no NPBL induziu ingestão de água ($14,3 \pm 1,5$ ml/2 h) e uma pequena ingestão de NaCl 0,3 M ($3,3 \pm 1,0$ ml/2 h). Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram a ingestão de água ($25,2 \pm 2,5$ ml/2 h) [F(2,16) = 6,50; P < 0,05] e NaCl 0,3 M ($26,9 \pm 2,7$ ml/2 h) [F(2,16) = 26,81; P < 0,05] em animais tratados com injeção de ANG II no VL. O pré-tratamento com injeção de atropina (20 nmol/1,0 μ l) no VL não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M ($23,6 \pm 3,9$ ml/2 h), porém reduziu a ingestão de água ($18,8 \pm 2,2$ ml/2 h) de ratos tratados com injeção de ANG II no VL que receberam injeções de moxonidina no NPBL (Figura 7).

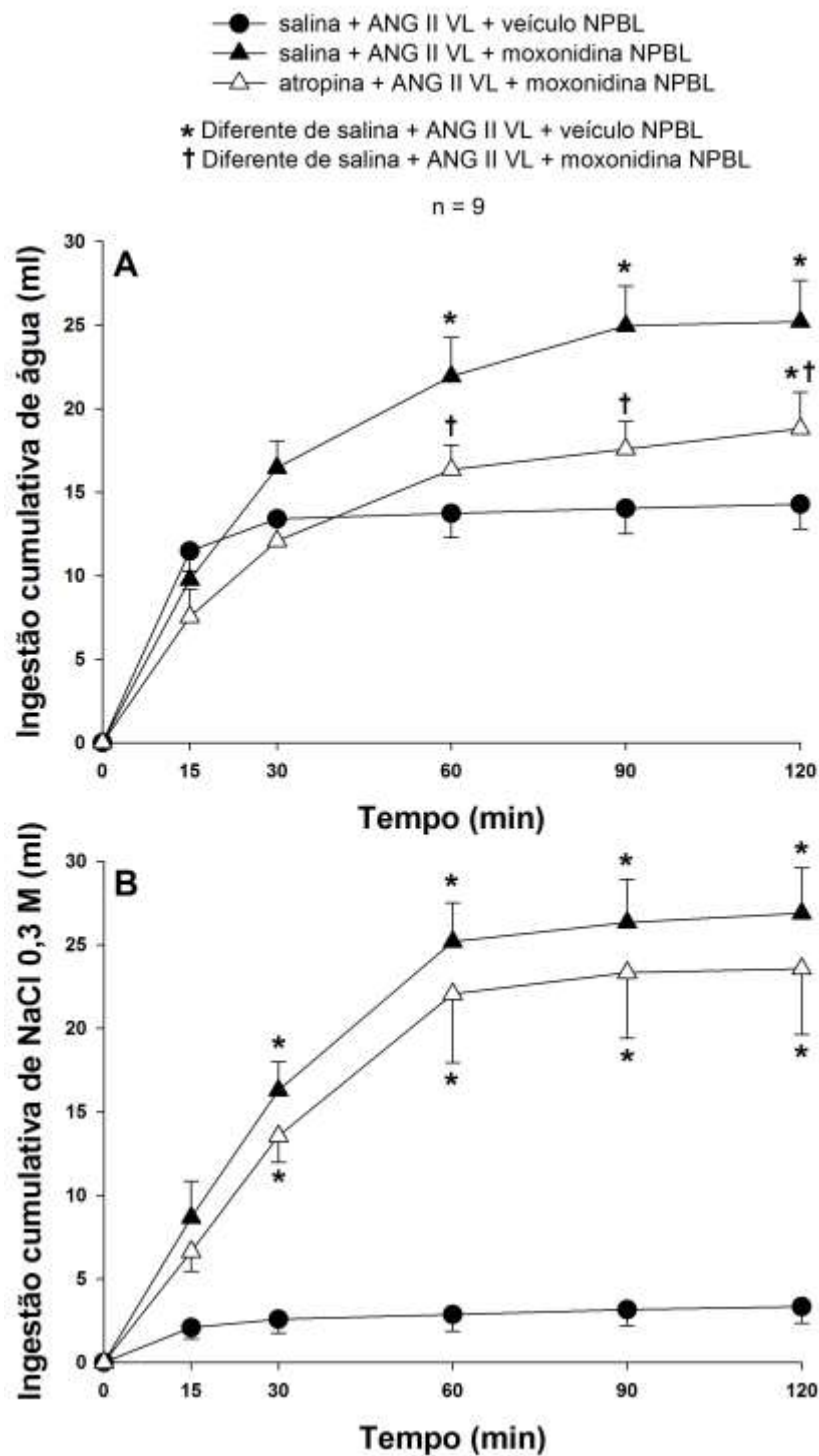


Figura 7 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de ANG II (50 ng/1,0 µl) no VL que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina ou atropina (20 nmol/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

4.6. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos normohidratados tratados com injeção de losartan no VL.

A injeção de losartan (100 µg/1,0 µl) no VL de ratos treinados a ingerir sacarose 0,06 M diariamente reduziu a ingestão de sacarose 0,06 M ($9,7 \pm 2,5$ ml/2 h, vs. salina no VL: $14,7 \pm 3,3$ ml/2 h) [$F(1,9) = 5,26$; $P < 0,05$], sem alterar a ingestão de água ($0,1 \pm 0,1$ ml/2 h, vs. salina no VL: $2,5 \pm 1,9$ ml/2 h) [$F(1,9) = 1,79$; $P > 0,05$] (Figura 8).

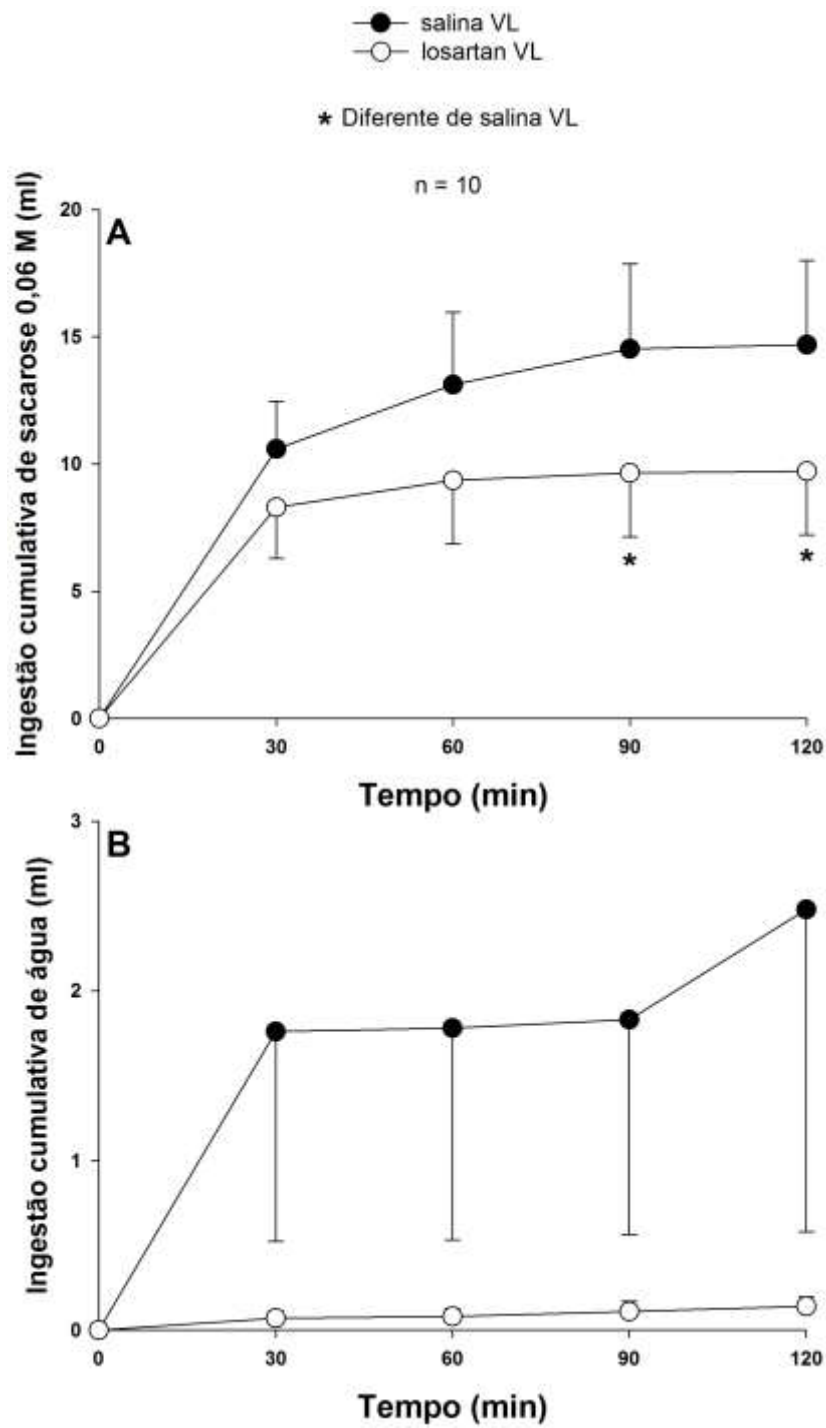


Figura 8 - Ingestão cumulativa de (A) sacarose 0,06 M e (B) água em ratos normohidratados que receberam injeção de salina ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

4.7. Ingestão de ração e água induzida por privação alimentar por 24 horas em ratos normohidratados tratados com injeção de losartan no VL.

A injeção de losartan (100 µg/1,0 µl) no VL não alterou a ingestão de ração induzida por privação alimentar por 24 horas ($12,7 \pm 1,8$ g/2 h, vs. salina no VL: $12,6 \pm 0,8$ g/2 h) [F(1,9) = 0,00; P < 0,05], porém reduziu a ingestão de água ($9,4 \pm 2,5$ ml/2 h, vs. salina no VL: $13,6 \pm 1,0$ ml/2 h) [F(1,9) = 6,35; P > 0,05] (Figura 9).

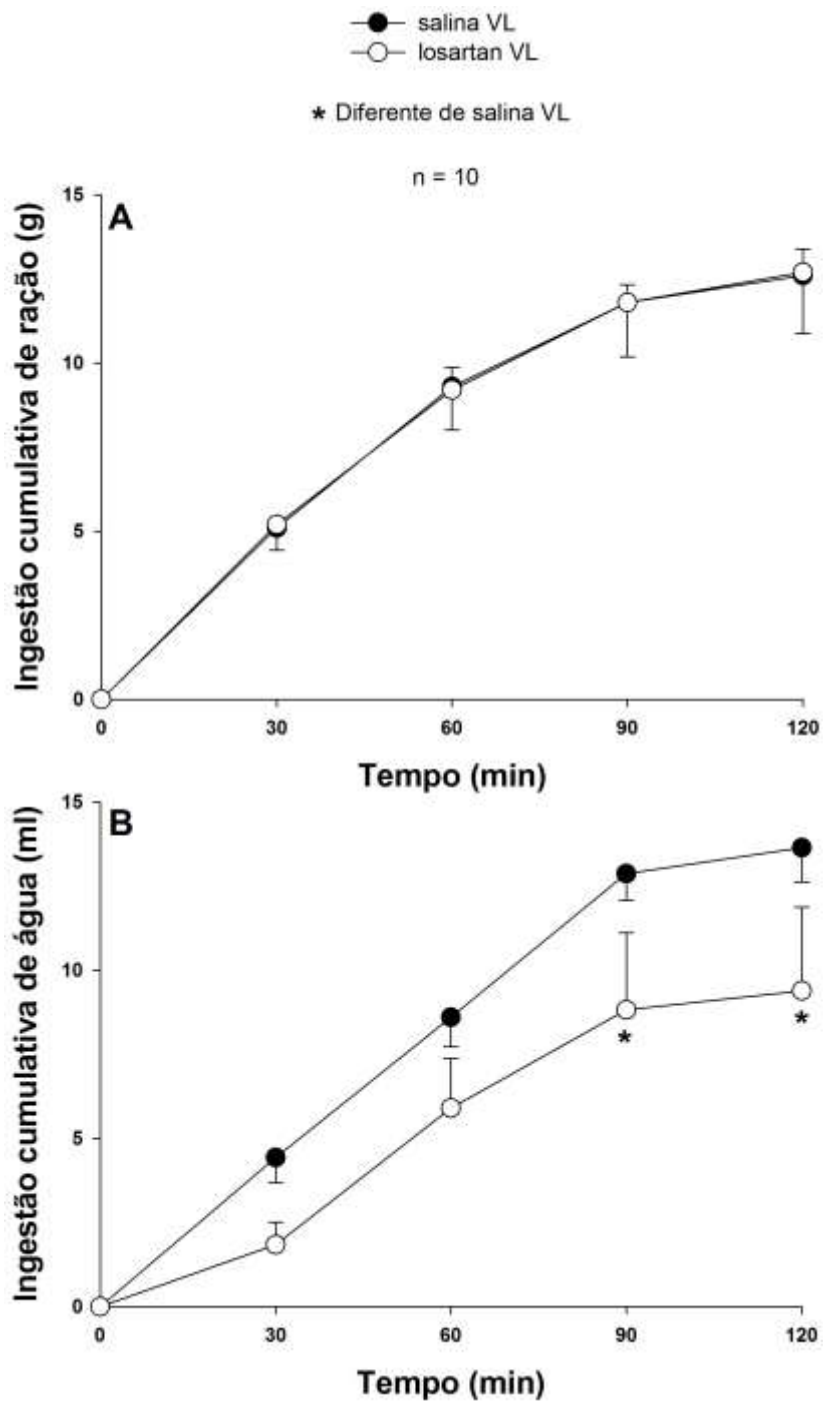


Figura 9 - Ingestão cumulativa de (A) ração e (B) água em ratos privados de ração por 24 horas que receberam injeção de salina ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

4.8. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartan no OSF.

4.8.1. Efeito de injeções corretamente posicionadas no OSF e NPBL.

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL de ratos tratados com NaCl 2 M ig aumentaram significativamente a ingestão de água (15,1 ± 3,6 ml/2 h, vs. veículo no NPBL: 6,3 ± 1,6 ml/2 h) [F(3,21) = 8,51; P < 0,05] e NaCl 0,3 M (21,4 ± 4,4 ml/2 h, vs. veículo no NPBL: 0,7 ± 0,4 ml/2 h) [F(3,21) = 9,46; P < 0,05]. O pré-tratamento com injeção de atropina (2 nmol/0,1 µl) ou losartan (1 µg/0,1 µl) no OSF aboliu a ingestão de água (2,1 ± 0,9 ml/2 h e 2,5 ± 1,1 ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M (5,0 ± 2,8 ml/2 h e 3,3 ± 2,0 ml/2 h, respectivamente) induzida por hiperosmolaridade combinada com moxonidina injetada no NPBL (Figura 10).

4.8.2. Efeito de injeções posicionadas na ASM e NPBL.

Em alguns animais, a cânula direcionada ao OSF atingiu a ASM e, portanto, esses animais receberam injeções de atropina e losartan na ASM combinado com injeções de moxonidina no NPBL. Nesses animais, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram significativamente a ingestão de água (17,2 ± 7,4 ml/2 h, vs. veículo no NPBL: 6,3 ± 1,9 ml/2 h) [F(3,12) = 2,70; P < 0,05] e NaCl 0,3 M (23,4 ± 5,4 ml/2 h, vs. veículo no NPBL: 0,6 ± 0,4 ml/2 h) [F(3,12) = 8,49; P < 0,05] induzida por hiperosmolaridade. O pré-tratamento com injeção de atropina (2 nmol/0,1 µl) ou losartan (1 µg/0,1 µl) na ASM reduziu a ingestão de água (4,6 ± 2,3 ml/2 h e 6,3 ± 3,2 ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M (4,4 ± 1,9 ml/2 h e 4,2 ± 2,5 ml/2 h, respectivamente) induzida por hiperosmolaridade combinada com moxonidina injetada no NPBL (Tabela 1).

4.8.3. Efeito de injeções corretamente posicionadas no NPBL, mas fora do OSF ou da ASM.

A especificidade do OSF e da ASM como local de ação das injeções de atropina ou losartan foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções de moxonidina no NPBL combinado com injeção de atropina ou losartan no III-V ou no tecido adjacente ao OSF. O pré-tratamento com atropina (2 nmol/0,1 µl) ou losartan (1 µg/0,1 µl) no III-V não alterou os efeitos das injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL de ratos tratados com NaCl 2 M ig na ingestão de água (salina III-V: 14,5 ± 3,6 ml/2 h; atropina III-V: 15,0 ± 1,8 ml/2 h; losartan III-V: 17,5 ± 2,8 ml/2 h) [F(3,15) = 3,64; P < 0,05] e NaCl 0,3 M (veículo III-V: 19,9 ± 2,1 ml/2 h; atropina

III-V: $20,1 \pm 1,7$ ml/2 h; losartan III-V: $20,6 \pm 3,5$ ml/2 h) [F(3,15) = 18,84; P < 0,05] (Tabela 2). Quando a cânula estava posicionada no tecido adjacente ao OSF, a injeção de atropina (2 nmol/0,1 μ l) ou losartan (1 μ g/0,1 μ l) também não alterou os efeitos da moxonidina na ingestão de água (salina tecido: $16,4 \pm 2,4$ ml/2 h; atropina tecido: $16,4 \pm 2,2$ ml/2 h; losartan tecido: $16,6 \pm 3,1$ ml/2 h) [F(3,9) = 6,39; P < 0,05] e NaCl 0,3 M (veículo tecido: $22,2 \pm 1,8$ ml/2 h; atropina tecido: $20,6 \pm 3,1$ ml/2 h; losartan tecido: $22,6 \pm 1,6$ ml/2 h) [F(3,9) = 31,88; P < 0,05] de ratos tratados com NaCl 2 M ig (Tabela 3).

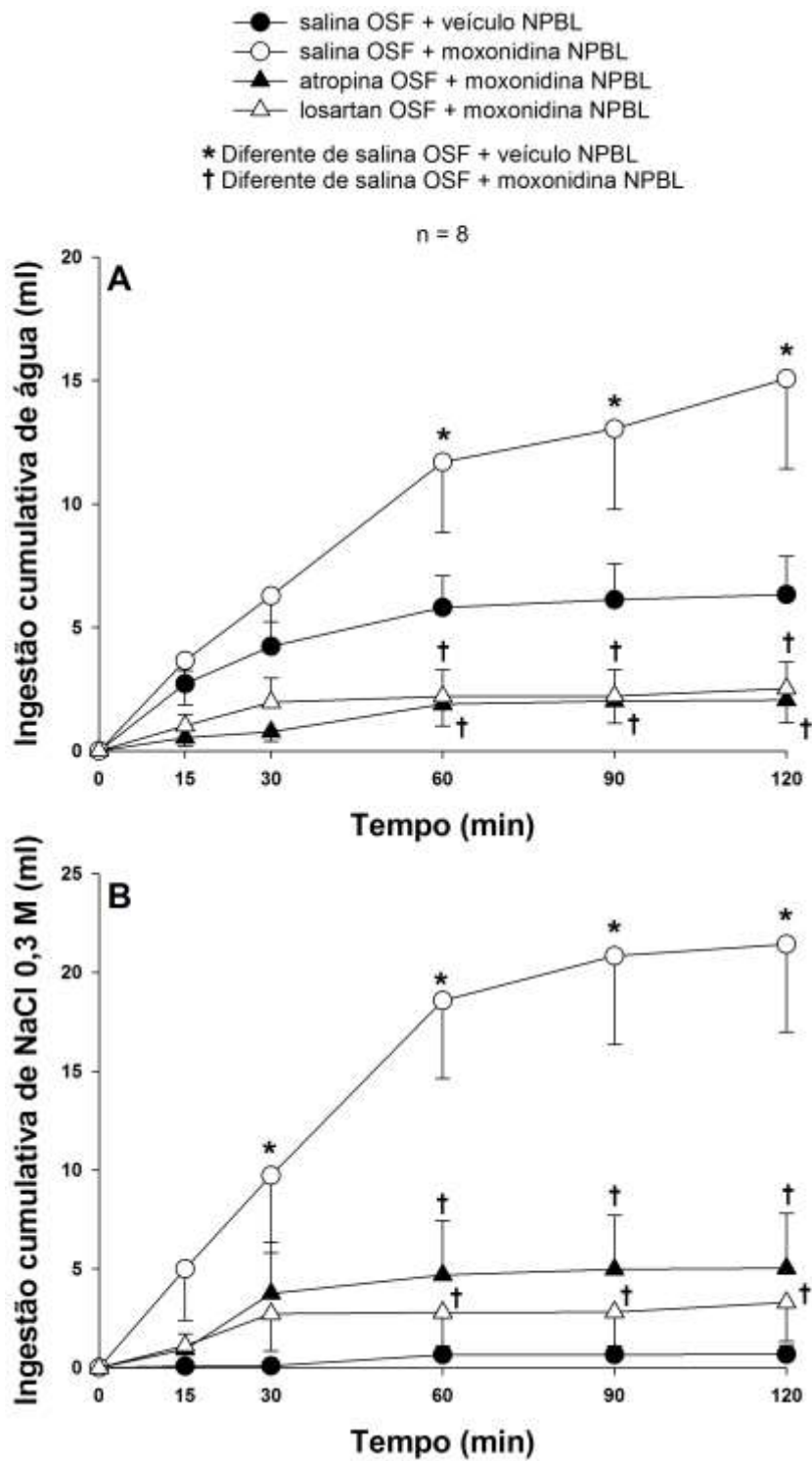


Figura 10 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (2 nmol/0,1 µl) ou losartan (1 µg/0,1 µl) no OSF. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

Tabela 1 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan na ASM.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 5	30 min	60 min	90 min	120 min
salina ASM + veículo NPBL		5,0 ± 1,4	6,2 ± 1,9	6,3 ± 1,9	6,3 ± 1,9
salina ASM + moxonidina NPBL		7,4 ± 2,4	13,1 ± 5,9	14,5 ± 6,6	17,2 ± 7,4*
atropina ASM + moxonidina NPBL		3,5 ± 2,3	4,4 ± 2,3	4,5 ± 2,3	4,6 ± 2,3†
losartan ASM + moxonidina NPBL		5,1 ± 2,9	6,0 ± 3,1	6,2 ± 3,2	6,3 ± 3,2†

	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
salina ASM + veículo NPBL	0,3 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4
salina ASM + moxonidina NPBL	12,4 ± 5,7*	18,7 ± 5,5*	20,1 ± 5,5*	23,4 ± 5,4*
atropina ASM + moxonidina NPBL	2,4 ± 1,5†	4,4 ± 1,9†	4,4 ± 1,9†	4,4 ± 1,9†
losartan ASM + moxonidina NPBL	3,9 ± 2,6†	3,9 ± 2,6†	4,2 ± 2,5†	4,2 ± 2,5†

Valores são representados como média ± EPM; * Diferente de salina ASM + veículo no NPBL; † Diferente de salina ASM + moxonidina no NPBL; n = número de animais. Atropina (2 nmol/0,1 µl); losartan (1 µg/0,1 µl); moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl).

Tabela 2 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no III-V.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 6	30 min	60 min	90 min	120 min
salina III-V + veículo NPBL		5,3 ± 1,0	6,2 ± 1,2	6,5 ± 1,3	6,8 ± 1,2
salina III-V + moxonidina NPBL		4,5 ± 1,2	9,8 ± 2,5	13,5 ± 3,7*	14,5 ± 3,6*
atropina III-V + moxonidina NPBL		6,7 ± 0,8	13,1 ± 1,1*	15,0 ± 1,8*	15,0 ± 1,8*
losartan III-V + moxonidina NPBL		3,8 ± 1,1	14,3 ± 3,6*	17,5 ± 2,8*	17,5 ± 2,8*
		Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
		30 min	60 min	90 min	120 min
salina III-V + veículo NPBL		0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3
salina III-V + moxonidina NPBL		5,1 ± 1,2	13,2 ± 2,2*	19,9 ± 2,1*	19,9 ± 2,1*
atropina III-V + moxonidina NPBL		7,7 ± 1,7*	16,0 ± 2,2*	20,1 ± 1,7*	20,1 ± 1,7*
losartan III-V + moxonidina NPBL		8,4 ± 2,8*	17,8 ± 3,8*	20,7 ± 3,4*	20,6 ± 3,5*

Valores são representados como média ± EPM; * Diferente de salina III-V + veículo no NPBL; n = número de animais. Atropina (2 nmol/0,1 µl); losartan (1 µg/0,1 µl); moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl).

Tabela 3 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no tecido adjacente ao OSF.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 4	30 min	60 min	90 min	120 min
salina tecido + veículo NPBL		5,6 ± 0,6	6,8 ± 0,9	7,1 ± 0,9	7,1 ± 0,9
salina tecido + moxonidina NPBL		5,4 ± 1,4	11,7 ± 1,9	16,4 ± 2,4*	16,4 ± 2,4*
atropina tecido + moxonidina NPBL		6,1 ± 0,8	9,6 ± 1,2	12,7 ± 0,4*	16,4 ± 2,2*
losartan tecido + moxonidina NPBL		6,0 ± 0,9	10,3 ± 3,1	14,5 ± 3,6*	16,6 ± 3,1*

Tratamento	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)				
	n = 4	30 min	60 min	90 min	120 min
salina tecido + veículo NPBL		0,8 ± 0,6	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,6
salina tecido + moxonidina NPBL		12,1 ± 3,9*	21,8 ± 2,2*	23,1 ± 1,7*	23,2 ± 1,8*
atropina tecido + moxonidina NPBL		11,4 ± 4,6*	19,7 ± 3,2*	20,4 ± 2,9*	20,6 ± 3,1*
losartan tecido + moxonidina NPBL		7,9 ± 3,1*	16,2 ± 4,3*	22,2 ± 1,5*	22,6 ± 1,6*

Valores são representados como média ± EPM; * Diferente de salina tecido + veículo no NPBL; n = número de animais. Atropina (2 nmol/0,1 µl); losartan (1 µg/0,1 µl); moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl).

4.9. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol no OSF que receberam injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou ZD 7155 no OSF.

4.9.1. Efeito de injeções corretamente posicionadas no OSF e NPBL.

A injeção de carbacol (0,5 nmol/0,1 µl) no OSF de ratos normohidratados que receberam injeções de veículo no NPBL induziu ingestão de água ($7,4 \pm 1,2$ ml/2 h) e uma pequena ingestão de NaCl 0,3 M ($1,7 \pm 0,5$ ml/2 h). Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de água ($14,0 \pm 2,2$ ml/2 h) [F(3,36) = 26,75; P < 0,05] e NaCl 0,3 M ($20,9 \pm 4,9$ ml/2 h) [F(3,36) = 19,49; P < 0,05] em animais tratados com injeção de carbacol no OSF. O pré-tratamento com injeções de atropina (2 nmol/0,1 µl) ou ZD 7155 (1 µg/0,1 µl) no OSF aboliu a ingestão de água ($0,4 \pm 0,2$ ml/2 h e $1,3 \pm 1,0$ ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M ($1,7 \pm 0,5$ ml/2 h e $2,1 \pm 0,6$ ml/2 h, respectivamente) de ratos tratados com injeção de carbacol no OSF que receberam injeções de moxonidina no NPBL (Figura 11).

4.9.2. Efeito de injeções posicionadas na ASM e NPBL.

Em alguns animais, a cânula direcionada ao OSF atingiu a ASM e, portanto, esses animais receberam injeções de carbacol, atropina e losartan na ASM combinadas com injeções de moxonidina no NPBL. Nesses animais, a injeção de carbacol (0,5 nmol/0,1 µl) na ASM combinada com injeções de veículo no NPBL induziu ingestão de água ($9,0 \pm 0,6$ ml/2 h) e uma pequena ingestão de NaCl 0,3 M ($1,8 \pm 0,5$ ml/2 h). Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de água ($26,1 \pm 8,1$ ml/2 h) [F(3,6) = 15,11; P < 0,05] e NaCl 0,3 M ($32,1 \pm 10,4$ ml/2 h) [F(3,6) = 8,05; P < 0,05] em animais tratados com injeção de carbacol na ASM. O pré-tratamento com injeção de atropina (2 nmol/0,1 µl) ou ZD 7155 (1 µg/0,1 µl) na ASM aboliu a ingestão de água ($0,4 \pm 0,2$ ml/2 h e $0,2 \pm 0,1$ ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M ($1,5 \pm 1,1$ ml/2 h e $5,5 \pm 4,6$ ml/2 h, respectivamente) de ratos tratados com injeção de carbacol na ASM que receberam injeções de moxonidina no NPBL (Tabela 4)

4.9.3. Efeito de injeções corretamente posicionadas no NPBL, mas fora do OSF ou da ASM.

A especificidade do OSF e da ASM como local de ação das injeções de carbacol, atropina ou losartan foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos tratados com injeções de carbacol e atropina ou losartan no tecido adjacente ao OSF que receberam injeções de moxonidina no NPBL. A injeção de carbacol (0,5 nmol/0,1 µl) no tecido

adjacente ao OSF combinada com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL não induziu ingestão de água ($3,4 \pm 0,6$ ml/2 h, vs. veículo NPBL: $2,8 \pm 0,7$ ml/2 h) [F(3,12) = 2,05; P > 0,05] e NaCl 0,3 M ($3,1 \pm 0,3$ ml/2 h, vs. veículo NPBL: $1,4 \pm 0,5$ ml/2 h) [F(3,12) = 2,76; P > 0,05]. Injeções de atropina (2 nmol/0,1 μ l) ou ZD 7155 (1 μ g/0,1 μ l) no tecido adjacente ao OSF também não alteraram a ingestão de água ($1,6 \pm 0,6$ ml/2 h e $2,9 \pm 0,9$ ml/2 h, respectivamente) e NaCl 0,3 M ($0,8 \pm 0,4$ ml/2 h e $3,3 \pm 1,2$ ml/2 h, respectivamente) (Tabela 5).

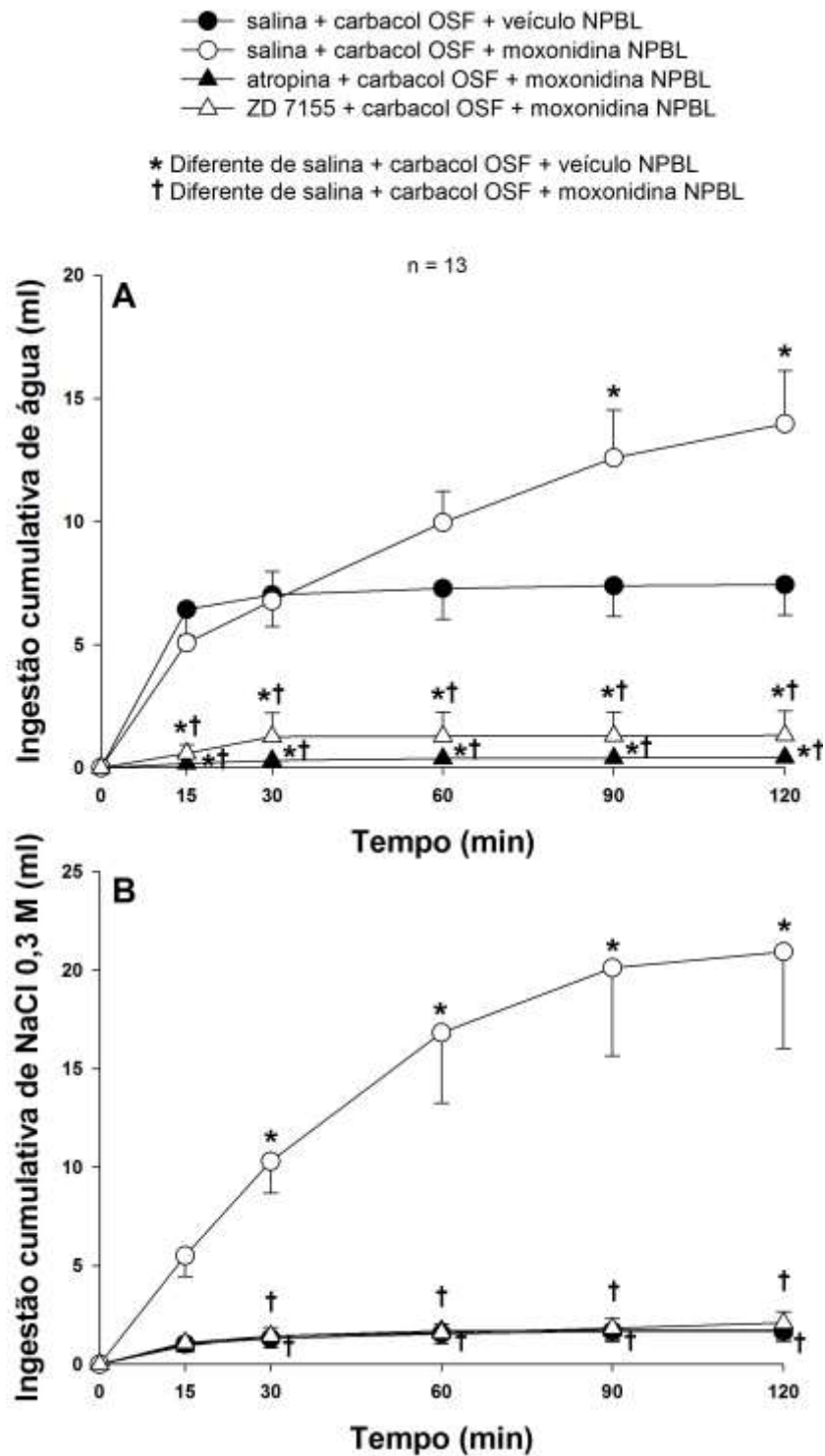


Figura 11 - Ingestão cumulativa de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol (0,5 nmol/0,1 µl) no OSF que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina (2 nmol/0,1 µl) ou ZD 7155 (1 µg/0,1 µl) no OSF. Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais.

Tabela 4 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol na ASM que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou ZD 7155 na ASM.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 3	30 min	60 min	90 min	120 min
salina + carb ASM + veículo NPBL		8,8 ± 0,7	8,9 ± 0,7	8,9 ± 0,7	9,0 ± 0,6
salina + carb ASM + moxo NPBL		11,3 ± 4,9	15,0 ± 3,6	21,8 ± 5,9*	26,1 ± 8,1*
atrop + carb ASM + moxo NPBL		0,2 ± 0,1†	0,4 ± 0,2†	0,4 ± 0,2†	0,4 ± 0,2†
ZD + carb ASM + moxo NPBL		0,2 ± 0,1†	0,2 ± 0,1†	0,2 ± 0,1†	0,2 ± 0,1†
		Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
		30 min	60 min	90 min	120 min
salina + carb ASM + veículo NPBL		1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,5
salina + carb ASM + moxo NPBL		9,4 ± 4,4	23,2 ± 7,7*	29,8 ± 9,0*	32,1 ± 10,4*
atrop + carb ASM + moxo NPBL		1,0 ± 1,0	1,3 ± 1,2†	1,5 ± 1,1†	1,5 ± 1,1†
ZD + carb ASM + moxo NPBL		1,5 ± 1,4	4,8 ± 4,2†	5,5 ± 4,6†	5,5 ± 4,6†

Valores são representados como média ± EPM; * Diferente de salina + carbacol ASM + veículo no NPBL; † Diferente de salina + carbacol ASM + moxonidina no NPBL; n = número de animais. Atrop, atropina (2 nmol/0,1 µl); carb, carbacol (0,5 nmol/0,1 µl); moxo, moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl); ZD, ZD 7155 (1 µg/0,1 µl).

Tabela 5 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol no tecido adjacente ao OSF que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou ZD 7155 no tecido adjacente ao OSF.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 5	30 min	60 min	90 min	120 min
salina + carb tecido + veículo NPBL		2,7 ± 0,7	2,7 ± 0,7	2,8 ± 0,7	2,8 ± 0,7
salina + carb tecido + moxo NPBL		3,1 ± 0,7	3,3 ± 0,7	3,3 ± 0,7	3,4 ± 0,6
atrop + carb tecido + moxo NPBL		0,9 ± 0,4	1,5 ± 0,6	1,5 ± 0,6	1,6 ± 0,6
ZD + carb tecido + moxo NPBL		2,7 ± 1,0	2,7 ± 1,0	2,8 ± 0,9	2,9 ± 0,9

	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
salina + carb tecido + veículo NPBL	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,5
salina + carb tecido + moxo NPBL	2,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3
atrop + carb tecido + moxo NPBL	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,4
ZD + carb tecido + moxo NPBL	2,1 ± 1,2	2,7 ± 1,1	3,2 ± 1,3	3,3 ± 1,2

Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais. Atrop, atropina (2 nmol/0,1 µl); carb, carbacol (0,5 nmol/0,1 µl); moxo, moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl); ZD, ZD 7155 (1 µg/0,1 µl).

4.10. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL após diferentes pré-tratamentos.

Para confirmar a especificidade do NPBL como o local no qual as injeções de moxonidina produzem efeitos na ingestão de água e NaCl 0,3 M, foram analisados os resultados de animais nos quais as injeções foram posicionadas fora do NPBL. Os resultados analisados foram os de animais que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção de salina ou droga no VL.

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) em tecido adjacente ao NPBL de ratos tratados com NaCl 2 M ig não modificaram a ingestão de água ($8,1 \pm 0,7$ ml/2 h, vs. veículo: $6,2 \pm 0,9$ ml/2 h) [$F(3,27) = 16,16$; $P < 0,05$] e NaCl 0,3 M ($1,8 \pm 0,7$ ml/2 h, vs. veículo: $0,3 \pm 0,1$ ml/2 h) [$F(3,27) = 1,51$; $P > 0,05$]. Nesses animais, o pré-tratamento com injeção de atropina (20 nmol/1,0 µl) ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL reduziu a ingestão de água ($3,4 \pm 1,4$ ml/2 h e $1,3 \pm 0,7$ ml/2 h, respectivamente), mas não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M ($1,5 \pm 1,0$ ml/2 h e $0,5 \pm 0,2$ ml/2 h, respectivamente) induzida por hiperosmolaridade combinada com moxonidina injetada no tecido adjacente ao NPBL (Tabela 6).

Em ratos normohidratados que receberam injeção de carbachol (4 nmol/1,0 µl) no VL, as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no tecido adjacente ao NPBL não alteraram a ingestão de água ($7,1 \pm 2,8$ ml/2 h, vs. veículo: $6,2 \pm 1,9$ ml/2 h) [$F(3,12) = 4,35$; $P < 0,05$] e NaCl 0,3 M ($2,4 \pm 0,9$ ml/2 h, vs. veículo: $1,3 \pm 0,7$ ml/2 h) [$F(3,12) = 1,80$; $P > 0,05$]. O pré-tratamento com injeção de atropina (20 nmol/1,0 µl) ou losartan (100 µg/1,0 µl) no VL aboliu a ingestão de água ($1,1 \pm 0,7$ ml/2 h e $0,1 \pm 0,1$ ml/2 h, respectivamente), sem alterar a ingestão de NaCl 0,3 M ($1,0 \pm 0,5$ ml/2 h e $0,9 \pm 0,4$ ml/2 h, respectivamente) de ratos tratados com injeção de carbachol no VL que receberam injeções de moxonidina no tecido adjacente ao NPBL (Tabela 7).

Tabela 6 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no VL.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 10	30 min	60 min	90 min	120 min
salina VL + veículo fora do NPBL		5,5 ± 0,9	5,9 ± 0,8	6,2 ± 0,9	6,2 ± 0,9
salina VL + moxo fora do NPBL		7,3 ± 0,7	8,0 ± 0,7	8,1 ± 0,7	8,1 ± 0,7
atropina VL + moxo fora do NPBL		1,4 ± 0,8*	2,1 ± 1,0*	2,5 ± 1,0*	3,4 ± 1,4*
losartan VL + moxo fora do NPBL		1,2 ± 0,7*	1,3 ± 0,7*	1,3 ± 0,7*	1,3 ± 0,7*

Tratamento	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)				
	n = 10	30 min	60 min	90 min	120 min
salina VL + veículo fora do NPBL		0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
salina VL + moxo fora do NPBL		1,7 ± 0,7	1,8 ± 0,7	1,8 ± 0,7	1,8 ± 0,7
atropina VL + moxo fora do NPBL		0,8 ± 0,8	0,9 ± 0,9	1,5 ± 1,0	1,5 ± 1,0
losartan VL + moxo fora do NPBL		0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2

Valores são representados como média ± EPM; * Diferente de salina VL + veículo fora do NPBL e salina VL + moxonidina fora do NPBL; n = número de animais. Atropina (2 nmol/0,1 µl); losartan (1 µg/0,1 µl); moxo, moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl).

Tabela 7 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeção de carbacol no VL que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção de salina, atropina ou losartan no VL.

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	n = 5	30 min	60 min	90 min	120 min
sal + carb VL + veículo fora do NPBL		5,7 ± 2,1	6,2 ± 1,9	6,2 ± 1,9	6,2 ± 1,9
sal + carb VL + moxo fora do NPBL		6,6 ± 2,8	7,1 ± 2,8	7,1 ± 2,8	7,1 ± 2,8
atrop + carb VL + moxo fora do NPBL		1,0 ± 0,7	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,7*	1,1 ± 0,7*
los + carb VL + moxo fora do NPBL		0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1*	0,1 ± 0,1*	0,1 ± 0,1*

	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)				
		30 min	60 min	90 min	120 min
sal + carb VL + veículo fora do NPBL		1,2 ± 0,7	1,3 ± 0,7	1,3 ± 0,7	1,3 ± 0,7
sal + carb VL + moxo fora do NPBL		2,1 ± 0,8	2,4 ± 0,9	2,4 ± 0,9	2,4 ± 0,9
atrop + carb VL + moxo fora do NPBL		0,7 ± 0,5	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,5
los + carb VL + moxo fora do NPBL		0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,9 ± 0,4

Valores são representados como média ± EPM; * Diferente de salina + carbacol VL + veículo fora do NPBL e salina + carbacol VL + moxonidina fora do NPBL; n = número de animais. Atrop, atropina (20 nmol/1,0 µl); carb, carbacol (4 nmol/1,0 µl); los, losartan (100 µg/1,0 µl); moxo, moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl); sal, salina.

4.11. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com LCEa hiperosmótico.

A aplicação aguda de LCEa com osmolalidades de 308, 313 e 321 mOsm/kg preparado com a adição de NaCl aumentou a intensidade de fluorescência do Fluo-4 em células sensíveis do OSF ($22,1 \pm 1,2\%$, $25,4 \pm 1,9\%$ e $28,5 \pm 4,0\%$, respectivamente). De maneira semelhante, quando manitol foi utilizado como soluto para preparar o LCEa com osmolalidades de 308, 313 e 321 mOsm/kg, a intensidade de fluorescência do Fluo-4 observada após a aplicação dessas soluções também foi aumentada em células sensíveis do OSF ($20,5 \pm 1,1\%$, $30,0 \pm 5,4\%$ e $24,6 \pm 2,2\%$, respectivamente) [$F(6,265) = 24,09$; $P < 0,05$] (Figura 12). Porcentagens significantes de células do OSF foram sensíveis à aplicação de LCEa hiperosmótico, não havendo diferença entre as porcentagens de células sensíveis às soluções testadas (Tabela 8).

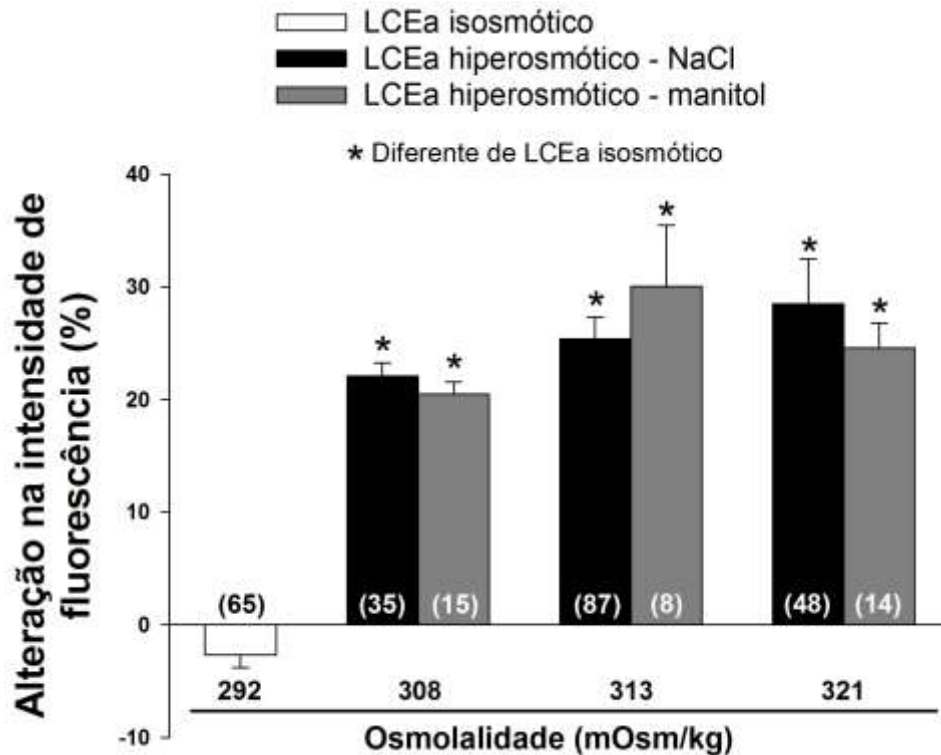


Figura 12 – Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de LCEa com diferentes osmolalidades (308, 313 e 321 mOsm/kg). Os solutos utilizados para aumentar a osmolalidade do LCEa foram NaCl (barra preta) e manitol (barra cinza). Valores são representados como média \pm EPM; número de células representado entre parênteses.

Tabela 8 – Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de LCEa com diferentes osmolalidades.

Osmolalidade do LCEa (mOsm/kg)	Soluto	%	n
308 mOsm/kg	NaCl	46,1	35
	Manitol	34,9	15
313 mOsm/kg	NaCl	46,7	87
	Manitol	47,0	8
321 mOsm/kg	NaCl	40,3	48
	Manitol	45,2	14

Valores são representados como porcentagem do número total de células testadas. n = número de células.

4.12. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e LCEa hiperosmótico.

A aplicação aguda de ANG II 0,1 μ M ou LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg) aumentou a intensidade de fluorescência do Fluo-4 em células sensíveis do OSF em $33,9 \pm 2,5\%$ e $24,6 \pm 1,3\%$, respectivamente [$F(2,336) = 91,23$; $P < 0,05$] (Figura 13). Porcentagens significantes de células do OSF foram sensíveis apenas a ANG II (20,0%), LCEa hiperosmótico (24,2%) ou ambos os estímulos (15,8%) (Tabela 9).

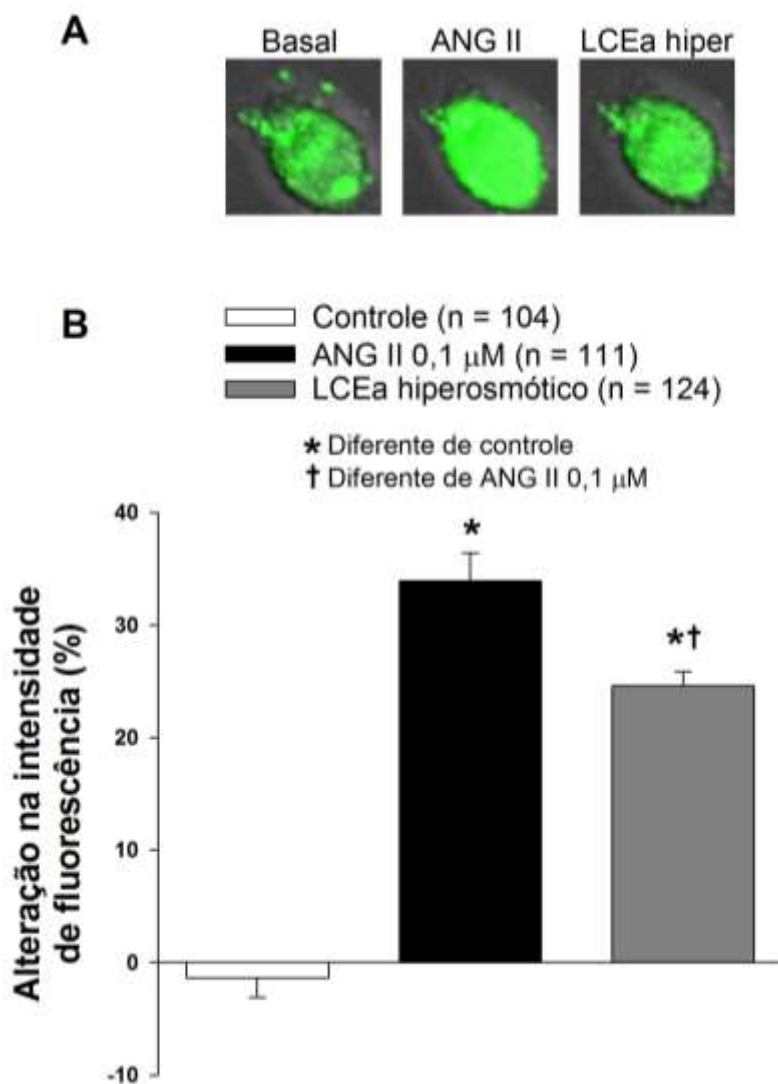


Figura 13 – (A) Imagem representativa de uma célula do OSF mostrando a intensidade de fluorescência do Fluo-4 durante o período basal (esquerda) e após aplicação de ANG II (meio) ou LCEa hiperosmótico (LCEa hiper; direita). (B) Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de ANG II 0,1 μ M ou LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg). Valores são representados como média \pm EPM; n = número de células.

Tabela 9 - Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de ANG II e/ou LCEa hiperosmótico.

Estímulo	%	n
Apenas ANG II	20,0	62
Apenas LCEa hiperosmótico	24,2	75
Ambos	15,8	49
Nenhum	40,0	124

Valores são representados como porcentagem do número total de células testadas. ANG II (0,1 μ M); LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg); n = número de células.

4.13. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com carbacol e LCEa hiperosmótico.

A aplicação aguda de carbacol 100 μ M ou LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg) aumentou a intensidade de fluorescência do Fluo-4 em células sensíveis do OSF em $19,5 \pm 2,1\%$ e $24,1 \pm 0,7\%$, respectivamente [$F(2,333) = 232,97$; $P < 0,05$] (Figura 14). Porcentagem significativa de células do OSF foi sensível apenas ao LCEa hiperosmótico (39,3%). Apenas uma pequena porcentagem das células do OSF foi sensível apenas ao carbacol (3,1%) ou ao carbacol e LCEa hiperosmótico (6,7%) (Tabela 10).

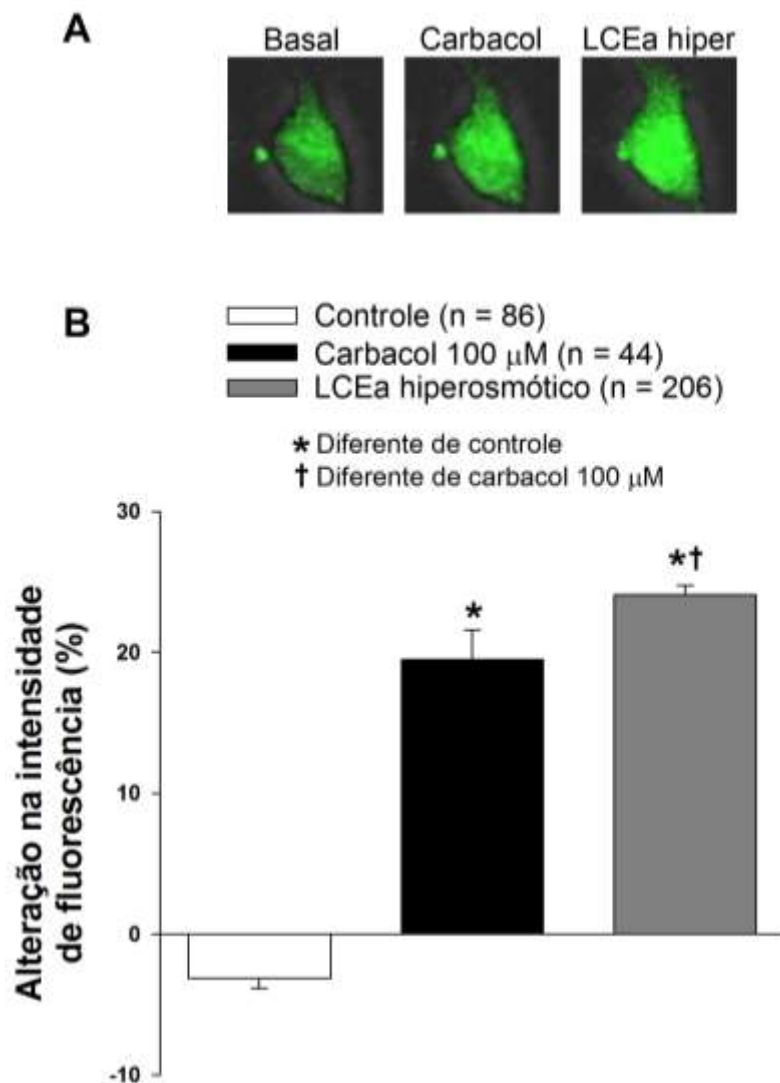


Figura 14 – (A) Imagem representativa de uma célula do OSF mostrando a intensidade de fluorescência do Fluo-4 durante o período basal (esquerda) e após aplicação de carbacol (meio) ou LCEa hiperosmótico (LCEa hiper; direita). (B) Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de carbacol 100 μM ou LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg). Valores são representados como média ± EPM; n = número de células.

Tabela 10 – Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de carbacol e/ou LCEa hiperosmótico.

Estímulo	%	n
Apenas carbacol	3,1	14
Apenas LCEa hiperosmótico	39,3	176
Ambos	6,7	30
Nenhum	50,9	228

Valores são representados como porcentagem do número total de células testadas. Carbacol (100μM); LCEa hiperosmótico (308 mOsm/kg); n = número de células.

4.14. Alteração na $[Ca^{2+}]_i$ em células do OSF tratadas com ANG II e carbacol.

A aplicação aguda de ANG II 0,1 μ M ou carbacol 100 μ M aumentou a intensidade de fluorescência do Fluo-4 em células sensíveis do OSF em $44,8 \pm 2,5\%$ e $19,0 \pm 3,4\%$, respectivamente [$F(2,280) = 427,63$; $P < 0,05$] (Figura 15). Porcentagem significativa de células do OSF foi sensível apenas a ANG II (24,9%). Apenas uma pequena porcentagem das células do OSF foi sensível apenas ao carbacol (2,6%) ou ao carbacol e ANG II (2,3%) (Tabela 11).

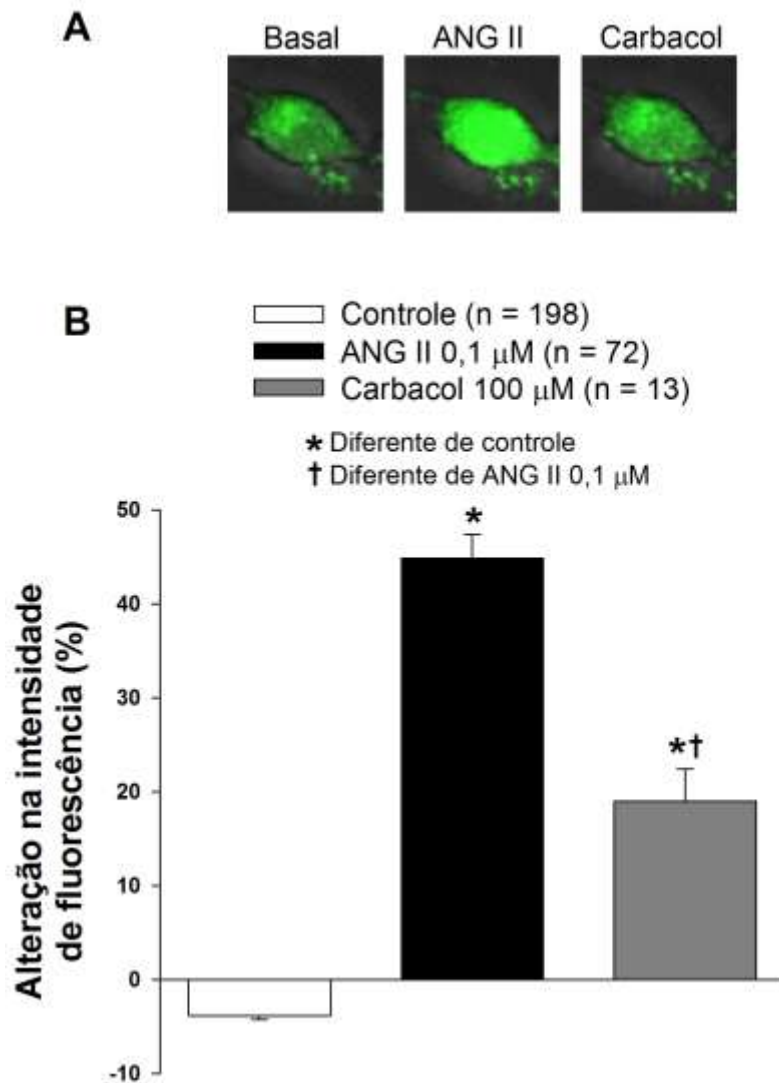


Figura 15 – (A) Imagem representativa de uma célula do OSF mostrando a intensidade de fluorescência do Fluo-4 durante o período basal (esquerda) e após aplicação de ANG II (meio) ou carbacol (direita). (B) Alteração na intensidade de fluorescência induzida pela aplicação aguda de ANG II 0,1 μ M ou carbacol 100 μ M. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de células.

Tabela 11 – Porcentagem de células do OSF sensíveis à aplicação aguda de ANG II e/ou carbacol

Estímulo	%	n
Apenas ANG II	24,9	66
Apenas carbacol	2,6	7
Ambos	2,3	6
Nenhum	70,2	186

Valores são representados como porcentagem do número total de células testadas. ANG II (0,1 μ M); carbacol (100 μ M); n = número de células.

5. DISCUSSÃO

Semelhante a estudos prévios, os presentes resultados mostram que o bloqueio do mecanismo inibitório do NPBL com injeções bilaterais de moxonidina nessa área aumenta a ingestão de água e NaCl em ratos tratados com NaCl 2 M ig¹⁷¹. Os resultados também mostram que essa resposta é abolida por injeções de atropina ou losartan no VL ou OSF, sugerindo que a ingestão de água e NaCl induzida por hiperosmolaridade combinada com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL depende da ativação de receptores colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos. O presente estudo ainda confirma que o tratamento subcutâneo com FURO + CAP ou injeções icv de carbacol e ANG II também induzem ingestão de NaCl quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão desativados^{132,173}, além de mostrar pela primeira vez que a injeção de carbacol diretamente no OSF também induz ingestão de NaCl, em adição à ingestão de água, quando moxonidina é injetada no NPBL. Os resultados ainda sugerem o envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos prosencefálicos nas respostas induzidas por ativação colinérgica, visto que a ingestão de água e NaCl induzida por injeções de carbacol no VL ou no OSF combinadas com injeções de moxonidina no NPBL é abolida por injeções de atropina, losartan ou ZD 7155 no VL ou OSF. Por outro lado, injeções de atropina no VL não alteram a ingestão de água e NaCl induzida por FURO + CAP ou injeções icv de ANG II combinados com moxonidina injetada no NPBL, sugerindo que os mecanismos colinérgicos centrais não estão envolvidos na ingestão de água e NaCl induzida por ativação de mecanismos angiotensinérgicos combinada com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL, mas o contrário é verdadeiro, isto é, a ingestão de água e NaCl induzida por ativação de mecanismos colinérgicos combinada com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL depende de mecanismos angiotensinérgicos. O presente estudo também mostra que as respostas observadas após o bloqueio dos receptores angiotensinérgicos não parecem ser decorrentes de ações inespecíficas, visto que injeções de losartan no VL, embora reduzam a ingestão de sacarose 0,06 M, não alteram a ingestão de ração induzida por privação alimentar por 24 h. Finalmente, os estudos *in vitro* mostram que estímulos osmóticos, angiotensinérgico e colinérgico ativam as células dissociadas do OSF e que diferentes estímulos podem ativar uma mesma célula do OSF. Assim, considerando que: 1) a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos tratados com NaCl 2 M ig combinado com moxonidina no NPBL depende dos mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos centrais; 2) a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos tratados com carbacol centralmente combinado com moxonidina no NPBL depende dos mecanismos angiotensinérgicos centrais; 3) a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos tratados com ANG II centralmente combinado com moxonidina no NPBL só é abolida pelo

tratamento com losartan centralmente, pode-se sugerir que os mecanismos angiotensinérgicos poderiam ser a via final ativada por estes diferentes estímulos para facilitar a ingestão de NaCl.

A especificidade do NPBL como local em que injeções de moxonidina induzem ingestão de água e NaCl foi confirmada por resultados de animais que receberam injeções bilaterais de moxonidina em tecidos adjacentes ao NPBL, nos quais injeções de moxonidina não modificaram a ingestão de água e NaCl induzida por hiperosmolaridade ou injeções de carbacol no VL. Estudos prévios também já mostraram que injeções de moxonidina em tecidos adjacentes ao NPBL também não alteram a ingestão de NaCl induzida por FURO + CAP ou a natriurese e secreção de OT induzida por aumento da osmolaridade plasmática^{7,127}. Assim sendo, a facilitação da ingestão de NaCl e redução da natriurese e secreção de OT em ratos tratados com NaCl 2 M ig é resultado da ativação dos receptores adrenérgicos α_2 por injeções de moxonidina especificamente no NPBL. O presente estudo e estudos anteriores mostram que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL com injeções de moxonidina ou noradrenalina no NPBL aumentam a ingestão de NaCl induzida por hiperosmolaridade ou FURO + CAP^{127,171,192-194}. No entanto, injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não alteram a ingestão de água e NaCl em ratos normohidratados¹²⁷. Portanto, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL aumenta a ingestão de NaCl quando os mecanismos facilitatórios são simultaneamente ativados, enquanto que apenas a desativação dos mecanismos inibitórios pela ativação dos receptores adrenérgicos α_2 em ratos normohidratados não produz efeito algum sobre a ingestão de NaCl.

A facilitação da ingestão de NaCl observada após a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL contrasta com os efeitos inibitórios induzidos pela ativação dos receptores adrenérgicos α_2 prosencefálicos. A injeção de agonistas adrenérgicos α_2 no VL, III-V, ASM, área pré-óptica lateral e HL reduz a ingestão de água e NaCl induzida por diferentes estímulos dipsogênicos e/ou natriorexigênicos^{109,112,114,119-121,123,124,126}. Portanto, os mecanismos adrenérgicos α_2 no prosencéfalo e no NPBL produzem efeitos opostos sobre a ingestão de água e NaCl. O efeito facilitatório da ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL sobre a ingestão de NaCl não é causado por uma facilitação inespecífica dos comportamentos ingestivos porque a ingestão de ração induzida por privação alimentar por 24 horas ou a ingestão de solução de sacarose 0,06 M não foram afetadas por injeções de moxonidina no NPBL^{127,191}.

O aumento da osmolaridade plasmática é um potente estímulo para a ingestão de água e mesmo uma pequena alteração de 1 a 2% na osmolaridade plasmática já é suficiente

para iniciar respostas neuroendócrinas e comportamentais. Segundo a teoria osmométrica da sede, a quantidade de água ingerida por humanos ou cães pode ser prevista em função do aumento na osmolaridade plasmática¹⁹⁵. Além de sede, a hiperosmolaridade também reduz a excreção urinária de água por meio de um aumento na secreção de vasopressina, inibe a ingestão adicional de solução hipertônica de NaCl e induz a excreção urinária de sódio, um efeito mediado pela OT⁶⁻¹⁴. No presente estudo, a sobrecarga intragástrica com 2 ml de NaCl 2 M foi utilizada para aumentar a osmolaridade plasmática. Esse protocolo induz um aumento de 4 a 5% na concentração sérica de sódio e na osmolaridade plasmática, sem alterar a concentração sérica de proteína, ou seja, sem alterar o volume plasmático⁶.

A sobrecarga intragástrica de soluções hipertônicas em concentrações que aumentam a osmolaridade na circulação porta hepática, mas sem alterar a osmolaridade sistêmica, induz ingestão de água e aumenta a secreção de vasopressina e a expressão da proteína Fos no NPV, NSO, NTS, AP e NPBL^{22,27,28,196}. Essas respostas parecem ser mediadas pelos osmorreceptores periféricos que enviam informações para o encéfalo através do nervo vago^{27,28}. Quando a sobrecarga intragástrica é mais pronunciada e a osmolaridade sistêmica é elevada, os osmorreceptores centrais presentes nos OCVs também são ativados, induzindo respostas comportamentais e neuroendócrinas. Diversos estudos já mostraram que a sobrecarga intragástrica de soluções hipertônicas de NaCl induz sede e aumento na secreção de vasopressina e OT^{6,7,171,172,197,198}. As respostas induzidas pelo aumento da osmolaridade sistêmica são reduzidas ou até mesmo abolidas pela lesão de órgãos circumventriculares^{197,199-204}. Estudando-se a expressão da proteína Fos verificou-se que um pequeno aumento na osmolaridade plasmática induz expressão da proteína Fos no NSO e no NPV, sem aumentar a expressão de Fos no OSF, enquanto que um grande aumento na osmolaridade plasmática, além de ativar o NSO e o NPV, também induz a expressão da proteína Fos no OSF^{205,206}. Dessa forma, a importância do OSF para as respostas induzidas por hiperosmolaridade foi colocada em dúvida. No entanto, estudos subsequentes mostraram que a desconexão do OSF por meio de um corte no nível da comissura anterior reduz a ingestão de água e a expressão da proteína Fos no NSO e no NPV induzida por hiperosmolaridade moderada ou intensa^{198,203}. Além disso, a injeção do anestésico lidocaína no OSF reduz a resposta excitatória de células do NPV induzida por infusão intracarotídea de solução hipertônica²⁰⁴. Esses resultados sugerem a importância do OSF para a ativação das áreas hipotalâmicas durante a hiperosmolaridade.

Estudos eletrofisiológicos revelaram a existência de células osmossensíveis no OSF ao demonstrar que soluções hiperosmóticas despolarizam e aumentam a frequência de

disparo de células do OSF isoladas ou em fragmentos de tecido³²⁻³⁴. O presente estudo também contribui com essas evidências ao mostrar que a aplicação aguda de estímulos osmóticos causa influxo de cálcio nas células do OSF, representado pelo aumento na intensidade de fluorescência do Fluo-4. As soluções de LCEa com osmolalidades de 308, 313 e 321 mOsm/kg utilizadas no presente estudo correspondem, respectivamente, a aumentos de 5, 7,5 e 10% na osmolaridade basal ($290,8 \pm 1,2$ mOsm/kg)²⁰⁷. Em ratos, a privação hídrica ou a ingestão de ração seca induzida por privação alimentar por 24 horas induzem um aumento de aproximadamente 2,5% na osmolaridade plasmática^{207,208}. A habilidade intrínseca de detectar alterações na osmolaridade dos neurônios do OSF reforça a ideia de que essa região tem um papel importante na osmorregulação. Estudos em mamíferos também mostraram a presença de neurônios osmossensíveis no OVLT. A lesão do OVLT sozinha ou combinada com lesão do OSF reduz a ingestão de água induzida por infusão endovenosa de NaCl hipertônico^{202,209,210}. Ainda, a hiperosmolaridade também aumenta a expressão da proteína Fos²¹¹ e a frequência de disparo^{35,212} de neurônios do OVLT. O aumento na frequência de disparo de neurônios do OVLT é mantido mesmo após o bloqueio sináptico³⁵ ou a dissociação das células²¹², reforçando a hipótese de que as células do OVLT são osmossensíveis. Em humanos, a análise de imagens obtidas por ressonância magnética funcional de pacientes com osmolaridade plasmática aumentada por infusão endovenosa de NaCl hipertônico mostrou que a hiperosmolaridade aumenta o fluxo sanguíneo na lâmina terminal, um indicativo de ativação neuronal nessa região²¹³.

A vasopressina e a OT são sintetizadas por células magnocelulares do NSO e NPV^{214,215}. A frequência de disparo das células magnocelulares varia em função da osmolaridade de maneira diretamente proporcional^{216,217}. Estudos anatômicos já mostraram projeções anatômicas do OSF e OVLT para o NPV e NSO^{68,218,219}. A ativação dos neurônios do OSF aumenta a excitabilidade de células, provavelmente células magnocelulares, no NPV e NSO²²⁰⁻²²³. Além disso, a osmossensibilidade intrínseca das células magnocelulares do NSO também já foi descrita²²⁴. Embora o NSO não seja livre de barreira hematoencefálica, a densidade de capilares que irrigam o NSO é quatro vezes maior do que a de outros núcleos hipotalâmicos²²⁵. Ainda, o diâmetro dos capilares no NSO é significativamente menor do que em outras áreas. Essa combinação de grande densidade de capilares e o diâmetro reduzido desses capilares facilita o fluxo de água através do endotélio capilar, possibilitando que a osmolaridade sistêmica influencie o volume das células do NSO²²⁵. Dessa forma, além de ativar os osmorreceptores localizados nos órgãos circumventriculares, ainda é possível que o aumento na osmolaridade plasmática induza secreção de vasopressina e OT por ação direta

nas células magnocelulares do NSO. No entanto, a resposta global dos neurônios magnocelulares frente a alterações na osmolaridade resulta da integração de todas as informações osmosensoriais, compreendendo a osmossensibilidade intrínseca desses neurônios e as informações provenientes dos osmorreceptores periféricos e centrais²²⁶.

Muito do que se sabe até hoje sobre a atividade dos osmorreceptores é resultado de trabalhos feitos em células magnocelulares. O registro de células magnocelulares em fatias do encéfalo mostrou que o estímulo osmótico aumenta a frequência de disparo dessas células por despolarização do potencial de membrana através da ativação de correntes de cátions não-seletivas^{224,227-229}. Esse aumento na condutância de cátions causado pela hipertonicidade é coincidente com a redução do volume celular^{230,231}. A redução do volume celular causada por sucção do conteúdo celular para o interior da pipeta de registro de patch-clamp despolariza as células magnocelulares e aumenta a corrente de cátion, enquanto que o aumento do volume celular atenua a condutância basal de cátion e reduz a frequência de disparos causando hiperpolarização nas células magnocelulares^{230,231}.

Os canais de cátion da família dos receptores de potencial transiente vanilóide (TRPV) são os possíveis responsáveis pelo aumento na condutância de cátions durante a hiperosmolaridade. O TRPV4 foi a primeira proteína osmossensível a ser demonstrada²³². Em ratos, o TRPV4 é expresso no OSF, OVLT, NPV e NSO^{232,233}. Camundongos nocaute para TRPV4 (*trpv4*^{-/-}) ingerem menos água e secretam menos vasopressina em situações de hiperosmolaridade em comparação com camundongos selvagens²³⁴. Embora esses dados sugiram um papel do TRPV4 na osmorregulação, existem algumas divergências na literatura. Ciura e colaboradores demonstraram que a despolarização de neurônios do OVLT depende da expressão de TRPV1 e não do TRPV4²³⁵. Camundongos *trpv1*^{-/-} não secretam vasopressina em resposta ao estímulo hiperosmótico²³⁶. Ainda, a alteração no potencial de membrana e aumento na frequência de disparo de células magnocelulares induzida por hiperosmolaridade não são observados em células de camundongos *trpv1*^{-/-}²³⁶. Esses camundongos *trpv1*^{-/-} também tem uma menor ingestão de água em resposta à hiperosmolaridade plasmática comparados com camundongos selvagens²¹². Apesar da divergência entre os dados da literatura, esses resultados sugerem que o gene *trpv* é necessário para as respostas osmorregulatórias.

O OSF, OVLT, NPV e NSO ainda expressam canais de sódio não dependentes de voltagem e sensíveis ao diurético amilorida denominados canais epiteliais de sódio (ENaC)²³⁷. Esses canais também são expressos na membrana de células epiteliais de vários tecidos, tais como bexiga, duto coletor renal, glândulas sudoríparas e salivares, pulmões e

botões gustativos da língua, onde realizam transporte do íon sódio através do epitélio²³⁸⁻²⁴⁰. Miller e colaboradores mostraram que as células dos OCVs que expressão ENaC são ativados pelo aumento da osmolaridade plasmática²⁴¹. O aumento na expressão ou na atividade do ENaC gera um influxo de cálcio nas células e isso eleva o potencial de ação para valores próximos ao limiar do potencial de ação, aumentando a excitabilidade neuronal. Além disso, o ENaC é um importante determinante do potencial de repouso em células magnocelulares do NPV e NSO²⁴². Dessa forma, é possível que a presença e ativação do ENaC altere o padrão de disparo das células, o que em última instância irá modular a secreção de vasopressina e OT pelas células magnocelulares do NPV e NSO e, portanto, é possível que os ENaCs sejam os receptores de sódio responsáveis pela regulação da concentração extracelular de sódio. Os experimentos *in vitro* apresentados no presente estudo mostram que as células dissociadas do OSF são sensíveis ao LCEa hiperosmótico independente do soluto utilizado para aumentar a osmolalidade. Dessa maneira, é possível que as células do OSF sejam sensíveis apenas à osmolalidade da solução ou sensíveis tanto à osmolalidade quanto ao conteúdo de sódio da solução. No entanto, com base nos dados da literatura que mostram a expressão de TRPV e ENaC nas células do OSF, é possível que tanto a osmolalidade quanto o conteúdo de sódio das soluções tenham promovido a ativação das células dissociadas do OSF, promovendo um influxo de cálcio percebido pelo aumento da intensidade de fluorescência do Fluo-4.

Por muito tempo acreditou-se que o aumento da osmolaridade facilitasse apenas ingestão de água, mas não de NaCl^{13,14} que nesta condição estaria apenas sob ação de um mecanismo inibitório. A secreção de OT também aumenta pela hiperosmolaridade, resultando em aumento da excreção urinária de sódio e inibição da ingestão de NaCl^{7,11,12}. Contrariando os conceitos tradicionais, estudos de nosso laboratório mostraram que ratos com osmolaridade plasmática aumentada por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, além de ingerir água, também apresentam intensa ingestão de NaCl 0,3 M quando os mecanismos inibitórios do NPBL são bloqueados por injeções bilaterais de metisergida ou moxonidina^{171,172}. Em concordância com esses estudos prévios, os presentes resultados também mostram que a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, além de induzir ingestão de água, também induz ingestão de NaCl em animais tratados com moxonidina no NPBL. Segundo modelo proposto por De Luca Jr. e colaboradores¹⁷², a hiperosmolaridade ativa mecanismos que induzem a sede e o apetite ao sódio; porém, paralelamente também ativaria os mecanismos inibitórios do NPBL que neutralizariam os efeitos facilitatórios da ingestão de NaCl. Recentemente foi mostrado que o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções de moxonidina nessa área também reduz o aumento na secreção de OT e a natriurese

induzida por hiperosmolaridade⁷. Dessa forma, é possível que a inibição do apetite ao sódio durante condições de hiperosmolaridade seja dependente da ativação de mecanismos ocitocinérgicos centrais por uma via da qual o NPBL faz parte. Quando o NPBL é bloqueado por injeções de metisergida ou moxonidina, o mecanismo ocitocinérgico central deixa de ser ativado, liberando a ingestão de NaCl.

Os mecanismos colinérgicos têm sido relacionados com o controle da ingestão de água^{36-39,49,243,244}. Injeções icv de agonistas colinérgicos induzem uma intensa resposta dipsogênica e a lesão eletrolítica da região AV3V ou do OSF abole a ingestão de água induzida por injeção icv de carbacol³⁷⁻⁴⁰. A importância dos receptores colinérgicos do OSF para a ingestão de água também foi demonstrada pela resposta dipsogênica induzida por injeção de carbacol no VL ou mais especificamente no OSF³⁷. Estudos mais recentes e os presentes resultados sugerem que os mecanismos colinérgicos centrais também estão envolvidos com o controle da ingestão de sódio^{173,176,245}. A ingestão de NaCl induzida por injeções de muscimol no NPBL é reduzida pelo bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos com injeção de atropina no VL ou no OSF^{176,245}. Carbacol injetado no VL, além de induzir ingestão de água, também induz ingestão de NaCl quando metisergida é injetada no NPBL¹⁷³. Os presentes resultados ainda mostram que a injeção de carbacol diretamente no OSF também induz ingestão de NaCl em animais que receberam injeções de moxonidina no NPBL e o pré-tratamento com atropina no OSF bloqueia essa resposta. Além disso, o presente estudo também mostrou que os animais que receberam injeções de carbacol na ASM também ingeriram NaCl após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL e essa resposta foi bloqueada pela injeção de atropina na ASM. A ASM é uma área importante para as respostas induzidas pela ativação colinérgica central e a lesão dessa área reduz as respostas pressora e dipsogênica induzidas por injeção de carbacol no VL⁴². Portanto, os resultados do presente estudo confirmam que os mecanismos colinérgicos centrais além de estarem envolvidos com a ingestão de água, também facilitam a ingestão de NaCl com a participação especificamente de receptores colinérgicos muscarínicos prosencefálicos.

Semelhante ao que foi proposto para a hiperosmolaridade, estudos prévios sugeriram que a infusão icv de carbacol induz ingestão de água, porém inibe a ingestão de NaCl^{244,246}. No entanto, como mostraram os presentes e prévios resultados, a injeção icv de carbacol também induz ingestão de NaCl 0,3 M quando os mecanismos inibitórios são desativados por injeções de metisergida ou moxonidina no NPBL¹⁷³. Além disso, carbacol injetado centralmente induz aumento na pressão arterial, secreção de vasopressina e natriurese^{46-48,50}. Essas respostas também são induzidas por hiperosmolaridade plasmática,

sugerindo que os mecanismos colinérgicos centrais possam participar das respostas induzidas por ativação dos osmorreceptores. A injeção icv de NaCl hiperosmótico aumenta a expressão da proteína Fos no OSF, MnPO, NPV e NSO e o pré-tratamento com injeção icv de atropina reduz essa expressão da proteína Fos no MnPO, NPV e NSO, mas não no OSF¹⁸⁴. Lee e colaboradores também mostraram que a ingestão de água induzida por privação hídrica por 48 horas é reduzida por injeção icv de atropina²⁴⁷. Os presentes resultados mostram que o bloqueio dos receptores colinérgicos com injeções de atropina no VL ou diretamente no OSF reduz a ingestão de água e NaCl em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeção de moxonidina no NPBL, sugerindo que mecanismos colinérgicos centrais e particularmente do OSF estariam envolvidos nestas respostas que dependem da ativação de osmorreceptores.

Em alguns ratos utilizados no presente estudo, as injeções que deveriam ser feitas no OSF, alcançaram na verdade a ASM, o III-V ou o tecido adjacente ao OSF. Quando atropina ou losartan foram injetados no III-V ou no tecido adjacente ao OSF não foram observadas alterações na ingestão de água e NaCl em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções de moxonidina no NPBL. Porém, quando as injeções de atropina ou losartan foram feitas na ASM, foi observado redução da ingestão de água e NaCl em ratos tratados com NaCl 2 M ig que receberam injeções de moxonidina no NPBL. Em concordância com esse resultado, estudos anteriores já haviam mostrado que a natriurese induzida por injeção de NaCl hipertônico no III-V é reduzida pela injeção de atropina na ASM, sugerindo que a ASM possui interação com áreas periventriculares sensíveis a alterações na osmolaridade no LCE, como o OSF, por exemplo²⁴⁸. Estudos também demonstraram que a ASM tem um importante papel nas respostas pressora e natriurética induzidas pela injeção de carbacol no OSF e nas respostas pressora e dipsogênica induzidas pela injeção de ANG II no OSF, uma vez que a lesão da ASM provocou intensa redução dessas respostas²⁴⁹. Dessa forma, estudos prévios sugerem que há uma interação entre os mecanismos da ASM e do OSF e essa interação poderia explicar a redução da ingestão de água e NaCl após injeções de atropina ou losartan tanto no OSF quanto na ASM em ratos tratados com NaCl 2 M ig ou com ativação colinérgica central que receberam injeções de moxonidina no NPBL. Estes resultados ampliam o que se sabia até hoje sobre a interação entre as vias ativadas por hiperosmolaridade e mecanismos colinérgicos ao mostrar que a ingestão de NaCl induzida por hiperosmolaridade combinada com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL é abolida por injeções de atropina no VL, OSF ou ASM, sugerindo que estas respostas induzidas por hiperosmolaridade dependem da ativação de mecanismos colinérgicos prosencefálicos, particularmente da ASM e OSF.

A injeção central de ANG II induz respostas cardiovasculares e comportamentais^{62,63}. A ANG II é um potente estímulo para a ingestão de água, sendo observado um aumento imediato na ingestão de água após injeção de ANG II em diversas áreas encefálicas^{63,67,250-252}. A ativação dos mecanismos angiotensinérgicos centrais também induz um aumento gradativo e lento da ingestão de NaCl^{63,253}. No entanto, quando o mecanismo inibitório do NPBL é bloqueado por injeções de metisergida, a injeção de ANG II no VL induz imediatamente uma intensa ingestão de NaCl 0,3 M¹³². Esses resultados foram confirmados por estudos prévios¹⁶⁰ e pelos presentes resultados que também mostram uma rápida e intensa indução da ingestão de NaCl por injeções de ANG II no VL ou no OSF combinadas com bloqueio dos mecanismos inibitórios com injeções de metisergida ou moxonidina no NPBL. A injeção icv de ANG II induz expressão da proteína Fos no OSF, OVLT e em neurônios magnocelulares do NPV e NSO e após a ingestão de água, a expressão de Fos é reduzida nos neurônios magnocelulares do NPV e NSO²⁵⁴. Portanto, uma possível explicação para a diferença temporal entre a ingestão de água e NaCl é que a ANG II ativa o mecanismo ocitocinérgico, inibindo a ingestão de NaCl. No entanto, a ingestão de água causa diluição dos líquidos corporais, o que inibiria o mecanismo ocitocinérgico, liberando a ingestão de NaCl^{97,99}. Assim como injeções de ANG II, a hiperosmolaridade também aumenta a expressão da proteína Fos no NPV e NSO²⁰ e a secreção de OT⁷. Injeções de moxonidina no NPBL reduzem o aumento na secreção de OT induzida por hiperosmolaridade⁷. Dessa forma, é possível que injeções de moxonidina no NPBL também reduzam a ativação dos mecanismos ocitocinérgicos centrais induzida pela ANG II. Essa hipótese explicaria a rápida e intensa ingestão de NaCl nos animais tratados com ANG II no VL ou OSF quando os mecanismos do NPBL estão bloqueados e futuros estudos poderão testar essa possibilidade.

Os mecanismos angiotensinérgicos também estão envolvidos com as respostas induzidas por hiperosmolaridade^{184,255-261}. A infusão de losartan reduz a ingestão de água induzida por hiperosmolaridade em vacas, ovelhas, coelhos, ratos e camundongos^{260,261}, sugerindo que a sede induzida por hiperosmolaridade parece ser mediada por ANG II. O bloqueio de receptores AT₁ também reduz a natriurese, hipertensão e secreção de vasopressina induzida por hiperosmolaridade²⁵⁵⁻²⁵⁹. Além disso, também já foi mostrado que o aumento na expressão da proteína Fos no MnPO, NPV e NSO induzido por hiperosmolaridade é reduzido por injeções icv de losartan¹⁸⁴. No presente estudo, o pré-tratamento com losartan no VL aboliu a ingestão de água e NaCl em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M combinada com moxonidina no NPBL, sugerindo que a atividade de mecanismos angiotensinérgicos é importante para a ingestão de água e NaCl

nesta condição. Portanto, as respostas induzidas por aumento da osmolaridade parecem ser mediadas por uma via angiotensinérgica central. Como os mecanismos colinérgicos também participam das respostas induzidas pela hiperosmolaridade, os resultados prévios e presentes sugerem que existe uma interação entre mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos no controle das respostas produzidas pelo aumento da osmolaridade plasmática.

Os presentes resultados mostram que também a ingestão de água e NaCl induzida por injeções de carbacol no VL ou OSF em ratos que receberam injeções de moxonidina no NPBL é abolida por injeções de losartan no VL ou OSF. Por outro lado, a ingestão de NaCl induzida por injeção icv de ANG II ou FURO + CAP combinados com injeção de moxonidina no NPBL não é modificada pelo pré-tratamento com injeções de atropina no VL, embora a ingestão de água seja reduzida. Assim, evidencia-se claramente que os mecanismos colinérgicos não participam da ingestão de NaCl induzida por ativação de mecanismos angiotensinérgicos quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão desativados. Por outro lado, a redução da ingestão de água induzida por injeção icv de ANG II ou por FURO + CAP combinados com injeção de moxonidina no NPBL em ratos pré-tratados com injeções de atropina no VL poderia indicar que mecanismos colinérgicos também participariam da ingestão de água nesta condição. Mas neste caso, é preciso levar em conta que uma parte significativa do aumento da ingestão de água poderia ser devido ao efeito de aumento de osmolaridade plasmática causada pela excessiva ingestão de NaCl hipertônico, ou seja, seria ingestão de água que ocorre pela ativação de osmorreceptores. Como discutido anteriormente, a ingestão de água induzida por ativação de osmorreceptores depende de mecanismos colinérgicos centrais que seriam bloqueados pela atropina, reduzindo o aumento da ingestão de água nesta condição. Assim, pode-se sugerir que a resposta dipsogênica decorrente da ação direta da ANG II não foi modificada pelo tratamento com atropina à semelhança do que ocorreu com a ingestão de NaCl. De qualquer forma, experimentos com acesso apenas a uma bureta contendo água (teste de bebedouro único) seriam importantes para uma conclusão final neste caso.

A interação entre os mecanismos colinérgico e angiotensinérgico é bastante controversa na literatura. Alguns estudos mostram que a inibição dos mecanismos angiotensinérgicos bloqueia a resposta pressora e dipsogênica da ANG II, sem alterar a resposta da estimulação colinérgica²⁶²⁻²⁶⁴. De maneira semelhante, os antagonistas colinérgicos não interferem²⁶⁴⁻²⁶⁷ ou reduzem parcialmente²⁶⁸ os efeitos da ANG II na pressão arterial e sede. No entanto, outros estudos mostram que a resposta pressora da ANG II é mediada em partes pela acetilcolina¹⁸⁷. Ainda existem relatos que o bloqueio de receptores

angiotensinérgicos AT₁ bloqueia a resposta pressora^{188,189} e a natriurese^{269,270} induzida por injeção de carbacol no VL. Em relação à ingestão de NaCl, não existem relatos sobre a interação entre os mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos. Contudo, o presente estudo claramente sugere a interação entre esses mecanismos no controle da ingestão de água e NaCl, inclusive em vias ativadas pelos osmorreceptores.

A fim de se verificar se a injeção icv de losartan reduziria de maneira inespecífica qualquer comportamento ingestivo, foram testados os efeitos da injeção icv de losartan na ingestão de sacarose 0,06 M e ingestão de ração induzida por privação alimentar por 24 horas. Os resultados mostraram que o tratamento prévio com losartan no VL de animais normohidratados reduziu a ingestão de sacarose 0,06 M, sem alterar a ingestão de água. Ainda, injeções icv de losartan não alteraram a ingestão de ração induzida por privação alimentar por 24 horas, embora tenham reduzido a ingestão de água associada à alimentação. A redução da ingestão de sacarose 0,06 M em animais tratados com losartan no VL sugere uma possível ação inespecífica do losartan. No entanto, estudos recentes demonstraram que a atividade do nervo corda do tímpano observada após aplicação de solução de sacarose 500 mM diretamente na língua de animais anestesiados é aumentada significativamente pelo pré-tratamento com ANG II²⁷¹. Ainda, o antagonismo de receptores AT₁ em animais privados de água reduz a taxa de lambidas em solução de sacarose, sugerindo que a ANG II seja um modulador da sensibilidade ao sabor doce²⁷¹. Dessa maneira, é possível que a redução da ingestão de sacarose 0,06 M em animais tratados com losartan icv seja devido à alteração da percepção do sabor doce da solução de sacarose 0,06 M. Também contrário à hipótese de ação inespecífica do losartan, os presentes resultados mostram que losartan injetado no VL não altera a ingestão de ração em animais privados de alimento por 24 horas, embora reduza a ingestão de água nesses animais. Estudos prévios demonstraram que a ingestão de água associada à alimentação é dependente da ativação de diversos mecanismos, tais como o aumento na concentração plasmática de ANG II^{260,272,273} e sinais osmóticos produzidos pela ingestão de ração seca²⁰⁸. No presente estudo demonstramos que o bloqueio dos mecanismos angiotensinérgicos prosencefálicos abole a ingestão de água induzida por hiperosmolaridade. Portanto, a redução da ingestão de água em animais privados de ração por 24 horas parece ser devido ao bloqueio dos sinais facilitatórios angiotensinérgicos ou osmorregulatórios gerados pela ingestão de ração.

O presente estudo ainda mostra que as células dissociadas do OSF são sensíveis à aplicação de ANG II e carbacol, demonstrado pelo aumento na intensidade de fluorescência do indicador de cálcio Fluo-4 (resultado já publicado em artigo científico; ver

apêndice no final da tese). Esse resultado está de acordo com estudos anteriores que mostraram que a ativação de receptores angiotensinérgicos e colinérgicos ou o aumento da osmolaridade despolarizam e aumentam a frequência de disparo de células do OSF^{33,274-277}. Além disso, a injeção de ANG II e de agonistas colinérgicos diretamente no OSF induz ingestão de água^{37-39,63,160,278,279}. O OSF ainda é importante para as respostas osmorregulatórias induzidas por aumento da osmolaridade plasmática^{32-34,204}. A sensibilidade dos neurônios do OSF a mais de um estímulo foi descrita por diversos estudos, já tendo sido demonstrado neurônios sensíveis a ANG II e osmolaridade²⁸⁰, ANG II e ANP²⁸¹, ANG II e calcitonina²⁸², ANG II e estrogênio²⁸³ e leptina e amilina²⁸⁴. No presente estudo mostramos que estímulo osmótico, ANG II e carbacol foram capazes de ativar as células do OSF e promover um influxo de cálcio. A análise da porcentagem das células sensíveis a cada estímulo revela que grande parte das células do OSF são sensíveis ao aumento na osmolaridade e aproximadamente 50% dessas células também são sensíveis à ANG II. Coerente com essa sensibilidade de algumas células ao estímulo osmótico e à ANG II, Zhang e colaboradores já haviam demonstrado que a ANG II potencializa o aumento na frequência de disparos induzido por hiperosmolaridade em células magnocelulares do NSO¹⁸⁶. Curiosamente, no presente estudo encontramos poucas células sensíveis à aplicação aguda de carbacol. Não é possível determinar exatamente o motivo dessa baixa porcentagem de células responsivas ao estímulo colinérgico. Pode ser que as células do OSF mantidas em cultura alterem a expressão ou internalizem os receptores colinérgicos ou até mesmo que os receptores de membrana tenham sido perdidos durante o processo de dissociação, resultando em células não responsivas. De qualquer maneira, todos os estímulos testados foram capazes de ativar as células e foram observadas células sensíveis a apenas um ou a ambos os estímulos testados.

Levando em consideração que o bloqueio de receptores colinérgicos ou angiotensinérgicos reduz a ingestão de água e NaCl induzida por NaCl 2 M ig combinado com injeções de moxonidina no NPBL e a existência de células sensíveis a ambos os estímulos colinérgico e angiotensinérgico, seria possível atropina e losartan bloquear os receptores colinérgicos e angiotensinérgicos expressos por uma mesma célula e, por isso, inibirem de forma semelhante o comportamento ingestivo. Os resultados do presente estudo também mostram que os mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos são ativados pela hiperosmolaridade e que os mecanismos colinérgicos dependeriam dos mecanismos angiotensinérgicos, enquanto que os mecanismos angiotensinérgicos poderiam atuar de forma independente dos mecanismos colinérgicos. Assim, uma possibilidade também

seria os neurônios osmossensíveis, colinérgicos e angiotensinérgicos estarem organizados em série, embora alguns neurônios possam ser ativados por mais de um estímulo. Ao mostrar que os opioides endógenos estão envolvidos nas vias ativadas por ANG II e hiperosmolaridade, Wilson e colaboradores sugeriram que os estímulos hiperosmótico e angiotensinérgico induzem sede por ativação de uma mesma projeção neuronal²⁸⁵. Semelhante ao estudo de Wilson e colaboradores, os presentes resultados também sugerem que diferentes estímulos ativam uma mesma via de facilitação, provavelmente angiotensinérgica, da ingestão de água e NaCl. Essa hipótese é reforçada por dados eletrofisiológicos obtidos pelo registro de células do encéfalo de animais anestesiados que mostram que a ANG II aumenta a atividade de células do OSF e esse efeito é bloqueado pelo antagonista de receptores AT₁ saralasinina, mas não pela atropina; no entanto, as respostas induzidas pela acetilcolina são bloqueadas tanto pela atropina, quanto pela saralasinina²²³. Como esses dados foram obtidos pelo registro de células que apresentavam suas conexões normais no encéfalo, é possível que a acetilcolina tenha promovido a liberação de ANG II por neurônios do OSF e essa ANG II liberada localmente, por sua vez, ativou os neurônios registrados pelos pesquisadores; já quando os receptores AT₁ estão bloqueados pela saralasinina, essa ativação não ocorre.

6. CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostram que a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por hiperosmolaridade ou injeções de carbacol no VL ou OSF combinadas com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL é abolida pelo bloqueio dos receptores colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos, particularmente da ASM e do OSF. Como o bloqueio dos mecanismos angiotensinérgicos abole a ingestão de água e NaCl 0,3 M produzida pela ativação de mecanismos colinérgicos combinada com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL, mas o contrário não ocorre, pode-se sugerir que diferentes estímulos, tais como hiperosmolaridade e ativação colinérgica central, facilitam a ingestão de NaCl através da ativação de mecanismos angiotensinérgicos centrais.

A Figura 16 mostra um modelo esquemático de possíveis mecanismos e conexões entre áreas centrais envolvidas no controle da ingestão de NaCl e água. Os sinais inibitórios para a ingestão de NaCl e água, tais como a ativação de receptores cardiopulmonares, barorreceptores, receptores gustativos e sinais humorais, chegam à AP/NTS e então ativam o NPBL. Os neurotransmissores envolvidos na ativação do mecanismo inibitório do NPBL são a 5-HT, CCK, CRH e o glutamato. Já os opioides, noradrenalina, ATP e GABA desativam os mecanismos do NPBL. O NPBL, por sua vez, emite projeção inibitória para uma área central integrativa que talvez seja o CeA. Em contrapartida aos sinais inibitórios provenientes do NPBL que chegam à área central integrativa, sinais facilitatórios também chegam a essa área integrativa. Os sinais facilitatórios poderiam ser sinais provenientes do OSF que é ativado pela ação da ANG II nos receptores AT₁, ação da acetilcolina nos receptores colinérgicos muscarínicos ou pelo aumento da atividade dos osmorreceptores decorrente do aumento na osmolaridade plasmática. Embora não se possa descartar totalmente outras possibilidades, como a de receptores angiotensinérgicos e colinérgicos estarem localizados no mesmo neurônio, é possível que os neurônios do OSF estejam organizados em série da seguinte maneira: osmorreceptores ativados pela hiperosmolaridade levam à ativação de mecanismos colinérgicos que, por sua vez, ativam vias angiotensinérgicas, como ilustrado na Figura 16. A ingestão de NaCl dependeria da ativação da área integrativa que recebe sinais inibitórios e facilitatórios. Sendo assim, a saciedade ou o apetite ao sódio provavelmente é o resultado da ação de sinais opostos que chegam à área integrativa. Se os sinais inibitórios forem predominantes, o resultado é a saciedade; no entanto, se os sinais predominantes forem facilitatórios, o resultado é o apetite ao sódio.

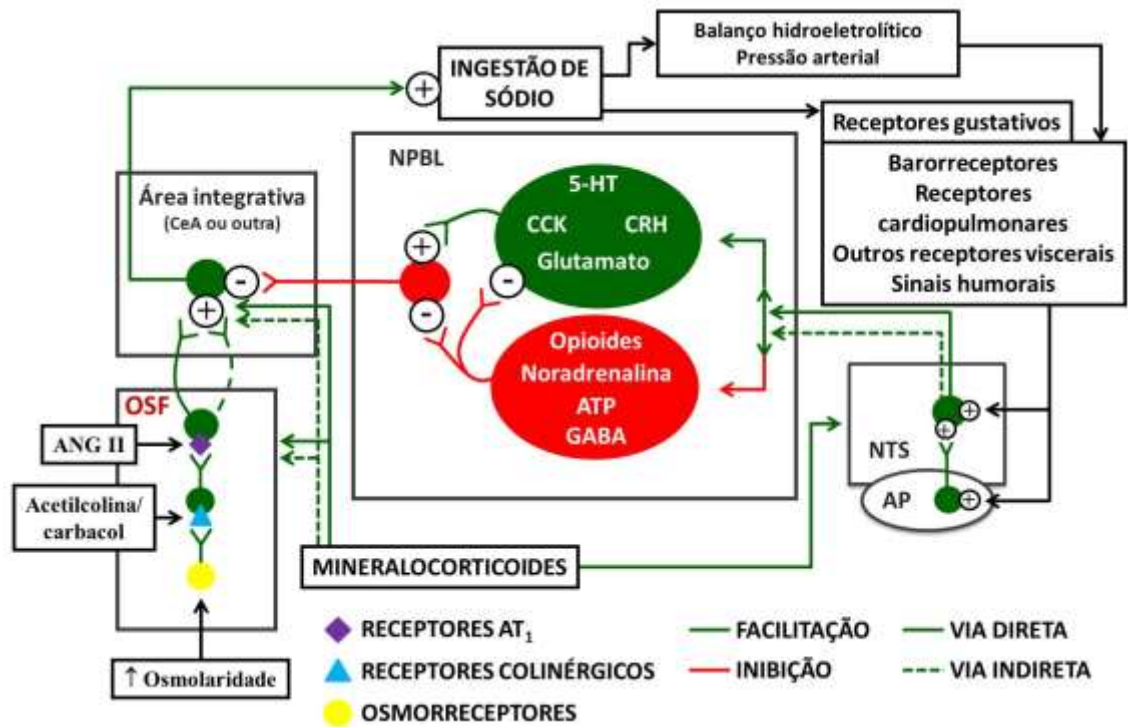


Figura 16 - Diagrama esquemático baseado em estudos prévios em ratos e nos resultados da presente tese mostrando a modulação dos mecanismos inibitórios do NPBL por diferentes neurotransmissores e a interação entre os mecanismos inibitórios do NPBL e mecanismos facilitatórios prosencefálicos envolvidos no controle da ingestão de água e NaCl. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; ATP, trifosfato de adenosina; CCK, colecistocinina; CeA, núcleo central da amígdala; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; GABA, ácido γ -aminobutírico; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical.

7. REFERÊNCIAS

- 1 GUYTON, A. C. H., J. E. **Textbook of medical physiology**. 9th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996.
 - 2 JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In. **Current topics in neuroendocrinology**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p.149-190, 1990.
 - 3 THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 2 Pt 2, p. R458-65, 1994.
 - 4 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.
 - 5 JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The Neuroendocrinology, Neurochemistry and Molecular Biology of Thirst and Salt Appetite. In. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology**. New York: Springer, p.641-687, 2007.
 - 6 PEREIRA, D. T. et al. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiology & Behavior**, v. 76, n. 4-5, p. 501-5, 2002.
 - 7 ANDRADE, C. A. et al. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. **Neuroscience**, v. 208, p. 69-78, 2012.
 - 8 GILMAN, A. The relation between blood osmotic pressure, fluid distribution and voluntary water intake. **American Journal of Physiology**, v. 120, n. 2, p. 323-328, 1937.
 - 9 DUNN, F. L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 12, p. 3212-9, 1973.
 - 10 HOLMES, J. H.; GREGERSEN, M. I. Observations on drinking induced by hypertonic solutions. **American Journal of Physiology**, v. 162, n. 2, p. 326-337, 1950.
 - 11 HUANG, W. et al. Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. **American journal of physiology**, v. 270, n. 2 Pt 2, p. R427-33, 1996.
 - 12 HUANG, W.; LEE, S. L.; SJOQUIST, M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 3 Pt 2, p. R634-40, 1995.
 - 13 BLACKBURN, R. E. et al. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 269, n. 2 Pt 2, p. R245-51, 1995.
-
-

-
-
- 14 BLACKBURN, R. E. et al. 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. 10380-4, 1993.
- 15 VERNEY, E. B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, v. 135, n. 878, p. 25-106, 1947.
- 16 ANDERSSON, B. Regulation of body fluids. **Annual Review of Physiology**, v. 39, p. 185-200, 1977.
- 17 MCKINLEY, M. J.; DENTON, D. A.; WEISINGER, R. S. Sensors for antidiuresis and thirst - osmoreceptors or CSF sodium detectors? **Brain Research**, v. 141, n. 1, p. 89-103, 1978.
- 18 KURAMOCHI, G.; KOBAYASHI, I. Regulation of the urine concentration mechanism by the oropharyngeal afferent pathway in man. **American Journal of Nephrology**, v. 20, n. 1, p. 42-7, 2000.
- 19 ANDERSEN, L. J. et al. Gastrointestinal osmoreceptors and renal sodium excretion in humans. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 2, p. R287-94, 2000.
- 20 CARLSON, S. H.; BEITZ, A.; OSBORN, J. W. Intra-gastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 272, n. 3 Pt 2, p. R750-8, 1997.
- 21 CHOI-KWON, S.; BAERTSCHI, A. J. Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 261, n. 1 Pt 1, p. E18-25, 1991.
- 22 BAERTSCHI, A. J.; VALLET, P. G. Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. **The Journal of Physiology**, v. 315, p. 217-30, 1981.
- 23 ADACHI, A. Thermosensitive and osmoreceptive afferent fibers in the hepatic branch of the vagus nerve. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 10, n. 3-4, p. 269-73, 1984.
- 24 ADACHI, A.; NIIJIMA, A.; JACOBS, H. L. An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. **American Journal of Physiology**, v. 231, n. 4, p. 1043-9, 1976.
- 25 BAERTSCHI, A. J.; PENCE, R. A. Gut-brain signaling of water absorption inhibits vasopressin in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 268, n. 1 Pt 2, p. R236-47, 1995.
- 26 NIIJIMA, A. Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. **Science**, v. 166, n. 3912, p. 1519-20, 1969.
-
-

-
-
- 27 KRALY, F. S. et al. Drinking after intragastric NaCl without increase in systemic plasma osmolality in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 269, n. 5 Pt 2, p. R1085-92, 1995.
- 28 CARLSON, S. H.; OSBORN, J. W. Splanchnic and vagal denervation attenuate central Fos but not AVP responses to intragastric salt in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 5 Pt 2, p. R1243-52, 1998.
- 29 SCHOORLEMMER, G. H.; JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. Effect of hyperosmotic solutions on salt excretion and thirst in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 4, p. R917-23, 2000.
- 30 BUGGY, J.; JOHNSON, A. K. Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hypernatremia. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 233, n. 1, p. R44-52, 1977.
- 31 JOHNSON, A. K.; BUGGY, J. Periventricular preoptic-hypothalamus is vital for thirst and normal water economy. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 234, n. 3, p. R122-9, 1978.
- 32 BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H.; RICHARD, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 15, n. 3, p. 231-74, 1994.
- 33 SIBBALD, J. R.; HUBBARD, J. I.; SIRETT, N. E. Responses from osmosensitive neurons of the rat subfornical organ in vitro. **Brain Research**, v. 461, n. 2, p. 205-14, 1988.
- 34 ANDERSON, J. W.; WASHBURN, D. L.; FERGUSON, A. V. Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons. **Neuroscience**, v. 100, n. 3, p. 539-47, 2000.
- 35 VIVAS, L.; CHIARAVIGLIO, E.; CARRER, H. F. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. **Brain Research**, v. 519, n. 1-2, p. 294-300, 1990.
- 36 GROSSMAN, S. P. Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of hypothalamus. **Science**, v. 132, n. 3422, p. 301-2, 1960.
- 37 ROUTTENBERG, A.; SIMPSON, J. B. Carbachol-induced drinking at ventricular and subfornical organ sites of application. **Life Sciences. Pt. 1: Physiology and Pharmacology.**, v. 10, n. 9, p. 481-90, 1971.
- 38 SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. The subfornical organ and carbachol-induced drinking. **Brain Research**, v. 45, n. 1, p. 135-52, 1972.
- 39 SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: acetylcholine application elicits drinking. **Brain Research**, v. 79, n. 1, p. 157-64, 1974.
-
-

-
-
- 40 MENANI, J. V. et al. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. **Neuroscience Letters**, v. 113, n. 3, p. 339-44, 1990.
- 41 BARBOSA, S. P. et al. Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 463-6, 1995.
- 42 LUIZ, A. C. et al. Pressor, dipsogenic, natriuretic and kaliuretic response to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area. **Neuroscience Letters**, v. 132, n. 2, p. 195-8, 1991.
- 43 FRANCI, C. R. et al. Interaction between the lateral hypothalamic area (LHA) and the medial septal area (MSA) in the control of sodium and potassium excretion in rats. **Physiology & Behavior**, v. 25, n. 6, p. 801-6, 1980.
- 44 MORITA, N. et al. Interaction between the septal area and the subfornical organ in the control of water intake induced by thirst-eliciting procedures. **Physiology & Behavior**, v. 24, n. 2, p. 243-9, 1980.
- 45 SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. The connections of the septal region in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 186, n. 4, p. 621-55, 1979.
- 46 HOFFMAN, W. E. et al. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**, v. 16, n. 7-8, p. 463-72, 1977.
- 47 HOFFMAN, W. E.; PHILLIPS, M. I. A pressor response to intraventricular injections of carbachol. **Brain Research**, v. 105, n. 1, p. 157-62, 1976.
- 48 DORN, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M. Natriuresis in the rat following intraventricular carbachol. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 5, p. 1292-8, 1970.
- 49 FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L.; SIMPSON, J. B. Modulation of salt appetite by lateral ventricular infusions of angiotensin II and carbachol during sodium depletion. **Brain Research**, v. 346, n. 2, p. 273-80, 1985.
- 50 IMAI, Y. et al. Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 1, p. 549-57, 1989.
- 51 HACKENTHAL, E. et al. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 4, p. 1067-116, 1990.
- 52 TROLLIET, M. R.; PHILLIPS, M. I. The effect of chronic bilateral nephrectomy on plasma and brain angiotensin. **Journal of Hypertension**, v. 10, n. 1, p. 29-36, 1992.
- 53 GROBE, J. L.; XU, D.; SIGMUND, C. D. An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. **Physiology**, v. 23, p. 187-93, 2008.
-
-

-
-
- 54 DESCHEPPER, C. F.; BOUHNİK, J.; GANONG, W. F. Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. **Brain Research**, v. 374, n. 1, p. 195-8, 1986.
- 55 STORNETTA, R. L. et al. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. **Science**, v. 242, n. 4884, p. 1444-6, 1988.
- 56 ARONSSON, M. et al. Evidence for the existence of angiotensinogen mRNA in magnocellular paraventricular hypothalamic neurons. **Acta Physiologica**, v. 132, n. 4, p. 585-6, 1988.
- 57 YANG, G. et al. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. **Brain Research**, v. 817, n. 1-2, p. 123-31, 1999.
- 58 GENAIN, C. P.; VAN LOON, G. R.; KOTCHEN, T. A. Distribution of renin activity and angiotensinogen in rat brain. Effects of dietary sodium chloride intake on brain renin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 5, p. 1939-45, 1985.
- 59 GANTEN, D. et al. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. **Science**, v. 173, n. 3991, p. 64-5, 1971.
- 60 DZAU, V. J. et al. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. **Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 544-8, 1986.
- 61 ROTH, M.; WEITZMAN, A. F.; PIQUILLOUD, Y. Converting enzyme content of different tissues of the rat. **Experientia**, v. 25, n. 12, p. 1247, 1969.
- 62 PHILLIPS, M. I.; SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regulatory Peptides**, v. 78, n. 1-3, p. 1-11, 1998.
- 63 FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 583-686, 1998.
- 64 LENKEI, Z.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTES, C. The angiotensin receptor subtype AT_{1A} predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. **Molecular Brain Research**, v. 30, n. 1, p. 53-60, 1995.
- 65 LENKEI, Z. et al. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 383-439, 1997.
- 66 JOHREN, O.; INAGAMI, T.; SAAVEDRA, J. M. AT_{1A}, AT_{1B}, and AT₂ angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. **Neuroreport**, v. 6, n. 18, p. 2549-52, 1995.
- 67 SIMPSON, J. B.; EPSTEIN, A. N.; CAMARDO, J. S., JR. Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 92, n. 4, p. 581-601, 1978.
-
-

-
-
- 68 JOHNSON, A. K.; GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 8, p. 678-86, 1993.
- 69 LIND, R. W.; JOHNSON, A. K. Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. **The Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 8, p. 1043-51, 1982.
- 70 MOE, K. E.; WEISS, M. L.; EPSTEIN, A. N. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 247, n. 2 Pt 2, p. R356-65, 1984.
- 71 WEISINGER, R. S. et al. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: a brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1-2, p. 73-81, 1996.
- 72 WEISINGER, R. S. et al. Role of angiotensin in sodium appetite of sodium-deplete sheep. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 253, n. 3 Pt 2, p. R482-8, 1987.
- 73 SATO, M. A.; YADA, M. M.; DE LUCA JR., L. A. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 4, p. 1099-104, 1996.
- 74 FITTS, D. A.; MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 4, p. 865-72, 1989.
- 75 THUNHORST, R. L. et al. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 6 Pt 2, p. R1807-14, 1998.
- 76 BOOTH, R. E.; JOHNSON, J. P.; STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Advances in Physiology Education**, v. 26, n. 1-4, p. 8-20, 2002.
- 77 RAMSAY, D. J.; THRASHER, T. N.; BIE, P. Endocrine components of body fluid homeostasis. **Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology**, v. 90, n. 4, p. 777-80, 1988.
- 78 GALAVERNA, O. et al. 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.
- 79 SAKAI, R. R. et al. The amygdala: site of genomic and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. **Kidney International**, v. 57, n. 4, p. 1337-45, 2000.
- 80 ZHANG, D. M.; EPSTEIN, A. N.; SCHULKIN, J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. **Brain Research**, v. 600, n. 1, p. 20-6, 1993.
- 81 GEERLING, J. C. et al. Aldosterone target neurons in the nucleus tractus solitarius drive sodium appetite. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 411-7, 2006.
-
-

-
-
- 82 GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 497, n. 4, p. 646-57, 2006.
- 83 GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: efferent projections. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 497, n. 2, p. 223-50, 2006.
- 84 GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thirst. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 3, p. R1338-48, 2007.
- 85 ODERMATT, A.; ARNOLD, P.; FREY, F. J. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28484-92, 2001.
- 86 FORMENTI, S. et al. Hindbrain mineralocorticoid mechanisms on sodium appetite. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 3, p. R252-9, 2013.
- 87 JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1388-400, 2007.
- 88 ROBINSON, M. M.; EVERED, M. D. Pressor action of intravenous angiotensin II reduces drinking response in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 252, n. 4 Pt 2, p. R754-9, 1987.
- 89 KAUFMAN, S. Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 349, p. 389-96, 1984.
- 90 TOTH, E.; STELFOX, J.; KAUFMAN, S. Cardiac control of salt appetite. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 252, n. 5 Pt 2, p. R925-9, 1987.
- 91 FITZSIMONS, J. T.; MOORE-GILLON, M. J. Drinking and antidiuresis in response to reductions in venous return in the dog: neural and endocrine mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 308, p. 403-16, 1980.
- 92 MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 165-81, 2003.
- 93 DE BOLD, A. J. et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, v. 28, n. 1, p. 89-94, 1981.
- 94 ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M.; SAMSON, W. K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. **Endocrinology**, v. 118, n. 4, p. 1726-8, 1986.
-
-

-
-
- 95 FRANCI, C. R. Possible dual effect of endogenous ANP on water and sodium intake and role of AII. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 5, p. 525-9, 1997.
- 96 SATO, M. A. et al. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. **Regulatory Peptides**, v. 69, n. 3, p. 137-42, 1997.
- 97 VERBALIS, J. G. et al. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 395, p. 209-25, 1995.
- 98 LAUAND, F. et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. **Neuroscience**, v. 147, n. 1, p. 247-57, 2007.
- 99 BLACKBURN, R. E. et al. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 263, n. 6 Pt 2, p. R1347-53, 1992.
- 100 BELLIN, S. I.; LANDAS, S. K.; JOHNSON, A. K. Localized injections of 6-hydroxydopamine into lamina terminalis-associated structures: effects on experimentally induced drinking and pressor responses. **Brain Research**, v. 416, n. 1, p. 75-83, 1987.
- 101 BELLIN, S. I.; BHATNAGAR, R. K.; JOHNSON, A. K. Periventricular noradrenergic systems are critical for angiotensin-induced drinking and blood pressure responses. **Brain Research**, v. 403, n. 1, p. 105-12, 1987.
- 102 BELLIN, S. I.; LANDAS, S. K.; JOHNSON, A. K. Selective catecholamine depletion of structures along the ventral lamina terminalis: effects on experimentally-induced drinking and pressor responses. **Brain Research**, v. 456, n. 1, p. 9-16, 1988.
- 103 KING, P. R.; GUNDLACH, A. L.; LOUIS, W. J. Quantitative autoradiographic localization in rat brain of α_2 -adrenergic and non-adrenergic I-receptor binding sites labelled by [3 H]rilmenidine. **Brain Research**, v. 675, n. 1-2, p. 264-78, 1995.
- 104 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Pharmacology**. 4th. New York: Churchill Livingstone, 2001.
- 105 MAURA, G.; BONANNO, G.; RAITERI, M. Presynaptic α_2 -adrenoceptors mediating inhibition of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine release in rat cerebral cortex: further characterization as different α_2 -adrenoceptor subtypes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 345, n. 4, p. 410-6, 1992.
- 106 GOBERT, A. et al. Simultaneous quantification of serotonin, dopamine and noradrenaline levels in single frontal cortex dialysates of freely-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control of release. **Neuroscience**, v. 84, n. 2, p. 413-29, 1998.
-
-

- 107 FRANKHUYZEN, A. L.; MULDER, A. H. Noradrenaline inhibits depolarization-induced ³H-serotonin release from slices of rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 63, n. 2-3, p. 179-82, 1980.
- 108 GOTHERT, M.; HUTH, H. Alpha-adrenoceptor-mediated modulation of 5-hydroxytryptamine release from rat brain cortex slices. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 313, n. 1, p. 21-6, 1980.
- 109 DE PAULA, P. M. et al. Effects of central alpha-adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neuroscience Letters**, v. 214, n. 2-3, p. 155-8, 1996.
- 110 YADA, M. M. et al. Central α -adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 57, n. 1-2, p. 137-43, 1997.
- 111 YADA, M. M. et al. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. **Brain Research Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 205-9, 1997.
- 112 SUGAWARA, A. M. et al. Noradrenaline and mixed α_2 -adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. **Brain Research**, v. 839, n. 2, p. 227-34, 1999.
- 113 SATO, M. A. et al. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1663-6, 1996.
- 114 MENANI, J. V. et al. Central moxonidine on water and NaCl intake. **Brain Research Bulletin**, v. 49, n. 4, p. 273-9, 1999.
- 115 FREGLY, M. J.; KELLEHER, D. L. Antidipsogenic effect of clonidine on isoproterenol induced water intake. **Appetite**, v. 1, p. 279-289, 1980.
- 116 FREGLY, M. J.; KELLEHER, D. L.; GREENLEAF, J. E. Antidipsogenic effect of clonidine on angiotensin II-, hypertonic saline-, pilocarpine- and dehydration-induced water intakes. **Brain Research Bulletin**, v. 7, n. 6, p. 661-4, 1981.
- 117 FREGLY, M. J.; ROWLAND, N. E.; GREENLEAF, J. E. A role for presynaptic α_2 -adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 12, n. 4, p. 393-8, 1984.
- 118 FREGLY, M. J.; ROWLAND, N. E.; GREENLEAF, J. E. Clonidine antagonism of angiotensin-related drinking: a central site of action. **Brain Research**, v. 298, n. 2, p. 321-7, 1984.
- 119 FERRARI, A. C. et al. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. **Brain Research**, v. 522, n. 1, p. 125-30, 1990.

-
-
- 120 FERRARI, A. C. et al. Role of the α_1 - and α_2 -adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. **Brain Research**, v. 560, n. 1-2, p. 291-6, 1991.
- 121 DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Moxonidine and central α_2 adrenergic receptors in sodium intake. **Brain Research**, v. 993, n. 1-2, p. 177-82, 2003.
- 122 CALLERA, J. C. et al. Role of the adrenergic pathways of the lateral hypothalamus on water intake and pressor response induced by the cholinergic activation of the medial septal area in rats. **Neuroscience Letters**, v. 167, n. 1-2, p. 153-5, 1994.
- 123 CALLERA, J. C. et al. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 46, n. 1, p. 39-43, 1993.
- 124 DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 4, p. 497-502, 1997.
- 125 BYLUND, D. B. et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 121-36, 1994.
- 126 ANDRADE, C. A. et al. Involvement of forebrain imidazoline and α_2 -adrenergic receptors in the antidipsogenic response to moxonidine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1009, p. 262-4, 2003.
- 127 ANDRADE, C. A. F. et al. 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.
- 128 CALLERA, J. C. et al. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725-35, 2005.
- 129 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 Pt 2, p. R1039-44, 1991.
- 130 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 Pt 2, p. R1044-9, 1995.
- 131 MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1431-7, 1998.
- 132 MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **American**
-
-

Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 270, n. 1 Pt 2, p. R162-8, 1996.

133 OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 256, n. 1 Pt 2, p. R264-9, 1989.

134 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. 275-8, 1995.

135 HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 293, n. 4, p. 540-80, 1990.

136 DE GOBBI, J. I. et al. Right atrial stretch alters fore- and hind-brain expression of c-fos and inhibits the rapid onset of salt appetite. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. Pt 15, p. 3719-29, 2008.

137 FRANCHINI, L. F.; VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1180-7, 1999.

138 KOBASHI, M. et al. 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.

139 YAMAMOTO, T. et al. c-Fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. **Neuroreport**, v. 4, n. 11, p. 1223-6, 1993.

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

141 JHAMANDAS, J. H. et al. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. **Brain Research Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 115-26, 1996.

142 KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H.; JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. **Brain Research Bulletin**, v. 30, n. 1-2, p. 163-72, 1993.

143 CHO, Y. K.; LI, C. S.; SMITH, D. V. Gustatory projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nuclei in the hamster. **Chemical Senses**, v. 27, n. 1, p. 81-90, 2002.

144 HALSELL, C. B.; FRANK, M. E. Mapping study of the parabrachial taste-responsive area for the anterior tongue in the golden hamster. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 306, n. 4, p. 708-22, 1991.

- 145 SCALERA, G.; SPECTOR, A. C.; NORNGREN, R. Excitotoxic lesions of the parabrachial nuclei prevent conditioned taste aversions and sodium appetite in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, n. 5, p. 997-1008, 1995.
- 146 FRANK, M. E.; CONTRERAS, R. J.; HETTINGER, T. P. Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 50, n. 4, p. 941-60, 1983.
- 147 BRESLIN, P. A.; SPECTOR, A. C.; GRILL, H. J. Chorda tympani section decreases the cation specificity of depletion-induced sodium appetite in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 2 Pt 2, p. R319-23, 1993.
- 148 RICHE, D.; DE POMMERY, J.; MENETREY, D. Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 293, n. 3, p. 399-424, 1990.
- 149 LU, B. C. et al. Endomorphin 1- and endomorphin 2-containing neurons in nucleus tractus solitarii send axons to the parabrachial nuclei in the rat. **Anatomical Record**, v. 292, n. 4, p. 488-97, 2009.
- 150 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. 1117-26, 1985.
- 151 MICELI, M. O.; POST, C. A.; VAN DER KOOY, D. Catecholamine and serotonin colocalization in projection neurons of the area postrema. **Brain Research**, v. 412, n. 2, p. 381-5, 1987.
- 152 TALLEY, E. M. et al. Distribution of α_{2A} -adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 372, n. 1, p. 111-34, 1996.
- 153 GILL, C. F. et al. A subpopulation of neurons in the rat rostral nucleus of the solitary tract that project to the parabrachial nucleus express glutamate-like immunoreactivity. **Brain Research**, v. 821, n. 2, p. 251-62, 1999.
- 154 HERBERT, H.; SAPER, C. B. Cholecystokinin-, galanin-, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 293, n. 4, p. 581-98, 1990.
- 155 JIA, H. G.; ZHANG, G. Y.; WAN, Q. A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus: an ultrastructural study of anterograde tracing in combination with post-embedding immunocytochemistry in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 382, n. 1-2, p. 153-7, 2005.
- 156 MOGA, M. M.; GRAY, T. S. Evidence for corticotropin-releasing factor, neurotensin, and somatostatin in the neural pathway from the central nucleus of the amygdala

- to the parabrachial nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 241, n. 3, p. 275-84, 1985.
- 157 MOGA, M. M.; SAPER, C. B.; GRAY, T. S. Neuropeptide organization of the hypothalamic projection to the parabrachial nucleus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 295, n. 4, p. 662-82, 1990.
- 158 OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 3 Pt 2, p. R504-9, 1986.
- 159 MENANI, J. V.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Effects of lidocaine injections into the lateral parabrachial nucleus on dipsogenic and pressor responses to central angiotensin II in rats. **Brain Research**, v. 695, n. 2, p. 250-2, 1995.
- 160 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. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, n. 6 Pt 2, p. R1470-6, 1996.
- 161 MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. R555-60, 1998.
- 162 MENANI, J. V. et al. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Research**, v. 801, n. 1-2, p. 29-35, 1998.
- 163 MENANI, J. V. et al. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 1, p. R126-31, 2000.
- 164 DE GOBBI, J. I. F.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Research**, v. 880, n. 1-2, p. 131-8, 2000.
- 165 TANAKA, J. et al. 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. 41-4, 2004.
- 166 DE GOBBI, J. I. F. et al. Interaction of serotonin and cholecystinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 5, p. R1301-7, 2001.
- 167 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.
- 168 DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in

rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. R1136-41, 2006.

169 DE GOBBI, J. I. F. et al. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Research**, v. 1301, p. 44-51, 2009.

170 MENEZES, M. F. et al. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Research**, v. 1372, p. 49-58, 2011.

171 ANDRADE, C. A. F. et al. Alpha₂-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21-8, 2006.

172 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. 1055-61, 2003.

173 MENANI, J. V. et al. 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. R837-41, 2002.

174 DE OLIVEIRA, L. B. et al. Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium chloride and sucrose intake in rats. **Neuroscience**, v. 183, p. 160-70, 2011.

175 RONCARI, C. F. et al. Importance of central AT₁ receptors for sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 196, p. 147-52, 2011.

176 RONCARI, C. F. et al. Angiotensinergic and cholinergic receptors of the subfornical organ mediate sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 262, p. 1-8, 2014.

177 NITABACH, M. N.; SCHULKIN, J.; EPSTEIN, A. N. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 35, n. 2, p. 127-34, 1989.

178 SCHULKIN, J.; MARINI, J.; EPSTEIN, A. N. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 179-85, 1989.

179 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. 123-34, 1994.

180 ANDRADE-FRANZÉ, G. M. et al. 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.

181 ANDRADE-FRANZÉ, G. M. et al. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633-41, 2010.

-
-
- 182 MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A.; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, n. 4, p. R201-10, 2014.
- 183 ROWLAND, N. E. et al. Angiotensin-related induction of immediate early genes in rat brain. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1-2, p. 25-9, 1996.
- 184 MOELLENHOFF, E. et al. Central angiotensin AT₁ and muscarinic receptors in ITF expression on intracerebroventricular NaCl. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 1 Pt 2, p. R234-44, 1998.
- 185 GIOVANNELLI, L.; BLOOM, F. E. c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation. **Neuroscience Letters**, v. 139, n. 1, p. 1-6, 1992.
- 186 ZHANG, Z.; BOURQUE, C. W. Amplification of transducer gain by angiotensin II-mediated enhancement of cortical actin density in osmosensory neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 28, n. 38, p. 9536-44, 2008.
- 187 BUYUKCOSKUN, N. I.; GULEC, G.; OZLUK, K. A central link between angiotensinergic and cholinergic systems; role of vasopressin. **Peptides**, v. 22, n. 9, p. 1415-20, 2001.
- 188 SAAD, W. A. et al. Functional evidence that the central renin-angiotensin system plays a role in the pressor response induced by central injection of carbachol. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 4, p. 493-6, 1997.
- 189 GRUBER, K. A.; CALLAHAN, M. F.; ESKRIDGE-SLOOP, S. L. Central administration of angiotensin II receptor antagonists and arterial pressure regulation: a note of caution. **Life Sciences**, v. 50, n. 20, p. 1497-502, 1992.
- 190 FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Research**, v. 319, n. 3, p. 229-59, 1984.
- 191 ANDRADE, C. A. F. et al. Enhancement of meal-associated hypertonic NaCl intake by moxonidine into the lateral parabrachial nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 183, n. 2, p. 156-60, 2007.
- 192 ANDRADE, C. A. F. et al. 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. 702-8, 2011.
- 193 ANDRADE, C. A. et al. Role of α_2 -adrenoceptors in the lateral parabrachial nucleus in the control of body fluid homeostasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 11-8, 2014.
- 194 GASPARINI, S. et al. Adrenergic mechanisms of the Kolliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 370-9, 2009.
-
-

-
-
- 195 WOLF, A. V. Osmometric analysis of thirst in man and dog. **American Journal of Physiology**, v. 161, n. 1, p. 75-86, 1950.
- 196 VALLET, P.; BAERTSCHI, A. J. Sodium-chloride sensitive receptors located in hepatic portal vein of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 17, n. 3, p. 283-8, 1980.
- 197 STARBUCK, E. M.; FITTS, D. A. Effects of SFO lesion or captopril on drinking induced by intragastric hypertonic saline. **Brain Research**, v. 795, n. 1-2, p. 37-43, 1998.
- 198 FREECE, J. A. et al. Subfornical organ disconnection alters Fos expression in the lamina terminalis, supraoptic nucleus, and area postrema after intragastric hypertonic NaCl. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 4, p. R947-55, 2005.
- 199 CURTIS, K. S. et al. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 1 Pt 2, p. R209-19, 1999.
- 200 HUANG, W.; SVED, A. F.; STRICKER, E. M. Vasopressin and oxytocin release evoked by NaCl loads are selectively blunted by area postrema lesions. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 3, p. R732-40, 2000.
- 201 MANGIAPANE, M. L. et al. Role for the subfornical organ in vasopressin release. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 1, p. 43-7, 1984.
- 202 MCKINLEY, M. J. et al. Osmoregulatory thirst in sheep is disrupted by ablation of the anterior wall of the optic recess. **Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 210-5, 1982.
- 203 STARBUCK, E. M.; FITTS, D. A. Subfornical organ disconnection and Fos-like immunoreactivity in hypothalamic nuclei after intragastric hypertonic saline. **Brain Research**, v. 951, n. 2, p. 202-8, 2002.
- 204 TANAKA, J.; SAITO, H.; YAGYU, K. Impaired responsiveness of paraventricular neurosecretory neurons to osmotic stimulation in rats after local anesthesia of the subfornical organ. **Neuroscience Letters**, v. 98, n. 1, p. 51-6, 1989.
- 205 HAN, L.; ROWLAND, N. E. Dissociation of Fos-like immunoreactivity in lamina terminalis and magnocellular hypothalamic nuclei induced by hypernatremia. **Brain Research**, v. 708, n. 1-2, p. 45-9, 1996.
- 206 STARBUCK, E. M.; WILSON, W. L.; FITTS, D. A. Fos-like immunoreactivity and thirst following hyperosmotic loading in rats with subdiaphragmatic vagotomy. **Brain Research**, v. 931, n. 2, p. 159-67, 2002.
- 207 DE LUCA JR., L. A. et al. 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. R552-9, 2002.
- 208 STARBUCK, E. M.; FITTS, D. A. Influence of the subfornical organ on meal-associated drinking in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 3, p. R669-77, 2001.
- 209 MCKINLEY, M. J. et al. Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 3 Pt 2, p. R673-83, 1999.
- 210 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.
- 211 OLDFIELD, B. J. et al. Intravenous hypertonic saline induces Fos immunoreactivity in neurons throughout the lamina terminalis. **Brain Research**, v. 561, n. 1, p. 151-6, 1991.
- 212 CIURA, S.; BOURQUE, C. W. Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 35, p. 9069-75, 2006.
- 213 EGAN, G. et al. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15241-6, 2003.
- 214 SWAAB, D. F.; POOL, C. W.; NIJVELDT, F. Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. **Journal of Neural Transmission**, v. 36, n. 3-4, p. 195-215, 1975.
- 215 VANDESANDE, F.; DIERICKX, K. Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. **Cell and Tissue Research**, v. 164, n. 2, p. 153-62, 1975.
- 216 WAKERLEY, J. B.; POULAIN, D. A.; BROWN, D. Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. **Brain Research**, v. 148, n. 2, p. 425-40, 1978.
- 217 WALTERS, J. K.; HATTON, G. I. Supraoptic neuronal activity in rats during five days of water deprivation. **Physiology & Behavior**, v. 13, n. 5, p. 661-7, 1974.
- 218 LIND, R. W.; VAN HOESEN, G. W.; JOHNSON, A. K. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 210, n. 3, p. 265-77, 1982.
- 219 MISELIS, R. R.; SHAPIRO, R. E.; HAND, P. J. Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. **Science**, v. 205, n. 4410, p. 1022-5, 1979.
-
-

-
-
- 220 SGRO, S.; FERGUSON, A. V.; RENAUD, L. P. Subfornical organ-supraoptic nucleus connections: an electrophysiologic study in the rat. **Brain Research**, v. 303, n. 1, p. 7-13, 1984.
- 221 TANAKA, J. et al. Subfornical organ neurons projecting to the hypothalamic supraoptic nucleus in the rat. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, n. 4, p. 813-6, 1986.
- 222 FERGUSON, A. V.; DAY, T. A.; RENAUD, L. P. Subfornical organ efferents influence the excitability of neurohypophyseal and tuberoinfundibular paraventricular nucleus neurons in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 39, n. 5, p. 423-8, 1984.
- 223 TANAKA, J. et al. Efferent pathways from the region of the subfornical organ to hypothalamic paraventricular nucleus: an electrophysiological study in the rat. **Experimental Brain Research**, v. 62, n. 3, p. 509-14, 1986.
- 224 MASON, W. T. Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. **Nature**, v. 287, n. 5778, p. 154-7, 1980.
- 225 GROSS, P. M. et al. Differences in function and structure of the capillary endothelium in the supraoptic nucleus and pituitary neural lobe of rats. Evidence for the supraoptic nucleus as an osmometer. **Neuroendocrinology**, v. 44, n. 4, p. 401-7, 1986.
- 226 HUSSY, N. et al. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 2, p. 113-34, 2000.
- 227 BOURQUE, C. W. Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurones by hyperosmotic stimuli. **The Journal of Physiology**, v. 417, p. 263-77, 1989.
- 228 QIU, D. L. et al. Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 355, n. 1-2, p. 117-20, 2004.
- 229 OLIET, S. H.; BOURQUE, C. W. Properties of supraoptic magnocellular neurones isolated from the adult rat. **The Journal of Physiology**, v. 455, p. 291-306, 1992.
- 230 OLIET, S. H.; BOURQUE, C. W. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. **Nature**, v. 364, n. 6435, p. 341-3, 1993.
- 231 ZHANG, Z. et al. Actin filaments mediate mechanical gating during osmosensory transduction in rat supraoptic nucleus neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 15, p. 4008-13, 2007.
- 232 LIEDTKE, W. et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 525-35, 2000.
- 233 CARRENO, F. R.; JI, L. L.; CUNNINGHAM, J. T. Altered central TRPV4 expression and lipid raft association related to inappropriate vasopressin secretion in cirrhotic
-
-

-
-
- rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 2, p. R454-66, 2009.
- 234 LIEDTKE, W.; FRIEDMAN, J. M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4^{-/-}* mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13698-703, 2003.
- 235 CIURA, S.; LIEDTKE, W.; BOURQUE, C. W. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 41, p. 14669-76, 2011.
- 236 SHARIF NAEINI, R. et al. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 93-8, 2006.
- 237 AMIN, M. S. et al. Distribution of epithelial sodium channels and mineralocorticoid receptors in cardiovascular regulatory centers in rat brain. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 6, p. R1787-97, 2005.
- 238 BENOS, D. J. et al. Structure and function of amiloride-sensitive Na⁺ channels. **The Journal of Membrane Biology**, v. 143, n. 1, p. 1-18, 1995.
- 239 CHANDRASHEKAR, J. et al. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. **Nature**, v. 464, n. 7286, p. 297-301, 2010.
- 240 LIN, W. et al. Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 405, n. 3, p. 406-20, 1999.
- 241 MILLER, R. L. et al. ENaC-expressing neurons in the sensory circumventricular organs become c-Fos activated following systemic sodium changes. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 10, p. R1141-52, 2013.
- 242 TERUYAMA, R. et al. Epithelial Na⁺ sodium channels in magnocellular cells of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. **American journal of physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 3, p. E273-85, 2012.
- 243 BLOCK, M. L.; FISHER, A. E. Anticholinergic central blockade of salt-aroused and deprivation-induced drinking. **Physiology & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 525-7, 1970.
- 244 FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L.; SIMPSON, J. B. Fluid intake, distribution, and excretion during lateral ventricular infusions of carbachol in rats. **Brain Research**, v. 332, n. 2, p. 237-45, 1985.
- 245 ASNAR, D. S. et al. Involvement of central cholinergic mechanisms on sodium intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience Letters**, v. 534, p. 188-92, 2013.
-
-

- 246 FITZSIMONS, J. T.; FULLER, L. M. Effects of angiotensin or carbachol on sodium intake and excretion in adrenalectomized or deoxycorticosterone-treated rats. **The Journal of Physiology**, v. 359, p. 447-58, 1985.
- 247 LEE, W. J. et al. Effect of brain angiotensin II AT₁, AT₂, and cholinergic receptor antagonism on drinking in water-deprived rats. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1-2, p. 41-6, 1996.
- 248 ROCHA, M. J. A.; FRANCI, C. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MSA) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). **Physiology & Behavior**, v. 34, n. 1, p. 23-8, 1985.
- 249 COLOMBARI, D. S. et al. Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 249-54, 1994.
- 250 EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T.; ROLLS, B. J. Drinking induced by injection of angiotensin into the rain of the rat. **The Journal of Physiology**, v. 210, n. 2, p. 457-74, 1970.
- 251 MAHON, J. M. et al. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin-(1-7) or carbachol. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 199-208, 1995.
- 252 RADIO, G. J. et al. Hydration changes produced by central infusion of angiotensin II. **American Journal of Physiology**, v. 223, n. 5, p. 1221-6, 1972.
- 253 AVRITH, D. B.; FITZSIMONS, J. T. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. **The Journal of Physiology**, v. 301, p. 349-64, 1980.
- 254 XU, Z.; HERBERT, J. Regional suppression by water intake of c-fos expression induced by intraventricular infusions of angiotensin II. **Brain Research**, v. 659, n. 1-2, p. 157-68, 1994.
- 255 HOGARTY, D. C.; TRAN, D. N.; PHILLIPS, M. I. Involvement of angiotensin receptor subtypes in osmotically induced release of vasopressin. **Brain Research**, v. 637, n. 1-2, p. 126-32, 1994.
- 256 SLADEK, C. D.; JOYNT, R. J. Role of angiotensin in the osmotic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. **Endocrinology**, v. 106, n. 1, p. 173-8, 1980.
- 257 ROHMEISS, P. et al. Osmotically induced natriuresis and blood pressure response involves angiotensin AT₁ receptors in the subfornical organ. **Journal of Hypertension**, v. 13, n. 12 Pt 1, p. 1399-404, 1995.

-
-
- 258 ROHMEISS, P. et al. NaCl injections in brain induce natriuresis and blood pressure responses sensitive to ANG II AT₁ receptors. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 269, n. 2 Pt 2, p. F282-8, 1995.
- 259 TIRUNEH, M. A.; HUANG, B. S.; LEENEN, F. H. Role of angiotensin II type 1 receptors in the subfornical organ in the pressor responses to central sodium in rats. **Brain Research**, v. 1527, p. 79-86, 2013.
- 260 KRALY, F. S. et al. Angiotensin AT₁ and AT₂ receptors contribute to drinking elicited by eating in rats. **Physiology & Behavior**, v. 58, n. 6, p. 1099-109, 1995.
- 261 BLAIR-WEST, J. R. et al. Thirst induced by increasing brain sodium concentration is mediated by brain angiotensin. **Brain Research**, v. 637, n. 1-2, p. 335-8, 1994.
- 262 DI NICOLANTONIO, R.; MENDELSON, F. A.; HUTCHINSON, J. S. Central angiotensin converting enzyme blockade and thirst. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 18, n. 5, p. 731-5, 1983.
- 263 KIRBY, R. F.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Effects of a non-peptide angiotensin receptor antagonist on drinking and blood pressure responses to centrally administered angiotensins in the rat. **Brain Research**, v. 576, n. 2, p. 348-50, 1992.
- 264 MANGIAPANE, M. L.; SIMPSON, J. B. Pharmacologic independence of subfornical organ receptors mediating drinking. **Brain Research**, v. 178, n. 2-3, p. 507-17, 1979.
- 265 HOFFMAN, W. E.; PHILLIPS, M. I. Independent receptors for pressor and drinking responses to central injections of angiotensin II and carbachol. **Brain Research**, v. 124, n. 2, p. 305-15, 1977.
- 266 YAMAGUCHI, K.; HAMA, H. Evaluation for roles of periventricular cholinergic receptors in vasopressin secretion in response to angiotensin II and an osmotic stimulus. **Brain Research**, v. 496, n. 1-2, p. 345-50, 1989.
- 267 FITZSIMONS, J. T.; SETLER, P. E. The relative importance of central nervous catecholaminergic and cholinergic mechanisms in drinking in response to antidiuretic and other thirst stimuli. **The Journal of Physiology**, v. 250, n. 3, p. 613-31, 1975.
- 268 NICOLETTA, P. et al. Interaction between renin-angiotensin system and cholinergic system in brain. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 11, p. 1269-75, 1983.
- 269 WANG, M. et al. Role of brain angiotensin AT₁ receptor in the carbachol-induced natriuresis and expression of nNOS in the locus coeruleus and proximal convoluted tubule. **Physiological Research**, v. 56, n. 4, p. 383-91, 2007.
- 270 JIANG, C. L. et al. The role of brain AT₁ receptor in renal sodium and water excretion and the change of TH-IR in hypothalamus. **Chinese Journal of Applied Physiology**, v. 19, n. 4, p. 372-6, 2003.
-
-

-
-
- 271 SHIGEMURA, N. et al. Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 15, p. 6267-77, 2013.
- 272 MANN, J. F.; JOHNSON, A. K.; GANTEN, D. Plasma angiotensin II: dipsogenic levels and angiotensin-generating capacity of renin. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 238, n. 5, p. R372-7, 1980.
- 273 KRALY, F. S.; CORNEILSON, R. Angiotensin II mediates drinking elicited by eating in the rat. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 2 Pt 2, p. R436-42, 1990.
- 274 NICOLAIDIS, S. et al. Iontophoretic investigation of identified SFO angiotensin responsive neurons firing in relation to blood pressure changes. **Brain Research Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 357-63, 1983.
- 275 ISHIBASHI, S. et al. Neuronal responses in subfornical organ and other regions to angiotensin II applied by various routes. **Brain Research Bulletin**, v. 14, n. 4, p. 307-13, 1985.
- 276 LI, Z.; FERGUSON, A. V. Angiotensin II responsiveness of rat paraventricular and subfornical organ neurons in vitro. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 197-207, 1993.
- 277 BURANARUGSA, P.; HUBBARD, J. I. The neuronal organization of the rat subfornical organ in vitro and a test of the osmo- and morphine-receptor hypotheses. **The Journal of Physiology**, v. 291, p. 101-16, 1979.
- 278 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. R382-9, 1980.
- 279 SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. **Science**, v. 181, n. 105, p. 1172-5, 1973.
- 280 ANDERSON, J. W.; SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Subfornical organ neurons projecting to paraventricular nucleus: whole-cell properties. **Brain Research**, v. 921, n. 1-2, p. 78-85, 2001.
- 281 HATTORI, Y. et al. Atrial natriuretic polypeptide depresses angiotensin II induced excitation of neurons in the rat subfornical organ in vitro. **Brain Research**, v. 443, n. 1-2, p. 355-9, 1988.
- 282 SCHMID, H. A.; RAUCH, M.; KOCH, J. Effect of calcitonin on the activity of ANG II-responsive neurons in the rat subfornical organ. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 6 Pt 2, p. R1646-52, 1998.
- 283 TANAKA, J.; MIYAKUBO, H.; NOMURA, M. Estrogen decreases the responsiveness of subfornical organ neurons to angiotensinergic neural inputs from the lateral hypothalamic area in the female rat. **Experimental Neurology**, v. 171, n. 2, p. 301-7, 2001.
-
-

-
-
- 284 SMITH, P. M. et al. The subfornical organ: a central nervous system site for actions of circulating leptin. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p. R512-20, 2009.
- 285 WILSON, K. M.; ROWLAND, N.; FREGLY, M. J. Drinking: a final common pathway? **Appetite**, v. 5, n. 1, p. 31-8, 1984.
-
-

APÊNDICE

ANGIOTENSINERGIC AND CHOLINERGIC RECEPTORS OF THE SUBFORNICAL ORGAN MEDIATE SODIUM INTAKE INDUCED BY GABAergic ACTIVATION OF THE LATERAL PARABRACHIAL NUCLEUS

C. F. RONCARI,^{a,b,c} R. B. DAVID,^{a,b,c} R. F. JOHNSON,^{b,c}
P. M. DE PAULA,^a D. S. A. COLOMBARI,^a
L. A. DE LUCA, Jr.,^a A. K. JOHNSON,^{b,c}
E. COLOMBARI^a AND J. V. MENANI^{a*}

^a Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^b Department of Psychology, The Cardiovascular Center, University of Iowa, Iowa City, IA, USA

^c Department of Pharmacology, The Cardiovascular Center, University of Iowa, Iowa City, IA, USA

Abstract—Bilateral injections of the GABA_A agonist muscimol into the lateral parabrachial nucleus (LPBN) induce 0.3 M NaCl and water intake in satiated and normovolemic rats, a response reduced by intracerebroventricular (icv) administration of losartan or atropine (angiotensinergic type 1 (AT₁) and cholinergic muscarinic receptor antagonists, respectively). In the present study, we investigated the effects of the injections of losartan or atropine into the subfornical organ (SFO) on 0.3 M NaCl and water intake induced by injections of muscimol into the LPBN. In addition, using intracellular calcium measurement, we also tested the sensitivity of SFO-cultured cells to angiotensin II (ANG II) and carbachol (cholinergic agonist). In male Holtzman rats with cannulas implanted bilaterally into the LPBN and into the SFO, injections of losartan (1 µg/0.1 µl) or atropine (2 nmol/0.1 µl) into the SFO almost abolished 0.3 M NaCl and water intake induced by muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) injected into the LPBN. In about 30% of the cultured cells of the SFO, carbachol and ANG II increased intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i). Three distinct cell populations were found in the SFO, i.e., cells activated by either ANG II (25%) or carbachol (2.6%) or by both stimuli (2.3%). The results suggest that the activation of angiotensinergic and cholinergic mechanisms in the SFO is important for NaCl and water intake induced by the deactivation of LPBN inhibitory mechanisms with muscimol injections. They also show that there are cells in the SFO activated by both angiotensinergic and cholinergic stimuli, perhaps those involved in the responses to muscimol into the LPBN.
© 2013 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: sodium appetite, parabrachial nucleus, subfornical organ, AT₁ receptor, muscarinic receptor.

INTRODUCTION

The lateral parabrachial nucleus (LPBN), a pontine structure located dorsally to the superior cerebellar peduncle (scp), is an important area for the control of sodium and water intake (Ohman and Johnson, 1986, 1995; Menani and Johnson, 1995; Colombari et al., 1996; Menani et al., 1996; Callera et al., 2005; De Oliveira et al., 2008; De Gobbi et al., 2009). Electrolytic or neurotoxic lesions of the LPBN increase water intake induced by angiotensin II (ANG II) (Ohman and Johnson, 1986; Edwards and Johnson, 1991). Bilateral injections of the serotonergic receptor antagonist methysergide into the LPBN increase 0.3 M NaCl and water intake induced by dipsogenic and natriorexigenic stimuli (Menani and Johnson, 1995; Colombari et al., 1996; Menani et al., 1996, 1998b, 2002; De Gobbi et al., 2000; David et al., 2008). Similar to methysergide, the blockade of cholecystokinin, corticotrophin release factor or glutamate receptors, or the activation of α₂-adrenoceptors in the LPBN increases 0.3 M NaCl intake induced by the combined treatment with subcutaneous (sc) injection of the diuretic furosemide (FURO) and low dose of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril (CAP) (Menani and Johnson, 1998; De Gobbi et al., 2001, 2009; Andrade et al., 2004; De Castro e Silva et al., 2006; Gasparini et al., 2009). These neurotransmitters could modulate the activity of the LPBN and, consequently, its inhibitory action on the ingestion induced by different facilitatory stimuli.

The importance of the LPBN inhibitory mechanisms for sodium satiety is also demonstrated by studies that have tested the effects of GABAergic activation in the LPBN (Callera et al., 2005; Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013). In satiated and normovolemic rats, bilateral injections of muscimol (GABA_A receptor agonist) into the LPBN induce a strong 0.3 M NaCl and water intake (Callera et al., 2005; Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013). More recent studies showed that 0.3 M NaCl and water intake induced by muscimol injected into the LPBN was reduced by injections of losartan (angiotensinergic type 1 (AT₁) receptor antagonist) or atropine (muscarinic cholinergic receptor antagonist) into the lateral ventricle (LV), suggesting that sodium

*Corresponding author. Address: Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP 14801-903, Brazil. Tel: +55-16-3301-6486; fax: +55-16-3301-6488.

E-mail address: menani@foar.unesp.br (J. V. Menani).

Abbreviations: aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ANG II, angiotensin II; ANOVA, analysis of variance; AT₁, angiotensinergic type 1; b. wt., body weight; [Ca²⁺]_i, intracellular calcium concentration; CAP, captopril; FURO, furosemide; icv, intracerebroventricular; III-V, third ventricle; LPBN, lateral parabrachial nucleus; SFO, subfornical organ.

intake in this condition depends on the blockade of LPBN inhibitory mechanisms by muscimol combined with the activation of angiotensinergic and cholinergic facilitatory mechanisms probably located in the forebrain (Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013).

An important area of the forebrain involved in the control of sodium and water intake is the subfornical organ (SFO), a circumventricular organ located in the lamina terminalis (Simpson and Routtenberg, 1972, 1973, 1974; Simpson et al., 1978; Mangiapane and Simpson, 1980; Johnson and Gross, 1993). The activation of the AT₁ or cholinergic receptors in the SFO induces dipsogenic responses (Routtenberg and Simpson, 1971; Simpson and Routtenberg, 1972, 1973, 1974; Simpson et al., 1978; Mangiapane and Simpson, 1980). In addition, the activation of AT₁ receptors in the SFO by the injection of ANG II directly in this area or by the treatment with FURO + CAP induces vigorous ingestion of 0.3 M NaCl if the serotonergic inhibitory mechanism is blocked by the injection of methysergide into the LPBN, suggesting that an important facilitatory mechanism for sodium intake involving AT₁ receptors is present in the SFO (Colombari et al., 1996; Menani et al., 1998a). Moreover, these studies suggested that the facilitatory mechanisms of the SFO are strongly inhibited by the LPBN mechanisms. Therefore, it is possible that AT₁ receptors of the SFO are part of the facilitatory mechanisms involved in sodium intake induced by muscimol injected into the LPBN. Although never investigated, it is also possible an involvement of the cholinergic mechanisms of the SFO with sodium intake, particularly sodium intake induced by muscimol into the LPBN, that has been suggested to also depend on central cholinergic mechanisms (Asnar et al., 2013).

In the present study, we investigated the possible participation of the AT₁ and the cholinergic receptors of the SFO on 0.3 M NaCl and water intake induced by injections of muscimol into the LPBN in satiated and normovolemic rats. Additionally, using intracellular calcium measurement, we also tested the sensitivity of SFO-cultured cells to ANG II and the cholinergic agonist carbachol.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Twenty-six male Holtzman rats weighing 290–310 g were used for *in vivo* experiments. Animals were housed in individual stainless steel cages with free access to normal sodium diet (BioBase Rat Chow, Águas Frias, Brazil), water, and 0.3 M NaCl solution. Room temperature was maintained at 23 ± 2 °C, humidity at $55 \pm 10\%$ and on a 12:12-h light–dark cycle. *In vivo* experimental procedures were approved by Ethics Committee in Animal Use (CEUA) from the School of Dentistry – UNESP. The experimental protocols followed the U.S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, 1996). For *in vitro* experiments, 11 Sprague–Dawley preweaning pups (18–20 days old) were used (Harlan laboratories, Indianapolis, USA). The

mother and pups were housed together in a light-controlled room (12:12-h light–dark cycle) with food (7013 National Institutes of Health-31 modified rat diet) and water provided *ad libitum* for 4–7 days before they were used. *In vitro* experiments were conducted in accordance with the National Research Council Institute for Laboratory Animal Research Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the University of Iowa Animal Care and Use Committee.

Brain surgery

Rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg of body weight (b. wt.); Cristália, Itapira, Brazil) combined with xylazine (7 mg/kg of b. wt.; Agener União, Embu-Guaçu, Brazil) intraperitoneally, placed in a stereotaxic instrument (Kopf, Tujunga, CA, USA) with the skull leveled between bregma and lambda. Two stainless steel 23-gauge guide cannulas were bilaterally implanted immediately above the LPBN (coordinates: 9.6 mm caudal to bregma, 2.1 mm lateral to midline, and 3.1 mm below dura mater) and a third cannula was implanted immediately above the SFO (coordinates: 1.2 mm caudal to bregma, on the midline, and 2.7 mm below dura mater). The tips of the guide cannulas were positioned at a point 2 mm above the LPBN and SFO. The guide cannulas were fixed to the cranium using dental acrylic resin and jeweler screws. Between tests, a 30-gauge metal obturator filled the guide cannulas. At the end of the surgery, the animals received an intramuscular injection of antibiotic (benzylpenicillin – 80,000 IUs plus streptomycin – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brazil) and a sc injection of analgesic/anti-inflammatory (ketoprofen 1% – 0.03 ml/rat; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, Brazil). After the surgery, the rats were handled daily and trained for the experimental procedure. Water and 0.3 M NaCl intake tests began after a 5-day period of recovery.

Central injections

Injections into the LPBN and SFO were made using 5 μ l Hamilton syringes (Hamilton, Reno, NV, USA) connected by polyethylene tubing (PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) to a 30-gauge injection cannula. At the time of testing, rats were removed from the cages, metal obturators were removed and the injection cannula (2 mm longer than the guide cannula) was inserted into the guide cannula. Injection volumes into the LPBN and SFO were 0.2 μ l each site and 0.1 μ l, respectively. The metal obturators were replaced after injections and the rats were placed back into their cages.

Drugs centrally injected

Muscimol HBr, GABA_A receptor agonist (Research Biochemicals International – RBI, Natick, MA, USA) was dissolved in saline and administered in the LPBN at the dose of 0.5 nmol/0.2 μ l. Losartan potassium, AT₁ receptor antagonist (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) was dissolved in vehicle (phosphate buffer saline – PBS)

and administered into the SFO at the dose of 1 $\mu\text{g}/0.1 \mu\text{l}$. Atropine methyl bromide, muscarinic cholinergic receptor antagonist (Sigma–Aldrich) was dissolved in vehicle and administered into the SFO at the dose of 2 nmol/0.1 μl .

Water and 0.3 M NaCl intake tests

Rats were tested in their home cages. Water and 0.3 M NaCl were provided from burettes with 0.1 ml divisions that were fitted with metal drinking spouts. Rats had no access to food during the tests. A recovery period of at least 2 days was allowed between tests.

Satiated and normovolemic rats received injections of losartan (1 $\mu\text{g}/0.1 \mu\text{l}$), atropine (2 nmol/0.1 μl) or vehicle (0.1 μl) into the SFO followed immediately by bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μl) or saline (0.2 μl) into the LPBN. Cumulative intake of 0.3 M NaCl and water was measured every 30 min for 240 min, starting immediately after LPBN injections. The sequence of the treatments into the SFO and LPBN was randomized and each rat received all the four combinations of treatments: (1) vehicle into the SFO + saline into the LPBN, (2) vehicle into the SFO + muscimol into the LPBN, (3) losartan into the SFO + muscimol into the LPBN, (4) atropine into the SFO + muscimol into the LPBN.

Histology

At the end of the last intake test, rats received injections of 2% Evans Blue solution into each site in the same volume used for drug injections. They were then deeply anesthetized with sodium thiopental (80 mg/kg of b. wt.; Cristália) and perfused transcardially with saline followed by 10% formalin. Brains were removed, fixed in 10% formalin, frozen, cut in 50- μm sections, stained with Giemsa stain, and analyzed by light microscopy to confirm the injection sites into the LPBN and SFO.

Cell culture

Cells of the SFO were obtained and cultured for studies. Briefly, rat pups were decapitated, and the head was placed in ice-cold 70% ethanol. The brain was removed immediately and placed in a petri plate with ice-cold cutting solution (220 mM sucrose, 3 mM KCl, 0.2 mM CaCl_2 , 10 mM dextrose, 6 mM MgSO_4 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3). A thick coronal slice was made to include tissue from the rostral level of the optic chiasm caudal to the collicular level and a stereo microscope was used to identify the SFO. Isolated SFOs from five or six pups were pooled and transferred to a tube containing Earle's balanced salt solution (Sigma–Aldrich) and dispase I (4 U/2 ml; Roche, Indianapolis, IN, USA) and incubated for 1 h at 37 °C. After three washes in culture medium, a cell suspension was prepared by trituration of the fragments through a fire-polished Pasteur pipette until the tissue fragments were visibly dissociated. Several drops of the cell suspension were plated onto previously precoated (0.1 mg poly-L-lysine/ml; Sigma–Aldrich) round 22-mm coverslips and incubated in a humidified atmosphere (plus 5% CO_2) at 37 °C. Additional culture medium was

added after 2–4 h postplating to allow the cells to adhere to the coverslips. The culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma–Aldrich) with 10% fetal bovine serum (heat inactivated at 56 °C for 30 min; Sigma–Aldrich) and 1% L-glutamine–penicillin–streptomycin solution (Sigma–Aldrich) added.

Intracellular calcium measurement

Intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was measured with Fluo-4AM, a fluorescent calcium indicator. Cells were loaded with Fluo-4AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by incubating cells in artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 10 mM dextrose, 1 mM MgSO_4 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3) containing 0.02 mM Fluo-4AM for 60 min at 37 °C. During the incubation, Fluo-4AM is absorbed by cells and hydrolyzed only within living cells to impermeant Fluo-4. For $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements and pharmacological manipulations, the coverslip containing the incubated cells was mounted in a bath chamber that was attached to the microscope stage. An increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produces an increase in Fluo-4 fluorescence intensity with only a little shift in wavelength. Fluorescence intensity was measured using a video microscopic digital image analysis system (FluoView 500 Confocal Laser Scanning Microscope; Olympus, Center Valley, PA, USA) using a 488-nm Argon laser as an excitation source. Experiments were performed in SFO cells after 3 days in culture. The fluorescence intensity was recorded during baseline conditions using aCSF as bath solution. After baseline recording, the bath solution was removed and 0.1 μM ANG II or 100 μM carbachol was diluted into the bath chamber. The fluorescence intensity was recorded one minute after applying the solutions. ANG II and carbachol were dissolved in aCSF and tested in a counterbalanced design with an interval of 10 min between tests. At the end of the experiment, data were analyzed and the fluorescence intensity converted to numerical values. A response to stimulation was discerned as a sudden increase in fluorescence intensity and represented as a percentage change from baseline recording. The percentage of cells sensitive to only ANG II, only carbachol or both was also analyzed. The manipulation of removing and applying bath solution can induce a small change in fluorescence intensity ($2.99 \pm 0.67\%$). Therefore, only cells that presented a change in fluorescence intensity greater than 8.7% (average plus two standard deviations) were considered as being sensitive to the solution applied. Cell viability was checked at the end of the experiment by applying aCSF containing 50 mM KCl (substituting an equimolar amount of NaCl). All procedures were performed in the dark and at room temperature (24 ± 2 °C).

Statistical analysis

Results are reported as means \pm SEM. For *in vivo* experiments two-way analysis of variance (ANOVA) using treatments and times as factors followed by Student–Newman–Keuls tests was used for

comparisons. One-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls were used to analyze $[Ca^{2+}]_i$ measurements data. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Histological analysis

Fig. 1 shows the typical injection sites into the SFO and LPBN.

The SFO injections were considered properly positioned if the dye was visible only in the parenchyma of the SFO, with no rupture of the ependyma that separates the SFO from the dorsal portion of the third ventricle (III-V). Injections outside the SFO were also analyzed and classified as: (a) injection in the dorsal portion of the III-V, if the ependyma was destroyed and no sign of injections in the SFO parenchyma detected or, (b) injection into the tissue adjacent to the SFO, if the injection site was not into the SFO tissue or in the III-V.

The center of the LPBN injections was located in the central and dorsal portions of the LPBN [see Fulwiler and Saper (1984) for definitions of the LPBN subnuclei]. The sites of the injections into the LPBN in the present study were similar to those of previous studies that showed effects of muscimol into the LPBN on NaCl and water intake (Callera et al., 2005; De Oliveira et al., 2007; Andrade-Franzé et al., 2010a; Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013).

Water and 0.3 M NaCl intake induced by GABAergic activation of the LPBN in rats treated with injection of losartan or atropine into the SFO

Bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN combined with SFO injection of vehicle in satiated and normovolemic rats induced 0.3 M NaCl (34.5 ± 2.2 ml/4 h, vs. saline into LPBN: 0.4 ± 0.1 ml/4 h) [$F(3,24) = 63.90$; $P < 0.05$] and water intake (12.7 ± 2.4 ml/4 h, vs. saline into LPBN: 0.2 ± 0.1 ml/4 h)

[$F(3,24) = 11.42$; $P < 0.05$] (Fig. 2). The SFO injections of losartan (1 μ g/0.1 μ l) or atropine (2 nmol/0.1 μ l) reduced 0.3 M NaCl (6.6 ± 1.9 and 8.4 ± 2.2 ml/4 h, respectively) and water intake (4.0 ± 1.0 and 2.5 ± 1.0 ml/4 h, respectively) induced by muscimol injected into the LPBN.

Changes of $[Ca^{2+}]_i$ in cultured SFO cells treated with ANG II or carbachol

Acute application of 0.1 μ M ANG II or 100 μ M carbachol increased Fluo-4 fluorescence intensity in sensitive SFO cells by $44.8 \pm 2.5\%$ and $19.0 \pm 3.4\%$, respectively [$F(2,280) = 427.63$; $P < 0.05$] (Fig. 3). A significant number of SFO cells tested were sensitive to only ANG II (24.9%) (Table 1). A small number of the SFO cells tested were sensitive to only carbachol (2.6%) or to carbachol and ANG II (2.3%) (Table 1). As a control, cells from the cortex were obtained and cultured. None of the cells tested presented an increase in Fluo-4 fluorescence intensity after acute application of ANG II or carbachol.

Specificity of the SFO and the LPBN as the sites where injections of losartan or atropine and muscimol, respectively, produce the effects described in the present study

The specificity of the SFO as the site of losartan and atropine action was confirmed by results from animals that received injections of muscimol into the LPBN combined with losartan or atropine injection into the III-V or in the tissue surrounding the SFO. Bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN induced 0.3 M NaCl [$F(3,21) = 42.55$, $P < 0.05$] and water intake [$F(3,21) = 24.47$, $P < 0.05$] and the treatment with losartan (1 μ g/0.1 μ l) or atropine (2 nmol/0.1 μ l) injected into the III-V did not affect the ingestion of 0.3 M NaCl or water produced by muscimol injected into the LPBN (Table 2). Muscimol-induced 0.3 M NaCl [$F(3,15) = 21.48$, $P < 0.05$] and water intake [$F(3,15) = 86.89$, $P < 0.05$] was also not modified by

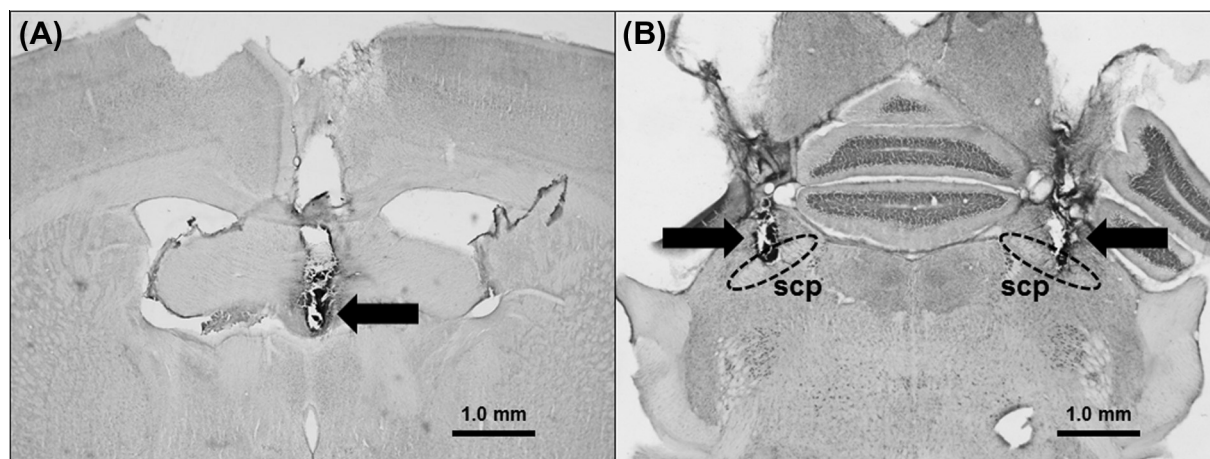


Fig. 1. Photomicrographs of coronal brain sections from an animal representative of the group tested showing (arrows) the typical sites of injections into the (A) SFO and (B) LPBN. scp, superior cerebellar peduncle (delimited by dashed lines in B). Black bar in A and B = 1.0 mm.

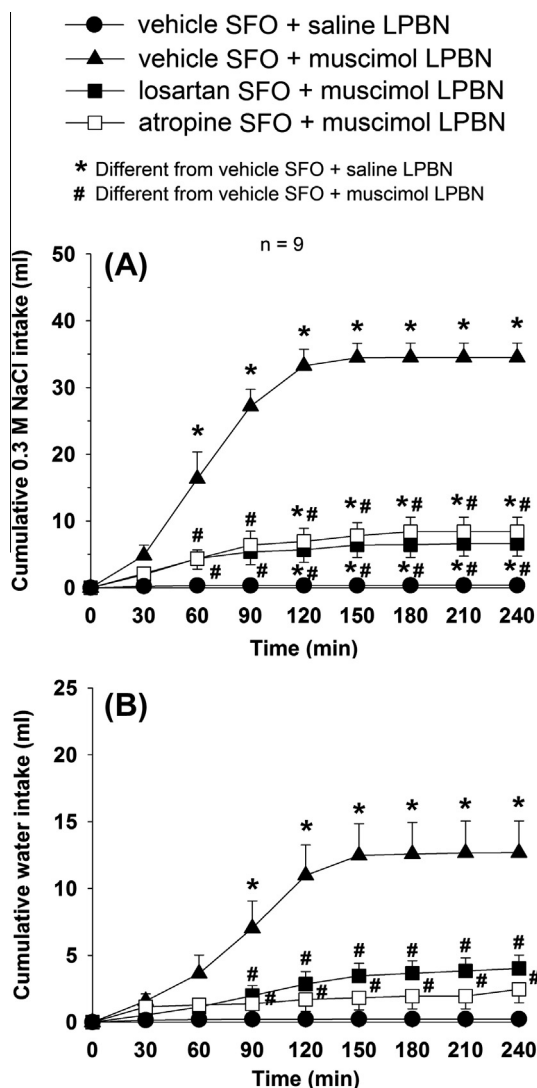


Fig. 2. Cumulative (A) 0.3 M NaCl and (B) water intake in satiated and normovolemic rats that received bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) or saline into LPBN combined with injection of losartan (1 μ g/0.1 μ l), atropine (2 nmol/0.1 μ l) or vehicle (PBS) into the SFO. Values are reported as means \pm SEM; n = number of animals.

the injection of losartan (1 μ g/0.1 μ l) or atropine (2 nmol/0.1 μ l) in the tissue surrounding the SFO (Table 3).

Bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) in sites outside the LPBN combined with SFO injection of vehicle, losartan (1.0 μ g/0.1 μ l) or atropine (2 nmol/0.1 μ l) in satiated and normovolemic rats induced no significant intake of 0.3 M NaCl (0.8 ± 0.1 , 0.4 ± 0.3 and 0.6 ± 0.3 ml/4 h, respectively, $n = 3$) or water intake (1.0 ± 0.3 , 0.5 ± 0.2 and 1.0 ± 0.7 ml/4 h, respectively).

DISCUSSION

The present results show that the blockade of angiotensinergic or cholinergic mechanisms in the SFO almost abolishes NaCl and water intake induced by muscimol injections into the LPBN in satiated and normovolemic rats, suggesting that the activity of these

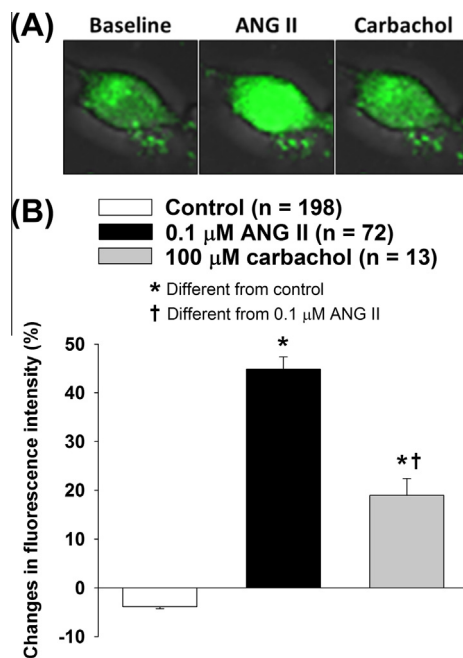


Fig. 3. (A) Representative Fluo-4 fluorescent images of SFO cells in control condition (left) and after applying ANG II (middle) or carbachol (right). (B) Changes in fluorescence intensity induced by acute application of ANG II or carbachol. Values are reported as means \pm SEM; n = number of cells.

Table 1. Percentage of cultured SFO cells sensitive to acute application of ANG II and/or carbachol

Stimulus	%	n
Only ANG II	24.9	66
Only carbachol	2.6	7
Both	2.3	6
None	70.2	186

Values are represented as percentage of the total number of cells tested. ANG II (0.1 μ M); carbachol (100 μ M); n = number of cells.

mechanisms in the SFO is necessary for NaCl and water intake to muscimol injected into the LPBN. In addition, *in vitro* studies showed that SFO-cultured cells are activated by the acute application of ANG II or carbachol and can be classified as those sensitive to only ANG II, only carbachol or to both stimuli.

In agreement with earlier findings (Callera et al., 2005; Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013), bilateral injections of muscimol in sites outside the LPBN did not induce NaCl or water intake, confirming again the specificity of the LPBN as the site where muscimol injections induce NaCl and water intake. The specificity of the SFO as the site of losartan and atropine action was also confirmed by the results showing that injections of losartan or atropine into the III-V just below the SFO or in the tissue surrounding the SFO did not affect 0.3 M NaCl and water intake induced by muscimol injected into the LPBN.

It is worth noting that injections of muscimol into the LPBN induce 0.3 M NaCl and water intake in satiated and normovolemic rats, i.e., animals that were not subjected to any treatment that induces the activation of

Table 2. Cumulative 0.3 M NaCl and water intake by satiated and normovolemic rats that received bilateral injections of muscimol or saline into the LPBN combined with injection of losartan, atropine or vehicle into the III-V

Treatment	60 min	120 min	180 min	240 min
<i>0.3 M NaCl intake (ml)</i>				
Vehicle III-V + saline LPBN	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.4
Vehicle III-V + muscimol LPBN	8.4 ± 4.2*	23.7 ± 3.2*	32.3 ± 2.5*	32.3 ± 2.5*
Losartan III-V + muscimol LPBN	2.7 ± 1.3	19.0 ± 3.1*	27.6 ± 1.6*	27.6 ± 1.6*
Atropine III-V + muscimol LPBN	4.2 ± 1.6	23.0 ± 1.6*	26.6 ± 2.3*	26.6 ± 2.3*
<i>Water intake (ml)</i>				
Vehicle III-V + saline LPBN	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4
Vehicle III-V + muscimol LPBN	2.5 ± 0.6	14.2 ± 2.1*	18.8 ± 2.4*	18.9 ± 2.5*
Losartan III-V + muscimol LPBN	1.3 ± 0.6	10.9 ± 2.2*	16.3 ± 2.4*	16.3 ± 2.4*
Atropine III-V + muscimol LPBN	1.1 ± 0.5	12.9 ± 1.4*	15.3 ± 1.6*	15.4 ± 1.6*

Results are reported as means ± SEM.

* Different from vehicle III-V + saline LPBN; n = 8. Muscimol (0.5 nmol/0.2 µl); losartan (1 µg/0.1 µl); atropine (2 nmol/0.1 µl); vehicle (PBS, phosphate buffer saline).

Table 3. Cumulative 0.3 M NaCl and water intake by satiated and normovolemic rats that received bilateral injections of muscimol or saline into the LPBN combined with injection of losartan, atropine or vehicle in the tissue surrounding to the SFO

Treatment	60 min	120 min	180 min	240 min
<i>0.3 M NaCl intake (ml)</i>				
Vehicle tissue + saline LPBN	1.5 ± 1.3	1.6 ± 1.3	1.7 ± 1.3	1.7 ± 1.3
Vehicle tissue + muscimol LPBN	8.2 ± 4.8*	32.9 ± 4.3*	39.1 ± 4.3*	39.2 ± 4.3*
Losartan tissue + muscimol LPBN	9.6 ± 7.3	26.0 ± 7.2*	35.5 ± 5.4*	35.4 ± 4.2*
Atropine tissue + muscimol LPBN	10.6 ± 6.1	29.5 ± 3.7*	35.3 ± 4.2*	39.9 ± 5.4*
<i>Water intake (ml)</i>				
Vehicle tissue + saline LPBN	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
Vehicle tissue + muscimol LPBN	1.5 ± 1.0	13.1 ± 1.8*	23.8 ± 1.2*	24.9 ± 1.4*
Losartan tissue + muscimol LPBN	2.4 ± 1.4	13.9 ± 2.6*	21.5 ± 1.2*	22.1 ± 1.5*
Atropine tissue + muscimol LPBN	2.4 ± 1.0	14.3 ± 1.5*	20.1 ± 1.3*	23.8 ± 1.9*

Results are reported as means ± SEM.

* Different from vehicle tissue + saline LPBN; n = 6. Muscimol (0.5 nmol/0.2 µl); losartan (1 µg/0.1 µl); atropine (2 nmol/0.1 µl); vehicle (PBS, phosphate buffer saline).

facilitatory mechanisms for NaCl and water intake. However, the present results suggest that the activity of angiotensinergic and cholinergic facilitatory mechanisms in the SFO is essential for the release of NaCl and water intake when the inhibitory mechanisms are blocked with muscimol injections into the LPBN. These results extend previous studies (Colombari et al., 1996; Menani et al., 1998a; Andrade-Franzé et al., 2010a,b; Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013) that suggested that the activity of forebrain facilitatory mechanisms is necessary for NaCl and water intake to muscimol injections into the LPBN. Therefore, NaCl and water intake induced by LPBN injections of muscimol seems to depend on the combination of the blockade of the inhibitory mechanisms with simultaneous activation of facilitatory mechanisms. These findings suggest that LPBN inhibitory mechanisms are essential to maintain sodium satiety and that angiotensinergic and cholinergic mechanisms in the SFO may stimulate sodium intake if the LPBN inhibitory mechanisms are deactivated even without an extra activation of these facilitatory mechanisms.

Muscimol injections into the LPBN in satiated, normovolemic rats usually induce only a small amount of water intake when only water is available (one-bottle test) (Callera et al., 2005). Therefore, the strong ingestion of water produced by the injections of

muscimol into the LPBN when water and 0.3 M NaCl are simultaneously available (two-bottle test) [(Callera et al., 2005; Roncari et al., 2011; Asnar et al., 2013) and present results] is probably a consequence of the increased plasma osmolarity due to excessive ingestion of hypertonic NaCl. Thus, the reason for the reduced ingestion of water after the blockade of SFO angiotensinergic and cholinergic mechanisms in rats treated with muscimol into the LPBN is probably the reduced ingestion of hypertonic NaCl. Nevertheless, considering the importance of central cholinergic mechanisms for water deprivation- or hyperosmolarity-induced water intake (Block and Fisher, 1970; Lee et al., 1996), in the case of central muscarinic blockade a possible direct effect on the reduction of water intake is also possible.

ANG II acting in the SFO produces a robust 0.3 M NaCl intake when serotonergic mechanisms are inhibited by bilateral injections of methysergide into the LPBN and the AT₁ receptor antagonist losartan into the SFO abolishes the increase of NaCl and water intake induced by the injection of methysergide into the LPBN of rats treated with FURO + CAP (Colombari et al., 1996; Menani et al., 1998a). The results of the present study show that SFO injections of losartan reduce NaCl and water intake induced by muscimol injected into the LPBN of satiated, normovolemic rats. As injections of

losartan into the III-V or in the tissue surrounding the SFO did not modify muscimol-induced sodium or water intake, it is possible to conclude that NaCl and water intake produced by muscimol injected into the LPBN depends on the activation of SFO AT₁ receptors.

Cholinergic mechanisms of the SFO have been implicated in the control of water intake (Block and Fisher, 1970; Fitts et al., 1985a,b). Injections of cholinergic agonists into the ventricular system induce intense dipsogenic responses and electrolytic lesions of the SFO abolish intracerebroventricular (icv) carbachol-induced water intake (Routtenberg and Simpson, 1971; Simpson and Routtenberg, 1972, 1974). The importance of the cholinergic receptors of the SFO for water intake was also demonstrated by the dipsogenic response to injections of carbachol directly into the SFO (Routtenberg and Simpson, 1971). More recent and the present results have suggested that central cholinergic mechanisms are also involved in the control of sodium intake (Menani et al., 2002; Asnar et al., 2013). Earlier results suggested the opposite, since continuous icv infusion of carbachol induced only thirst and no sodium intake in spite of a concomitant heavy loss of extracellular sodium (Fitzsimons and Fuller, 1985; Fitts et al., 1985a). Yet, besides inducing water intake, icv injection of carbachol also induces hypertonic NaCl intake if the LPBN inhibitory mechanisms are deactivated (Menani et al., 2002). Moreover, the present results show that injections of atropine into the SFO reduce 0.3 M NaCl and water intake induced by muscimol injected into the LPBN, suggesting that SFO cholinergic receptors are also involved in the control of hypertonic sodium intake in this condition.

The SFO sends projections to several forebrain areas such as the hypothalamic paraventricular nucleus, supraoptic nucleus and amygdala, which are important sites for the integration and control of effector mechanisms (behavioral, hormonal and autonomic) involved on fluid–electrolyte balance and cardiovascular regulation (Li and Ferguson, 1993; Johnson et al., 1996; Johnson and Thunhorst, 1997; Krause et al., 2011). Early studies showed that the SFO is a main central site for ANG II action to induce pressor and dipsogenic responses (Simpson and Routtenberg, 1973; Simpson et al., 1978; Mangiapane and Simpson, 1980). Additionally, the SFO is involved with central cholinergic-induced water intake (Routtenberg and Simpson, 1971; Simpson and Routtenberg, 1972, 1974). The sensitivity of SFO neurons to angiotensinergic and cholinergic stimuli was previously demonstrated by electrophysiological studies (Buranarugsa and Hubbard, 1979; Ferguson and Bains, 1996; Ferguson et al., 1997, 2001; Johnson et al., 2001; Ferguson, 2009). Further evidence of the sensitivity of SFO neurons to angiotensinergic and cholinergic stimuli are the present results showing that ANG II and carbachol acutely applied increase $[Ca^{2+}]_i$ in dissociated SFO-cultured cells. From the total of SFO cells tested, about 25% were sensitive to only ANG II, 2.6% were sensitive to only carbachol and 2.3% were sensitive to carbachol and ANG II. Cells of the SFO sensitive to both

angiotensinergic and cholinergic stimuli are perhaps those involved in the facilitation of LPBN muscimol-induced sodium and water intake, a response similarly blocked by angiotensinergic or cholinergic antagonist injected into the SFO. More studies are necessary to investigate if cells sensitive to both stimuli are those involved on sodium and water intake to muscimol into the LPBN. However, it is also possible that cholinergic and angiotensinergic sensitive neurons, not necessarily the same neuron, are part of the SFO circuitry involved in the control of sodium and water intake.

In conclusion, the present results show that the activity of angiotensinergic and cholinergic facilitatory mechanisms in the SFO is essential for NaCl and water intake induced by the deactivation of the inhibitory mechanisms with injections of muscimol into the LPBN. This suggests that the activity of facilitatory mechanisms, particularly in the SFO, together with the deactivation of the inhibitory mechanisms, is a condition for strong stimulation of sodium appetite. Considering the presence of different types of cells in the SFO sensitive to ANG II and cholinergic stimuli, future studies are needed to investigate if the AT₁ and cholinergic muscarinic receptors of the SFO implicated in the control of sodium intake are present in the same cell or in different neurons in a local circuit of neurons.

Acknowledgments—The authors thank Terry Beltz for *in vitro* experiments assistance, Silas P. Barbosa, Reginaldo C. Queiroz and Sílvia Fógliã for *in vivo* experiments assistance, Silvana A. D. Malavolta and Marilyn J. Dennis for secretarial assistance, Ana V. de Oliveira and Adriano P. de Oliveira for animal care. Research conducted at the São Paulo State University was supported by CNPq, CAPES, FAPESP and FAPESP-PRONEX (2011/50770-1). Research conducted at the University of Iowa was supported by NIH grants HL-14388, HL-98207, and MH-80241 to AKJ and CAPES-PDEE to CFR and RBD. This study was part of the activities developed by Camila F. Roncari to obtain a PhD degree at the Joint Graduate Program in Physiological Sciences (PIPGCF UFSCar-UNESP).

REFERENCES

- Andrade CAF, Barbosa SP, De Luca Jr LA, Menani JV (2004) Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neuroscience* 129:25–34.
- Andrade-Franzé GM, Andrade CAF, De Luca Jr LA, De Paula PM, Colombari DSA, Menani JV (2010a) Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. *Brain Res* 1332:57–64.
- Andrade-Franzé GM, Andrade CAF, De Luca Jr LA, De Paula PM, Menani JV (2010b) Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. *Neuroscience* 165:633–641.
- Asnar DS, Roncari CF, De Luca LA, de Paula Jr PM, Colombari DS, Menani JV (2013) Involvement of central cholinergic mechanisms on sodium intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. *Neurosci Lett* 534:188–192.
- Block ML, Fisher AE (1970) Anticholinergic central blockade of salt-aroused and deprivation-induced drinking. *Physiol Behav* 5:525–527.
- Buranarugsa P, Hubbard JI (1979) The neuronal organization of the rat subfornical organ *in vitro* and a test of the osmo- and morphine-receptor hypotheses. *J Physiol* 291:101–116.

- Callera JC, De Oliveira LB, Barbosa SP, Colombari DSA, De Luca Jr LA, Menani JV (2005) GABAA receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. *Neuroscience* 134:725–735.
- Colombari DSA, Menani JV, Johnson AK (1996) Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am J Physiol* 271:R1470–R1476.
- David RB, Menani JV, De Luca Jr LA (2008) Serotonergic receptor blockade in the lateral parabrachial nucleus: different effects on hypertonic and isotonic NaCl intake. *Brain Res* 1187:137–145.
- De Castro e Silva E, Fregoneze JB, Johnson AK (2006) Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1136–R1141.
- De Gobbi JIF, De Luca Jr LA, Menani JV (2000) Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Res* 880:131–138.
- De Gobbi JIF, De Luca Jr LA, Johnson AK, Menani JV (2001) Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1301–R1307.
- De Gobbi JIF, Beltz TG, Johnson RF, Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK (2009) Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. *Brain Res* 1301:44–51.
- De Oliveira LB, Callera JC, De Luca Jr LA, Colombari DSA, Menani JV (2007) GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Res Bull* 73:238–247.
- De Oliveira LB, De Luca Jr LA, Menani JV (2008) Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. *Neuroscience* 155:350–358.
- Edwards GL, Johnson AK (1991) Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am J Physiol* 261:R1039–R1044.
- Ferguson AV (2009) Angiotensinergic regulation of autonomic and neuroendocrine outputs: critical roles for the subfornical organ and paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 89:370–376.
- Ferguson AV, Bains JS (1996) Electrophysiology of the circumventricular organs. *Front Neuroendocrinol* 17:440–475.
- Ferguson AV, Bicknell RJ, Carew MA, Mason WT (1997) Dissociated adult rat subfornical organ neurons maintain membrane properties and angiotensin responsiveness for up to 6 days. *Neuroendocrinology* 66:409–415.
- Ferguson AV, Washburn DL, Latchford KJ (2001) Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med* (Maywood) 226:85–96.
- Fitts DA, Thunhorst RL, Simpson JB (1985a) Fluid intake, distribution, and excretion during lateral ventricular infusions of carbachol in rats. *Brain Res* 332:237–245.
- Fitts DA, Thunhorst RL, Simpson JB (1985b) Modulation of salt appetite by lateral ventricular infusions of angiotensin II and carbachol during sodium depletion. *Brain Res* 346:273–280.
- Fitzsimons JT, Fuller LM (1985) Effects of angiotensin or carbachol on sodium intake and excretion in adrenalectomized or deoxycorticosterone-treated rats. *J Physiol* 359:447–458.
- Fulwiler CE, Saper CB (1984) Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 319:229–259.
- Gasparini S, De Luca Jr LA, Colombari DSA, De Paula PM, Barbosa SP, Menani JV (2009) Adrenergic mechanisms of the Kolliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. *Neuroscience* 164:370–379.
- Johnson AK, Gross PM (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* 7:678–686.
- Johnson AK, Thunhorst RL (1997) The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18:292–353.
- Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL (1996) Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:183–191.
- Johnson RF, Beltz TG, Sharma RV, Xu Z, Bhatti RA, Johnson AK (2001) Agonist activation of cytosolic Ca²⁺ in subfornical organ cells projecting to the supraoptic nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1592–R1599.
- Krause EG, de Kloet AD, Scott KA, Flak JN, Jones K, Smeltzer MD, Ulrich-Lai YM, Woods SC, Wilson SP, Reagan LP, Herman JP, Sakai RR (2011) Blood-borne angiotensin II acts in the brain to influence behavioral and endocrine responses to psychogenic stress. *J Neurosci* 31:15009–15015.
- Lee WJ, Kim KS, Yang EK, Lee JH, Lee EJ, Park JS, Kim HJ (1996) Effect of brain angiotensin II AT₁, AT₂, and cholinergic receptor antagonism on drinking in water-deprived rats. *Regul Pept* 66:41–46.
- Li Z, Ferguson AV (1993) Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiol* 265:R302–R309.
- Mangiapane ML, Simpson JB (1980) Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol* 239:R382–R389.
- Menani JV, Johnson AK (1995) Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol* 269:R1044–R1049.
- Menani JV, Johnson AK (1998) Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. *Am J Physiol* 275:R1431–R1437.
- Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK (1996) Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 270:R162–R168.
- Menani JV, Colombari DSA, Beltz TG, Thunhorst RL, Johnson AK (1998a) Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Res* 801:29–35.
- Menani JV, De Luca Jr LA, Johnson AK (1998b) Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol* 274:555–560.
- Menani JV, Barbosa SP, De Luca Jr LA, De Gobbi JIF, Johnson AK (2002) Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R837–R841.
- Ohman LE, Johnson AK (1986) Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol* 251:R504–R509.
- Ohman LE, Johnson AK (1995) Role of lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. *Brain Res* 695:275–278.
- Roncari CF, David RB, De Paula PM, Colombari DS, De Luca Jr LA, Menani JV (2011) Importance of central AT₁ receptors for sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. *Neuroscience* 196:147–152.
- Routtenberg A, Simpson JB (1971) Carbachol-induced drinking at ventricular and subfornical organ sites of application. *Life Sci* 10:481–490.
- Simpson JB, Routtenberg A (1972) The subfornical organ and carbachol-induced drinking. *Brain Res* 45:135–152.
- Simpson JB, Routtenberg A (1973) Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science* 181:1172–1175.
- Simpson JB, Routtenberg A (1974) Subfornical organ: acetylcholine application elicits drinking. *Brain Res* 79:157–164.
- Simpson JB, Epstein AN, Camardo Jr JS (1978) Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rat. *J Comp Physiol Psychol* 92:581–601.