
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

GLÁUCIA MARIA FABRÍCIO DE ANDRADE FRANZÉ

**NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA E NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

ARARAQUARA

2009

**NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA E NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

GLÁUCIA MARIA FABRÍCIO DE ANDRADE FRANZÉ

**NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA E NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

Orientador: José Vanderlei Menani

ARARAQUARA

2009

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

A553nc

Andrade-Franzé, Gláucia Maria Fabrício de.

Núcleo central da amígdala e Núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio / Gláucia Maria Fabrício de Andrade Franzé. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia. 2. Ingestão de água e sódio. 3. Apetite ao sódio. 4. Núcleo central da amígdala. 5. Núcleo parabraquial lateral. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

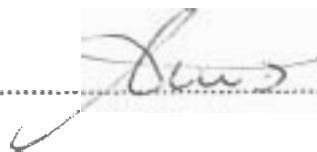
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Gláucia Maria Fabrício de Andrade

Prof. Dr. José Vanderlei Menani.....



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



Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza.....



**AOS MEUS PAIS,
SONIA E ANTONIO CARLOS**

**IRMÃS,
CARINA E ALINE**

**E MARIDO
FÁBIO**

Obrigada pelo amor e apoio constante.

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

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

Aos funcionários Ana, Reginaldo, Sílvia, Silvana e Silas e também a todos os professores, pós-graduandos, estagiários e amigos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo apoio, atenção e amizade.

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

Agradeço a Deus, pois o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele. Aos meus pais, irmãs, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Em especial, agradeço minha irmã Carina, pela paciência e ajuda durante os dias de experimento.

Ao meu marido Fábio por acrescentar razão e beleza aos meus dias, pelo amor, apoio, incentivo e principalmente pelo constante companheirismo. Aos meus amigos (as) e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq, sem os quais, muito não seria concretizado. Especialmente à FAPESP (nº 2007/53210-1) pela concessão da bolsa.

RESUMO

Estudos anteriores demonstraram a importância dos mecanismos serotoninérgicos, GABAérgicos e adrenérgicos do núcleo parabraquial lateral (NPBL) na regulação da ingestão de sódio hipertônico. Também já foi demonstrada a importância do núcleo central da amígdala (CeA) para a ingestão de sódio hipertônico induzida por diferentes protocolos. Considerando-se os estudos mostrando conexões recíprocas entre essas duas estruturas, o objetivo do presente estudo foi investigar se o aumento da ingestão de sódio hipertônico produzido pelo bloqueio serotoninérgico ou ativação GABAérgica ou adrenérgica no NPBL dependeria da integridade do CeA. Em ratos com lesões bilaterais do CeA e com cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL, foi estudado o possível envolvimento do CeA: 1) na ingestão de água e NaCl 0,3 M produzida pelo tratamento subcutâneo com o diurético furosemida (FURO) combinado com o inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (CAP); 2) no aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pelo bloqueio de receptores serotoninérgicos ou ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL em ratos tratados com FURO + CAP sc; 3) na ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela ativação de receptores GABAérgicos do NPBL em ratos saciados e normovolêmicos. Adicionalmente, foi realizado o bloqueio farmacológico dos neurônios do CeA com injeções bilaterais de muscimol, agonista de receptor GABA_A, para verificar se os efeitos das lesões eletrolíticas do CeA após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL eram devido a destruição de neurônios do CeA ou destruição de fibras de passagem. Em animais com lesões bilaterais do CeA a ingestão diária de água foi menor quando comparada aos animais com lesões fictícias ao longo de todo período experimental, enquanto que a ingestão diária de NaCl 0,3 M foi reduzida a partir do oitavo dia após as lesões. Esses animais apresentaram uma redução no peso corporal persistente por todo período experimental comparado com o grupo com lesões fictícias. As lesões bilaterais do CeA não afetaram a ingestão de água ($9,2 \pm 1,6$ ml/2 h vs. lesões fictícias: $12,8 \pm 0,7$ ml/2 h) e NaCl 0,3 M ($6,5 \pm 3,5$ ml/2 h vs. lesões fictícias $5,2 \pm 0,9$ ml/2 h) induzida por FURO + CAP sc. As lesões bilaterais do CeA (3 dias) aboliram a ingestão de NaCl 0,3 M ($0,1 \pm 0,1$ ml/4 h vs. lesões fictícias: $16,1 \pm 5,4$ ml/4 h) e de água ($0,1 \pm 0,05$ ml/4 h vs. lesões fictícias: $8,2 \pm 3,5$ ml/4 h) induzida

pelas injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL de ratos saciados. As lesões bilaterais do CeA (5 a 18 dias) também aboliram o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M ($11,7 \pm 2,8$ ml/2 h e $11,7 \pm 2,8$ ml/2 h vs. lesões fictícias: $31,5 \pm 4,2$ ml/2 h e $18,3 \pm 3,1$ ml/2 h) e água ($6,7 \pm 1,8$ ml/2 h e $13,8 \pm 2,7$ ml/2 h vs. lesões fictícias: $19,9 \pm 3,2$ ml/2 h e $22,4 \pm 2,5$ ml/2 h) induzidos, respectivamente, pelas injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou metisergida (4 µg/0,2 µl) em ratos previamente tratados com FURO+CAP sc. Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no CeA aboliram a ingestão de água ($0,1 \pm 0,02$ ml/4 h vs. salina: $8,8 \pm 3,2$ ml/4 h) e NaCl 0,3 M ($0,1 \pm 0,04$ ml/4h vs. salina: $19,1 \pm 6,4$ ml/4 h) induzidas pela injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em animais saciados, como também as injeções bilaterais de muscimol (0,25 nmol/0,2 µl) no CeA aboliram o aumento da ingestão de água ($3,3 \pm 2,3$ ml/2 h vs. salina: $26,4 \pm 6,7$ ml/2 h) e NaCl 0,3 M ($2,8 \pm 1,6$ ml/2 h vs. salina: $29,7 \pm 7,2$ ml/2 h) produzido pela injeção bilateral de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em animais tratados com FURO + CAP sc. Esses resultados demonstram que o CeA é essencial para a ingestão de sódio e água que ocorre após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL. A sugestão é que mecanismos facilitatórios para a ingestão de sódio presentes no CeA seriam ativados após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL o que estimularia os animais a ingerirem sódio. Portanto, se estiverem atuando normalmente, os mecanismos inibitórios do NPBL limitariam a ingestão de sódio porque inibiriam os sinais facilitatórios para ingestão de sódio produzidos pelo CeA.

Palavras-chave: Apetite ao sódio. Sede. Núcleo parabraquial lateral. Amígdala. GABA. Angiotensina II. Serotonina. Receptores adrenérgicos.

ABSTRACT

Previous studies have shown the importance of serotonergic GABAergic and adrenergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus (LPBN) in the control of sodium intake. The importance of the central nucleus of the amygdala (CeA) for sodium intake induced by different protocols was also demonstrated. Considering the studies showing reciprocal connections between these two structures, the objective of the present study was to investigate if the increase of sodium and water intake produced by the blockade of serotonergic mechanism, or the activation of GABAergic receptors or α_2 -adrenoceptors in the LPBN would depend on the CeA integrity. Male Holtzman rats with bilateral CeA lesions and bilateral stainless steel cannulas implanted in the LPBN were used to study the possible involvement of the CeA: 1) in water and 0.3 M NaCl intake produced by injections of the diuretic furosemide (FURO) combined with the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril (CAP) subcutaneously (sc); 2) in the increase of 0.3 M NaCl intake induced by the blockade of serotonergic mechanisms or activation of the α_2 -adrenoceptors of the LPBN in rats treated with FURO + CAP sc; 3) in 0.3 M NaCl intake induced by the activation of GABAergic receptors of the LPBN in satiated and normovolemic rats. Additionally, the pharmacological blockade of the CeA neurons with bilateral injections of GABA_A receptor agonist muscimol was performed in order to test if the effects of CeA electrolytic lesions after the blockade of the inhibitory mechanisms of the NPBL were due to destruction of CeA neurons or destruction of fibers of passage. CeA lesioned-rats had a decrease in daily water intake in comparison to sham-lesioned rats during the whole period of test, while the reduction of daily 0.3 M sodium intake occurred after the eighth day of lesions. Animals with bilateral lesions of the CeA also showed a reduction in body weight when compared to sham lesioned-rats. Bilateral lesions of the CeA did not affect FURO+CAP induced-water (9.2 ± 1.6 ml/2 h vs. sham lesion: 12.8 ± 0.7 ml/2 h) and 0.3 M NaCl intake (6.5 ± 3.5 ml/2 h vs. sham lesion: 5.2 ± 0.9 ml/2 h). Bilateral lesions of the CeA (3 days) completely abolished the ingestion of water (0.1 ± 0.05 ml/4 h vs. sham lesion: 8.2 ± 3.5 ml/4 h) and 0.3 M NaCl (0.1 ± 0.1 ml/4 h vs. sham lesion: 16.1 ± 5.4 ml/4 h) induced by bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN in satiated rats. Bilateral lesions of the CeA (5 to 18 days) also abolished the increase in 0.3 M NaCl ($11,7 \pm 2,8$ ml/2 h e $11,7 \pm 2,8$ ml/2 h

vs. sham lesion: $31,5 \pm 4,2$ ml/2 h e $18,3 \pm 3,1$ ml/2 h) and water intake ($6,7 \pm 1,8$ ml/2 h e $13,8 \pm 2,7$ ml/2 h vs. sham lesion: $19,9 \pm 3,2$ ml/2 h e $22,4 \pm 2,5$ ml/2 h) produced respectively by bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) or methysergide (4 μ g/0.2 μ l) into the LPBN in FURO + CAP treated-rats. Bilateral injections of muscimol (0.5 nmol) into the CeA abolished water (0.1 ± 0.02 ml/4 h vs. saline: 8.8 ± 3.2 ml/4 h) and 0.3 M NaCl intake (0.1 ± 0.04 ml/4h vs. saline: 19.1 ± 6.4 ml/4 h) induced by bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) in the NPBL in satiated animals. Bilateral injections of muscimol (0.25 nmol/0.2 μ l) in the CeA abolished the increase of water (3.3 ± 2.3 ml/2 h vs. saline: 26.4 ± 6.7 ml/2 h) and 0.3 M NaCl intake (2.8 ± 1.6 ml/2 h vs. saline: 29.7 ± 7.2 ml/2 h) produced by the bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) into the NPBL. The present results show that CeA is essential for sodium and water intake after the blockade of LPBN inhibitory mechanisms. The suggestion is that CeA facilitatory mechanisms for sodium intake might be activated after the blockade of LPBN inhibitory mechanisms which might drive rats to ingest sodium. Therefore, if LPBN inhibitory mechanisms were acting normally, they may limit sodium intake because they inhibit CeA facilitatory signals for sodium intake.

Keywords: Sodium appetite. Parabrachial nucleus. Amygdala. Thirst. Muscimol. GABA. angiotensin II. Serotonin. Adrenergic receptors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG I – angiotensina I
ANG II – angiotensina II
PNA – peptídeo natriurético atrial
AP – área postrema
ASM – área septal medial
AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo
CAP – captopril
CeA – núcleo central da amígdala
CCK – colecistocinina
DOCA – acetato de desoxicorticosterona
DOI – 2,5-dimetoxi-4-iodoamfetamina
FURO – furosemida
g – grama(s)
GABA – ácido gama-aminobutírico
h – hora(s)
icv – intracerebroventricular
kg – quilograma
M – molar
mg – miligrama(s)
min – minutos
ml – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
MnPO – núcleo pré-óptico mediano
NaCl – cloreto de sódio
NPBL – núcleo parabraquial lateral
NSO – núcleo supra-óptico
NTS – núcleo do trato solitário
NTSm – núcleo do trato solitário medial
OCVs – órgãos circunventriculares
OT – ocitocina
OVLT – órgão vascular da lâmina terminal
PCS – pedúnculo cerebelar superior

PVN – núcleo paraventricular

Sal – salina

sc – subcutâneo

OSF – órgão subfornical

Vei – veículo

% – por cento

α – alfa

β – beta

± – mais ou menos

μg – micrograma(s)

μl – microlitro(s)

μm – micrometro(s)

< – menor

> – maior

5-HT – serotonina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização histológica das lesões e injeções bilaterais no CeA..... 38
- Figura 2.** Localização histológica das injeções bilaterais no NPBL. 39
- Figura 3.** Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M e peso corporal em ratos com lesão bilateral do CeA. 41
- Figura 4.** Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em ratos saciados com lesões bilaterais do CeA. 44
- Figura 5.** Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP em ratos com lesão do CeA tratados com moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. 46
- Figura 6.** Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP em ratos com lesão do CeA tratados com metisergida (4 µg/0,2 µl) no NPBL. 48
- Figura 7.** Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e no CeA 52
- Figura 8.** Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc em ratos tratados com moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinada com muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no CeA..... 54
- Figura 9.** Diagrama esquemático mostrando um possível modelo para a conexão entre o mecanismo inibitório do NPBL e o mecanismo facilitatório do CeA para o controle da ingestão de sódio..... 60
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal de ratos com lesões fictícias ou eletrolíticas do CeA 42

Tabela 2. Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com FURO+CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl), metisergida (4 µg/0,2 µl) ou veículo 1 mm acima do NPBL. 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Animais	28
3.2. Medida da ingestão diária de água e NaCl 0,3 M	28
3.3. Medida do peso corporal	28
3.4. Cirurgia cerebral	28
3.5. Injeção de fármacos no encéfalo	30
3.6. Fármacos utilizados	30
3.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M	31
3.8. Análise histológica	31
3.9. Análise estatística	32
3.10. Protocolos experimentais	32
3.10.1. Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M e peso corporal em ratos com lesão fictícia ou lesão do CeA	32
3.10.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por diferentes tratamentos em ratos com lesão do CeA ou lesão fictícia e com implante de cânulas bilaterais no NPBL	32
3.10.2.1. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados	33
3.10.2.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO+CAP sc	34
3.10.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados tratados com muscimol no CeA e no NPBL	35
3.10.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP sc que receberam muscimol no CeA combinado com moxonidina no NPBL	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Histologia	37
4.2. Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M e peso corporal em ratos com lesão bilateral do CeA	40

4.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados com lesões bilaterais do CeA.....	43
4.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP em ratos com lesão do CeA tratados com moxonidina no NPBL	45
4.5. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP em ratos com lesão do CeA tratados com metisergida no NPBL	47
4.6. Especificidade das injeções no NPBL para produzir os efeitos na ingestão de água e NaCl.....	49
4.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e no CeA.	51
4.8. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc em ratos tratados com moxonidina no NPBL combinada com muscimol no CeA.	53
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

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

Normalmente, mais água e sódio são ingeridos do que o necessário para a sobrevivência. O excesso é excretado pelos rins a quem juntamente com a ingestão cabe a regulação dos líquidos corporais. Entretanto, quando as quantidades de água e de sódio no organismo tornam-se muito reduzidas ocorre um quadro de desidratação. Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento na pressão osmótica efetiva do compartimento extracelular, promovendo uma redução do volume de água das células, caracterizando assim a “desidratação intracelular”. A desidratação pode ser absoluta quando há perda de água dos compartimentos celular e extracelular, como acontece na privação de água, ou relativa se existir apenas perda de água celular, que se difunde para o líquido extracelular, como ocorre, por exemplo, na ingestão ou sobrecarga de solutos osmoticamente ativos. Em situações como hemorragia, diarreia, vômito e depleção de sódio, ocorre redução unicamente do volume do líquido extracelular, caracterizando assim a “desidratação extracelular”. É importante destacar que nessa situação há uma perda conjunta de água e de sódio, e por isso ela é geralmente acompanhada de comportamento apetitivo ao sódio. Embora os dois tipos de

desidratação sejam experimentalmente e clinicamente separáveis, é comum a ocorrência simultânea de ambas, principalmente durante privação hídrica (DE LUCA JR e cols., 2005).

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

Um pequeno aumento de 1 a 2% na pressão osmótica efetiva do plasma resulta na estimulação da sede em mamíferos. Trabalhos pioneiros mostraram um importante papel para a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) nos mecanismos da sede, pois a ablação da região AV3V de carneiros e ratos causava adipsia (ANDERSSON, 1978; JOHNSON e cols., 1996). Em estudos subsequentes, novas evidências confirmaram que no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e no órgão subfornical (OSF) provavelmente estão localizados os osmorreceptores (VIVAS e cols., 1990, 1995; JOHNSON e cols., 1996). O OSF e o OVLT são dois órgãos circunventriculares que se situam fora da barreira hematoencefálica e estão situados na lâmina terminal. Trabalhos eletrofisiológicos e imunohistoquímicos sugerem que os neurônios dos órgãos circunventriculares são ativados através de suas células osmo-sódio- e angiotensina II-sensíveis, durante um aumento da osmolaridade do líquido extracelular ou uma deficiência aguda de sódio corporal, respectivamente (VIVAS e cols., 1990, 1995; JOHNSON e cols., 1996; PASTUSKOVAS & VIVAS, 1997). O núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o qual também faz parte da região AV3V, recebe aferências dos neurônios do OSF e OVLT e pode integrar sinais neurais vindos desses órgãos circunventriculares com as informações sensoriais viscerais vindas do tronco cerebral (McKINLEY & JOHNSON, 2004).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um importante sistema hormonal ativado em situações de hipovolemia. A renina, uma enzima proteolítica, atua sobre o substrato plasmático, o angiotensinogênio (uma proteína globular sintetizada no fígado), produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I). A

ANG I sob a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), localizada especialmente nos endotélios da circulação pulmonar, produz um octapeptídeo ativo, identificado como angiotensina II (ANG II). Fatores como redução da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores do subtipo β_1 adrenérgicos, catecolaminas ou prostaglandinas circulante, ativam a secreção de renina (FITZSIMONS, 1998).

Estudos clássicos de Fitzsimons e colaboradores (para revisão vide FITZSIMONS, 1998) foram os primeiros a demonstrar que a renina e seu peptídeo efetor ANG II eram efetivos como estímulos dipsogênicos. Além de estimular a ingestão de água e de sódio, a ANG II apresenta outras funções fisiológicas, como regulação da pressão arterial, excreção de sódio, e a secreção de vasopressina, podendo ter também importantes funções no aprendizado e na consolidação da memória (FITZSIMONS, 1998; KERR e cols., 2005; BONINI e cols., 2006). Receptores centrais para ações da ANG II já foram demonstrados em diversas áreas cerebrais como OSF, OVLT, núcleo paraventricular (PVN), MnPO, área postrema (AP) e núcleo do trato solitário (NTS), (LEWIS e cols., 1986; MCKINLEY e cols., 1987; ALLEN e cols., 1988).

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

Assim como os mecanismos excitatórios, os mecanismos inibitórios também são importantes no controle da ingestão de água e sódio. Em situações de expansão do volume ou aumento da osmolaridade plasmática ocorre a liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP), um peptídeo de 28 aminoácidos, sintetizado principalmente nos miócitos atriais. O ANP participa da manutenção do volume por produzir diurese, natriurese e vasodilatação (DE BOLD e cols., 1981). O ANP também inibe a ação vasoconstritora da ANG II, vasopressina (AVP) e noradrenalina (BAXTER e cols., 1988). Administração central ou periférica de ANP reduz a

ingestão de água (induzida por privação hídrica) e de sódio (induzida por depleção de sódio), (ANTUNES-RODRIGUES e cols., 1985, 1986; McCANN e cols., 1996).

A ocitocina (OT) é secretada na circulação sanguínea durante expansão de volume, particularmente durante expansão hipertônica, e tem ação natriurética, um mecanismo importante para compensar ou pelo menos atenuar essa expansão (McCANN e cols., 2003). Complementando a ação renal, esse hormônio também inibe a sede e o apetite ao sódio. A OT plasmática aumenta em resposta a uma carga osmótica e este aumento é revertido em resposta à diluição do líquido extracelular durante a ingestão de água que precede o apetite ao sódio em animais hipovolêmicos (VERBALIS e cols., 1995; BLACKBURN e cols., 1995). Injeção intracerebroventricular (icv) de OT reduz a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio e a injeção de antagonista de OT pela mesma via potencializa a ingestão de sódio induzida por ANG II (VERBALIS e cols., 1995; SATO e cols., 1997). Concomitantemente à ativação de mecanismos facilitadores do apetite ao sódio (ANG II, aldosterona, desativação de receptores de volume), ocorreria a liberação de ocitocina centralmente que inibiria o apetite ao sódio nas fases iniciais de hipovolemia. Mais tarde, com a ingestão de água, os mecanismos inibitórios seriam desativados pela redução da osmolaridade extracelular, liberando então a ação dos mecanismos facilitadores para a ingestão de sódio (VERBALIS e cols., 1995; BLACKBURN e cols., 1995).

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

No tronco cerebral, um importante mecanismo inibitório que controla a ingestão de água e NaCl está localizado no núcleo parabraquial lateral (NPBL), uma estrutura pontina que situa-se dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior, (EDWARDS & JOHNSON, 1991; MENANI & JOHNSON, 1995; COLOMBARI e cols., 1996; MENANI e cols., 1996, 1998a, 1998b, 2000).

Os primeiros estudos mostraram que lesão eletrolítica ou a lesão neurotóxica (com injeção de ácido ibotênico) no NPBL em ratos levava a um aumento da ingestão de água induzida pela administração central ou periférica de ANG II ou injeção periférica de isoproterenol (OHMAN & JOHNSON, 1986, 1989;

JOHNSON & EDWARDS, 1990; EDWARDS & JOHNSON, 1991). Outros estudos têm mostrado que injeções bilaterais no NPBL de metisergida, um antagonista de receptores serotoninérgicos, aumenta a ingestão de NaCl induzida pela ANG II administrada tanto icv quanto no OSF (MENANI e cols., 1996; COLOMBARI e cols., 1996). Metisergida injetada bilateralmente no NPBL também aumentou a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento combinando o diurético furosemida (FURO) e o bloqueador da enzima conversora de angiotensina captopril (CAP), ambos injetados por via subcutânea (sc) (MENANI e cols., 1996). Por outro lado, a injeção de DOI (2,5-dimetoxi-4-iodoamfetamina), um agonista de receptores serotoninérgicos, no NPBL reduziu a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento com furosemida + captopril (FURO+CAP) sc, (MENANI e cols., 1996).

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

Outros estudos têm mostrado que metisergida injetada no NPBL aumenta a ingestão de água e NaCl hipertônico induzida por 24 horas de privação hídrica ou depleção de sódio (FURO sc seguida de 24 horas com dieta deficiente de sódio), (MENANI e cols., 1998a,b). Foi demonstrado também que estes mecanismos inibitórios serotoninérgicos do NPBL exercem forte influência inibitória na ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com desoxicorticosterona (DOCA), um composto esteróide com propriedades semelhantes a aldosterona, (DE GOBBI e cols., 2000). Além disso, o bloqueio serotoninérgico no NPBL combinado com o aumento da osmolaridade plasmática produzido por sobrecarga intragástrica de NaCl induz um aumento paradoxal da ingestão de NaCl hipertônico além da ingestão normal de água (DE LUCA JR e cols., 2003).

Além da serotonina (5-HT), também a colecistocinina (CCK) no NPBL tem um papel inibitório na ingestão de água e sódio (MENANI & JOHNSON, 1998), demonstrando-se inclusive uma interdependência e cooperatividade entre 5-HT e

CCK no NPBL no controle da ingestão de água e sódio (DE GOBBI *et al.*, 2001), pois a liberação de 5-HT induz também a liberação de CCK no LPBN e vice-versa, e para a inibição plena da ingestão de sódio é necessária a ação tanto da 5-HT quanto do CCK em seus respectivos receptores no LPBN.

Outros estudos também já demonstraram o papel inibitório do glutamato e do fator liberador de corticotrofina no NPBL na ingestão de água e sódio (XU e cols., 1997; DE CASTRO E SILVA e cols., 2006, DE GOBBI e cols., 2009). Mais recentemente ainda, foi demonstrado também o envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 , dos receptores GABAérgicos e receptores opioidérgicos do NPBL no controle da ingestão de sódio (ANDRADE e cols., 2004; CALLERA e cols., 2005; ANDRADE e cols., 2006; DE OLIVEIRA e cols., 2008).

Injeções bilaterais de muscimol (agonista GABA) no NPBL induzem ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados, e o prévio tratamento com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) reverteu esses efeitos (CALLERA e cols., 2005). Injeções do agonista opióide β -endorfina no NPBL também induzem ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados e o pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona aboliu esse efeito, (DE OLIVEIRA e cols., 2008).

A moxonidina (agonista adrenérgico α_2 e imidazólico) injetada bilateralmente no NPBL aumenta a ingestão de sódio induzida pelo tratamento combinando-se FURO + CAP sc, e esse aumento produzido pela moxonidina (mais do que dez vezes a quantia ingerida pelos controles tratados com FURO+CAP sc e veículo no NPBL) foi completamente abolido pelo RX 821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , indicando que a moxonidina produz um potente, seletivo e específico aumento da ingestão de NaCl hipertônico pela ação em receptores adrenérgicos α_2 , (ANDRADE e cols., 2004). A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL combinado com o aumento da osmolaridade plasmática produzido por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M também induz uma surpreendente ingestão de NaCl hipertônico (ANDRADE e cols., 2006), sugerindo que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL suprime o mecanismo inibitório dessa mesma área para a ingestão de sódio durante o aumento da osmolaridade plasmática.

As células do NPBL são ativadas após a ingestão de soluções de sódio em animais com desidratação intra e extracelular, (KOBASHI e cols., 1993; YAMAMOTO e cols., 1993; FRANCHINI & VIVAS, 1999), sugerindo que as células do NPBL podem ser ativadas por estímulos viscerais e talvez de sabor. O NPBL

recebe muitas fibras provenientes da AP e porção adjacente do NTS medial (AP/NTSm), (HERBERT e cols., 1990; NORGREN, 1981; SHAPIRO & MISELIS, 1985). A região AP/NTSm, por sua vez, recebe projeções aferentes dos receptores de volume (barorreceptores arteriais e receptores cardiopulmonares), receptores gustatórios e outros receptores viscerais (NORGREN, 1981) e estes receptores podem influenciar a ingestão de água e sódio (JOHNSON & THUNHORST, 1997). O NPBL também envia projeções para as áreas anteriores do cérebro envolvidas no controle hidroeletrólítico, tais como PVN, CeA e MnPO (NORGREN, 1981; CIRIELLO e cols., 1984; FULWILER & SAPER, 1984; LANÇA & VAN DER KOOY, 1985; KRUKOFF e cols., 1993; JHAMANDAS e cols., 1996). Dessa forma, o NPBL pode ser uma região de integração entre as vias ascendentes vindas do NTSm e AP e as áreas anteriores envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

A amígdala apresenta particular interesse no comportamento motivado de ingestão de sódio por manter conexões recíprocas com áreas bulbares como o NTS e da ponte como o NPBL, que são centros processadores de informações gustatórias e viscerais (NORGREN, 1995). A amígdala (ou complexo amigdalóide), uma estrutura límbica localizada nos lobos temporais, participa de um circuito cerebral fundamental envolvido no controle de ingestão de sódio e água (COVIAN e cols., 1975), e tem como principais regiões os núcleos: a) medial, que recebe aferências do bulbo olfativo (odores e feromônios) e envia informações para o prosencéfalo e hipotálamo; b) lateral, o qual recebe informações sensoriais do córtex primário, do tálamo e formação hipocampal e projeta-se para os núcleos basal e central do complexo amigdalóide; c) basal, que recebe aferências sensoriais dos núcleos lateral e basolateral do complexo e projeta-se para o núcleo central e matéria cinzenta periaquedutal e d) o núcleo central, que recebe aferências dos núcleos basolateral e basal do complexo amigdalóide e projeta-se para o hipotálamo, mesencéfalo, ponte e bulbo.

Lesões bilaterais do CeA abolem a ingestão diária de NaCl 3% e o apetite ao sódio induzido por DOCA e também por ativação da ANG II cerebral por meio de injeções icv de renina (GALAVERNA e cols., 1992). Esse mesmo trabalho mostrou que animais com lesões bilaterais do CeA não sofreram alterações na ingestão de soluções palatáveis de sacarose, comida ou água, sugerindo assim um efeito específico para a ingestão de sódio hipertônico. ZARDETTO-SMITH e colaboradores (1994) também mostraram uma redução do apetite ao sódio após

lesão do CeA em animais tratados com ioimbina sc ou depletados de sódio com furosemida. Por outro lado, a ingestão de água induzida por ANG II sc ou por desidratação celular promovida por salina hipertônica sc não é afetada pelas lesões do CeA, reforçando o conceito que lesões do CeA reduzem especificamente o apetite ao sódio, (ZARDETTO-SMITH e cols., 1994). Lesões bilaterais do CeA reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M, sem alterar a ingestão de água, em animais com 36 horas de privação hídrica submetidos a um protocolo de reidratação parcial na primeira hora seguida de acesso ao NaCl 0,3 M e água nas duas horas seguintes e também reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 horas de depleção de sódio (VENDRAMINI e cols., 2009), confirmando os efeitos da lesão do CeA já descritos na literatura. Assim, já foi demonstrada a importância do CeA para a ingestão de sódio induzida por diferentes protocolos. Porém, até hoje ainda não foram estudados os efeitos das lesões do CeA na ingestão de sódio induzido pelo tratamento com FURO+CAP sc.

As lesões do CeA, embora reduzam o apetite ao sódio, parece não produzirem desordens da função gustatória, pois os animais estudados discriminaram estímulos sápidos aplicados à língua, respondendo normalmente aos teste de reatividade gustatória ao NaCl (AZUMA e cols., 1984; SEELEY e cols., 1993). Portanto, este núcleo não seria importante para a sensação de sabor, mas sim para conectar informações gustatórias provenientes de áreas bulbares (NTS) e pontinas (NPB) aos sistemas motores responsáveis pelo consumo de sódio, sendo essas respostas modificadas pelo conteúdo de sódio do meio interno (GALAVERNA e cols., 1993; LUNDY & NORGRÉN, 2001).

A conexão entre o NPBL e o CeA tem sido recentemente estudada (JIA e cols., 2005; GEERLING & LOEWY, 2006). Com a associação de técnicas de marcadores neuronais retrógrados e anterógrados e imunoistoquímica, foi demonstrada a existência de conexões monossinápticas GABAérgicas entre o CeA e o NPBL, (JIA e cols., 2005). Recentemente foi verificado que injeções da subunidade β da toxina colérica no NPBL produziu tanto marcação retrógrada em corpos celulares de neurônios do NTS sensíveis a aldosterona, quanto marcação axonal anterógrada no CeA, enquanto que a injeção dessa toxina no CeA evidenciou uma projeção descendente da amígdala para o NTS medial, (GEERLING & LOEWY, 2006). Esses autores sugeriram que esse circuito NTS – NPBL – CeA – NTS pode

ser considerado como uma base neuroanatômica para a modulação da ingestão de sódio pelo CeA, (GEERLING & LOEWY, 2006).

Considerando então a importância dos mecanismos serotoninérgicos, GABAérgicos e adrenérgicos do NPBL no controle da ingestão de sódio, o envolvimento do CeA na regulação da ingestão de sódio e os vários estudos mostrando a conexão entre o NPBL e o CeA, julgamos interessante investigar se os efeitos do bloqueio serotoninérgico, da ativação GABAérgica ou adrenérgica no NPBL, aumentando a ingestão de sódio hipertônico, dependeriam da integridade do CeA.

2. OBJETIVOS

Estudar o possível envolvimento do CeA, avaliado por meio de lesões eletrolíticas bilaterais ou bloqueio farmacológico bilateral dessa região, 1) na ingestão de água e NaCl 0,3 M produzida pelo tratamento com FURO+CAP sc; 2) no aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pelo bloqueio de receptores serotoninérgicos ou ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL em ratos tratados com FURO+CAP sc; 3) na ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela ativação de receptores GABAérgicos do NPBL em ratos saciados e normovolêmicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, adultos, com peso entre 260 e 270 g no dia da cirurgia cerebral, provenientes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração, água e solução de NaCl 1,8% (0,3 M). Os animais permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ$ C e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuros de doze horas (presença de luz das 7:00 às 19:00 h), no Laboratório Experimental de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr, UNESP, Araraquara. Todos os procedimentos experimentais foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA (Proc. CEEA nr. 07/2007).

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

A quantidade de água e NaCl 0,3 M ingerida por cada animal foi medida diariamente desde cinco dias antes da cirurgia até o final do período de experimentação, totalizando 22 dias. Para tanto, foram utilizados bebedouros de polipropileno com capacidade para 100 ml, graduados a cada ml, fixados na frente de cada gaiola.

3.3. Medida do peso corporal

Alguns animais com lesão no CeA, podem apresentar afagia e adipsia moderadas nos primeiros cinco dias após a cirurgia, resultando em perda de até 5% do peso corporal. Para tanto, o peso corporal de cada animal foi medido cinco dias antes da cirurgia cerebral para lesão do CeA (período de ambientação), no dia da cirurgia e cinco, oito, quinze e dezoito dias após a cirurgia.

3.4. Cirurgia cerebral

Os ratos foram anestesiados com uma combinação de cetamina (80 mg/kg peso corporal) e xilazina (7 mg/kg peso corporal) administrada por via intraperitoneal. Inicialmente, foi feita uma tricotomia do topo da cabeça do animal

para facilitar a cirurgia e evitar possíveis infecções. Em seguida, os ratos foram adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900).

A cirurgia foi iniciada com uma incisão realizada com o bisturi, com posterior remoção do perióstio para exposição da caixa craniana. Através da incisão foram visualizadas as suturas bregma e lambda que foram utilizadas como referência para nivelar as cabeças dos ratos. Em seguida, foram feitas duas perfurações na caixa craniana para a introdução de parafusos necessários para a fixação das cânulas na resina acrílica que seria utilizada posteriormente.

Para a lesão do núcleo central da amígdala (CeA), após a trepanação do crânio com uma broca circular, foi introduzido bilateralmente um eletrodo de aço inoxidável isolado, exceto na extremidade (0,5 mm), seguindo as coordenadas: 2,1; 2,4 e 2,6 mm caudal ao bregma, 4,0 mm lateral ao seio sagital e 6,3 mm abaixo da dura-máter. A cada ponto de introdução do eletrodo foi liberada uma corrente anódica de 1 mA durante 20 segundos. Em animais com lesão fictícia, o eletrodo foi introduzido 5,3 mm abaixo da dura-máter, sendo mantidas as demais coordenadas, sem passagem de corrente.

Imediatamente após as lesões bilaterais do CeA, cânulas de aço inoxidável de 12 x 0,5 mm d.i. (diâmetro interno) foram implantadas bilateralmente nas cabeças dos ratos direcionadas para o NPBL. Essas cânulas foram posicionadas bilateralmente no cérebro de acordo com as seguintes coordenadas: 9,2 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 3,5 mm abaixo da dura-máter, de acordo com Paxinos e Watson, 1986. Nesses pontos foi feita outra trepanação no crânio, abrindo-se orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro por onde as cânulas foram introduzidas. As cânulas foram então fixadas nas cabeças dos ratos com o auxílio da resina acrílica. Após a completa secagem da resina, retirou-se o animal do aparelho estereotáxico e introduziu-se o mandril na cânula.

Em alguns ratos, ao invés de lesões no CeA, foram feitas injeções de muscimol nessa área. Para isso, além de cânulas bilateralmente implantadas no NPBL, também foram implantadas cânulas bilateralmente no CeA. Para injeções no CeA, as cânulas foram posicionadas bilateralmente no cérebro de acordo com as seguintes coordenadas: 2,2 mm caudal ao bregma, 4,0 mm lateral ao seio sagital e 4,5 mm abaixo da dura-máter. Nesses pontos foi feita outra trepanação no crânio,

abrindo-se orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro por onde as cânulas foram introduzidas.

Após a cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e outra do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato; Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil).

Diariamente os ratos foram manipulados e treinados com manobras utilizadas durante os procedimentos experimentais. Os experimentos foram iniciados 3 dias após a cirurgia cerebral.

3.5. Injeção de fármacos no encéfalo

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

3.6. Fármacos utilizados

Cloridrato de moxonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, (doação da Solvay Pharma, Hannover, Alemanha), foi dissolvido em uma mistura de propilenoglicol e água 2:1 (veículo) e administrado no NPBL na dose de 0,5 nmol/0,2 μ l.

Maleato de metisergida, antagonista inespecífico de receptores serotoninérgicos, (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvido em veículo e administrado no NPBL na dose de 4 μ g/0,2 μ l.

Brometo de muscimol, agonista de receptores GABA_A, (Research Biochemicals Internationals, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvido em salina e administrado no CeA nas doses de 0,25 ou 0,5 nmol/0,2 μ l e no NPBL na dose de 0,5 nmol/0,2 μ l.

Furosemida (FURO), diurético salurético, (10 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea) foi dissolvida em salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Captopril (CAP), inibidor da enzima conversora de angiotensina, (5 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea) foi dissolvido em salina isotônica. Furosemida e captopril foram comprados da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA. O tratamento com FURO+CAP foi utilizado como descrito previamente por FITTS & MASSON, 1989 e MENANI et al., 1996.

3.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M

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

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi testada em ratos tratados com uma combinação de FURO (10 mg/kg de peso corporal) + CAP (5 mg/kg de peso corporal) sc que receberam injeções de moxonidina, metisergida ou veículo no NPBL e em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções de muscimol no NPBL.

Água, NaCl 0,3 M e ração foram removidos das gaiolas imediatamente antes do tratamento com FURO+CAP. Após uma hora, foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água e NaCl foi medida a cada 30 minutos durante 2 horas.

Em ratos saciados e normohidratados, a água, a solução de NaCl 0,3 M e a ração foram removidos das gaiolas imediatamente antes do início dos experimentos. Água e NaCl 0,3 M, em tubos com divisão de 0,1 ml, foram oferecidos para os animais 15 min após injeções bilaterais de muscimol (0.5 nmol/0,2 µl) no NPBL. A ingestão de água e NaCl foi medida a cada 30 minutos durante 4 horas.

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

3.8. Análise histológica

Terminados os experimentos, os ratos com lesões eletrolíticas ou fictícias do CeA receberam injeções bilaterais de corante (azul de Evans, 2 mg/0,2 µl) no NPBL, enquanto que os animais com implantes bilaterais de cânulas no CeA

receberam injeções bilaterais de corante tanto no CeA quanto no NPBL. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml) seguida de solução de formalina 10% (50 ml). A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 μ m de espessura) foram feitos nos pontos de injeção ou de lesão com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa e analisados em microscópio para a localização dos pontos das injeções no CeA e no NPBL como também para a confirmação das lesões do CeA.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média foram representados em gráficos. A análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Newman Keuls foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

3.10. Protocolos experimentais

3.10.1. Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M e peso corporal em ratos com lesão fictícia ou lesão do CeA.

A quantidade de água e NaCl 0,3 M ingerida por cada animal foi medida diariamente desde cinco dias antes da cirurgia (período de ambientação), até o final do período de experimentação, totalizando cerca de 22 dias.

O peso corporal (g) de cada animal foi medido cinco dias antes da cirurgia cerebral, no dia da cirurgia e nos dias 5^o, 8^o, 15^o e 18^o após a cirurgia.

3.10.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por diferentes tratamentos em ratos com lesão do CeA ou lesão fictícia e com implante de cânulas bilaterais no NPBL.

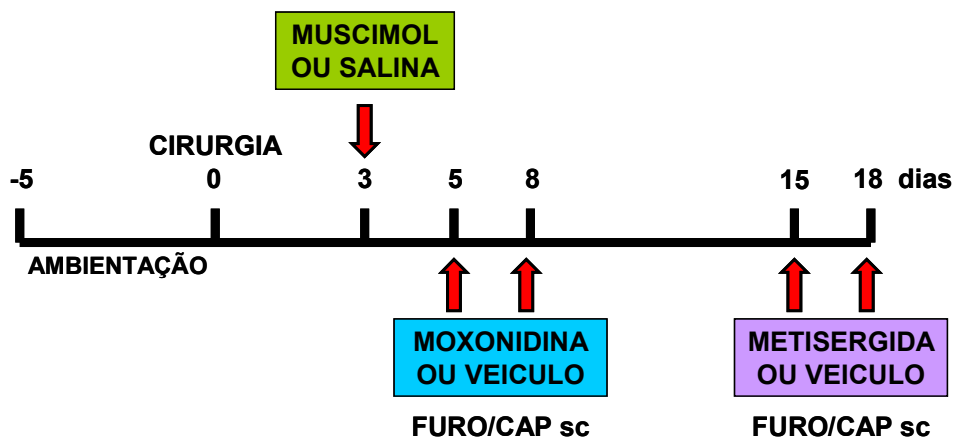
A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi induzida por diferentes protocolos e teve início três dias após a lesão, no qual ratos saciados e normohidratados com lesão do CeA ou lesão fictícia e com implante de cânulas bilaterais no NPBL receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina no NPBL. Esse protocolo foi

realizado no mesmo dia, de forma que, no período da manhã todos os animais receberam injeções de salina no NPBL e no período da tarde todos os animais receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

Cinco e oito dias após a lesão do CeA ou lesão fictícia, a ingestão de água e NaCl 0,3 M foi testada em ratos tratados com FURO+CAP sc que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. No primeiro teste, metade dos animais com lesão fictícia e metade dos animais com lesão do CeA receberam moxonidina no NPBL e as outras metades receberam veículo no NPBL. No experimento seguinte, os ratos receberam os mesmos tratamentos no NPBL porém de forma contrabalanceada.

Quinze e dezoito dias após a lesão do CeA ou lesão fictícia, a ingestão de água e NaCl 0,3 M foi testada em ratos tratados com FURO+CAP sc que receberam injeções bilaterais de metisergida (4 μ g/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. No primeiro teste, metade dos animais com lesão fictícia e metade dos animais com lesão do CeA receberam metisergida no NPBL e as outras metades receberam veículo no NPBL. No experimento seguinte, os ratos receberam os mesmos tratamentos no NPBL porém de forma contrabalanceada.

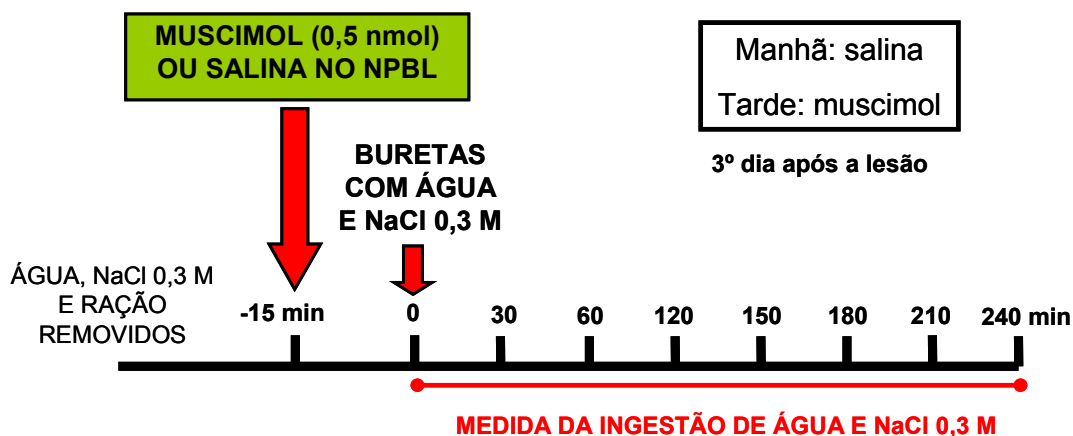
Cada animal foi submetido a todos os tratamentos, em diferentes dias conforme esquema abaixo:



3.10.2.1. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados.

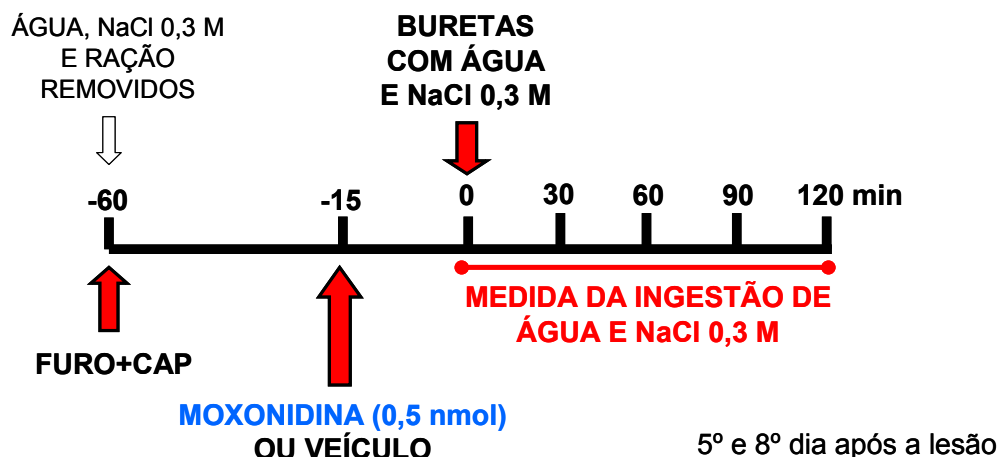
Três dias após a cirurgia cerebral, os ratos saciados e normohidratados receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL e

quinze minutos após foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M. A medida da ingestão de água e NaCl foi feita a cada 30 min durante um período de 4 horas. Esse protocolo foi realizado no mesmo dia, de forma que, no período da manhã todos os animais receberam injeções de salina no NPBL e no período da tarde todos os animais receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

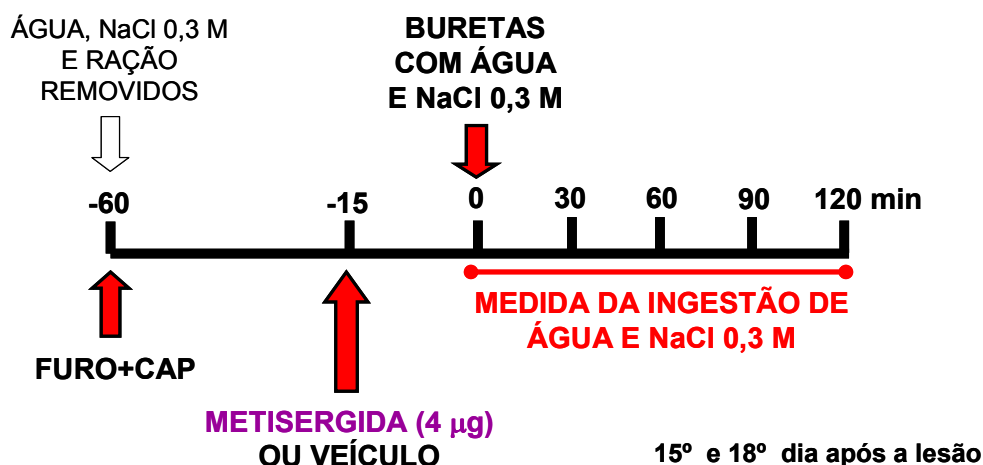


3.10.2.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO+CAP sc.

Cinco e oito dias após a cirurgia cerebral, os ratos foram tratados com FURO+CAP sc, conforme descrito no item 3.7. dos métodos, e 45 min após receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Água e NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais 15 minutos após as injeções centrais. No primeiro teste, metade dos animais com lesão fictícia e metade dos animais com lesão do CeA receberam moxonidina no NPBL e as outras metades receberam veículo no NPBL. No experimento seguinte, os ratos receberam o mesmo tratamento no NPBL, porém de forma contrabalanceada.



Já 15 e dezoito dias após a cirurgia cerebral, os ratos tratados com FURO+CAP sc, receberam injeções bilaterais de metisergida (4 μ g/0,2 μ l) ou veículo no NPBL quinze minutos antes do oferecimento de NaCl 0,3 M e água aos animais. No primeiro teste, metade dos animais com lesão fictícia e metade dos animais com lesão do CeA receberam metisergida no NPBL e as outras metades receberam veículo no NPBL. No experimento seguinte, os ratos receberam o mesmo tratamento no NPBL, porém de forma contrabalanceada.



Para os diferentes tratamentos, a medida da ingestão de água e sódio foi feita a cada trinta minutos durante duas horas, imediatamente após o oferecimento de água e NaCl 0,3M.

3.10.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados tratados com muscimol no CeA e no NPBL.

A partir de cinco dias após a cirurgia cerebral, animais saciados e normohidratados com cânulas implantadas bilateralmente no CeA e no NPBL receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina tanto no CeA quanto no NPBL. Quinze minutos após foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M. A medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M foi feita a cada 30 minutos durante um período de 4 horas.

Para a realização do protocolo os animais foram submetidos aleatoriamente a quatro tratamentos. Em cada teste os animais foram divididos em dois grupos, e cada um dos grupos recebeu um dos quatro tratamentos. Todos os animais foram submetidos aos quatro testes, em dias diferentes, com 48 h de intervalo entre eles. No final dos experimentos, todos os animais receberam os quatro tratamentos em ordem aleatória, conforme segue:

Tratamento 1. salina CeA + salina NPBL

Tratamento 2. salina CeA + muscimol NPBL

Tratamento 3. muscimol CeA + muscimol NPBL

Tratamento 4. muscimol CeA + salina NPBL

3.10.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP sc que receberam muscimol no CeA combinado com moxonidina no NPBL

A partir de cinco dias após a cirurgia cerebral, a ingestão de água e NaCl 0,3 M foi testada em ratos tratados com FURO+CAP sc (conforme descrito no item 3.7. dos métodos) que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,25 nmol/0,2 µl) ou salina no CeA e injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. As injeções centrais foram feitas 45 minutos após o tratamento com FURO+CAP e o acesso a água e NaCl foi 1 h após FURO+CAP. A medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M foi feita a cada trinta minutos durante duas horas.

Para a realização dos testes, os animais foram submetidos aleatoriamente a quatro tratamentos. Em cada teste os animais foram divididos em dois grupos e cada grupo recebeu um dos quatro tratamentos. Todos os animais foram submetidos aos quatro testes, em dias diferentes, com 48 h de intervalo entre

eles. No final dos experimentos, todos os animais receberam os quatro tratamentos em ordem aleatória, conforme segue:

- Tratamento 1. salina CeA + veículo NPBL
- Tratamento 2. salina CeA + moxonidina NPBL
- Tratamento 3. muscimol CeA + moxonidina NPBL
- Tratamento 4. muscimol CeA + veículo NPBL

4. RESULTADOS

4.1. Histologia.

A Figura 1A apresenta um esquema adaptado de Paxinos e Watson (2004) mostrando a localização do CeA no cérebro de rato e a Figura 1B apresenta uma fotomicrografia mostrando a localização das lesões bilaterais do CeA no cérebro de um rato representativo dos animais lesados. O CeA é parte do complexo amigdalóide localizado nos lobos temporais. A lesão bilateral do CeA típica foi localizada latero-dorsalmente a extremidade do trato óptico (**opt**, área destacada em verde na Figura 1), acima do núcleo amigdalóide basomedial e medial ao núcleo amigdalóide basolateral. O CeA apresenta aproximadamente 1,5 mm de extensão rostro-caudal e ao menos 80% da extensão rostro-caudal do CeA foi destruída pelas lesões. Lâminas montadas contendo os cortes histológicos da região compreendendo o CeA foram analisadas e somente os animais cujos trajetos das cânulas estavam bilateralmente localizadas no CeA foram usados para a análise dos dados. Na Figura 1C pode ser visualizado uma fotomicrografia de um corte histológico mostrando os pontos de injeção típico no CeA (seta) e o trajeto das cânulas no cérebro de um rato representativo dos animais estudados.

A Figura 2A apresenta um esquema adaptado de Paxinos e Watson (2004) mostrando a localização do NPBL e a Figura 2B apresenta uma fotomicrografia mostrando os pontos de injeção típicos no NPBL no cérebro de um rato representativo dos animais estudados. Os sítios de injeção no NPBL estavam concentrados nas porções centro-lateral e dorso-lateral do NPBL (ver FULWILER & SAPER, 1984, para definição dos subnúcleos do NPBL). Injeções que atingiram as porções ventro-lateral e lateral externa, assim como o núcleo Kölliker-Fuse, foram observadas apenas em alguns ratos e os resultados desses animais foram incluídos na análise

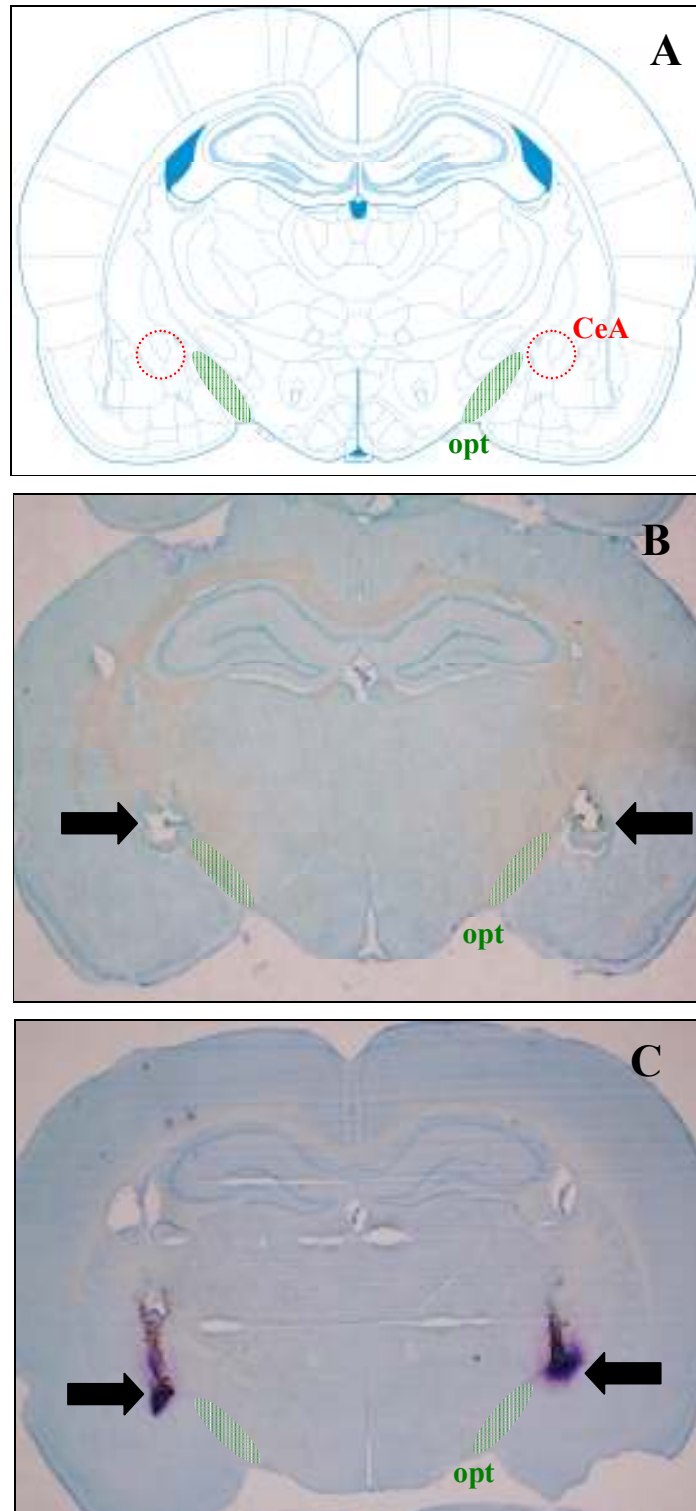


FIGURA 1. A) Diagrama com demarcação da região do CeA (adaptado de PAXINOS & WATSON, 2004), localizado bilateralmente (círculos pontilhados vermelhos), **B)** Fotomicrografia de corte histológico mostrando os pontos de lesões eletrolíticas bilaterais do CeA (setas) e **C)** Fotomicrografia de corte histológico mostrando os pontos de injeções típicas no CeA (setas) em ratos representativos dos animais estudados. **opt**, trato óptico (área destacada em verde).

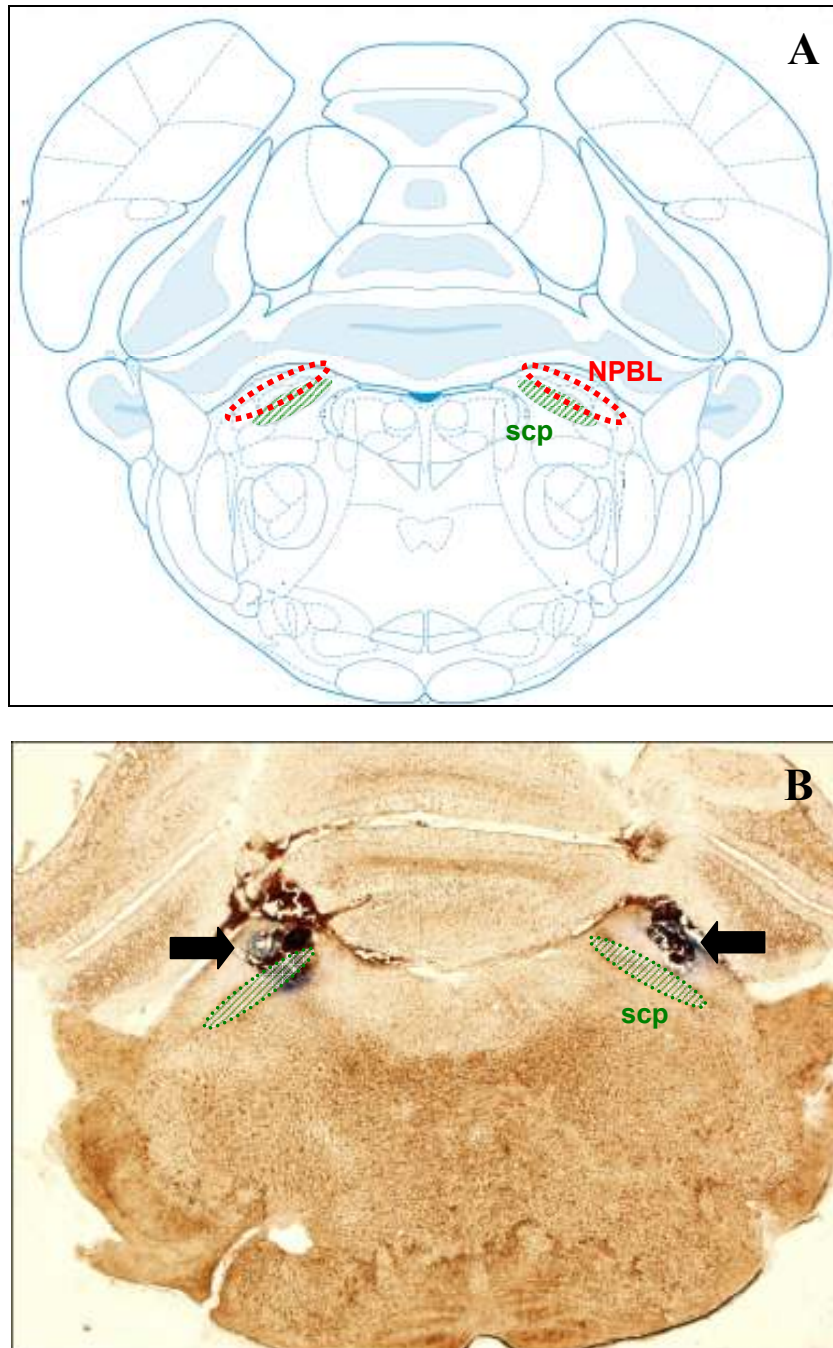


FIGURA 2. A) Diagrama com demarcação da região do NPBL, destacado em pontilhados vermelhos (adaptado de Paxinos e Watson, 2004), e B) Fotomicrografia de um corte histológico mostrando os pontos de injeções bilaterais típicas no NPBL (setas) de um rato representativo dos animais estudados. scp, pedúnculo cerebelar superior (área destacada em verde).

4.2. Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M e peso corporal em ratos com lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA.

Comparado com pré-lesões, a ingestão diária de NaCl 0,3 M em ratos com lesões fictícias teve uma tendência de aumento após o sexto dia de cirurgia, resultando em uma diferença significativa na ingestão diária de NaCl 0,3 M deste grupo no décimo sétimo dia de teste [$F(21,308) = 1,78$; $p < 0,05$], enquanto o oposto ocorreu após as lesões do CeA (Fig. 3A). Essas tendências contrárias resultaram em uma diferença significativa na ingestão diária de NaCl 0,3 M entre ratos com lesões fictícias e lesões do CeA após o oitavo dia das lesões, [$F(1,308) = 70,85$; $p < 0,05$] (Figura 3A).

Comparando-se com lesões fictícias, ocorreu redução da ingestão diária de água por duas semanas após as lesões bilaterais do CeA [$F(1,308) = 105,75$; $p < 0,05$] (Figura 3B). Entretanto, comparado com o período pré-lesões, a ingestão diária de água foi reduzida somente nos dois primeiros dias após as lesões bilaterais do CeA [$F(21,308) = 3,82$; $p < 0,001$] (Figura 3B).

Lesões bilaterais do CeA reduziram o peso corporal durante todo o período de estudo (18 dias) [$F(1,84) = 46,62$; $p < 0,05$], (Tabela 1).

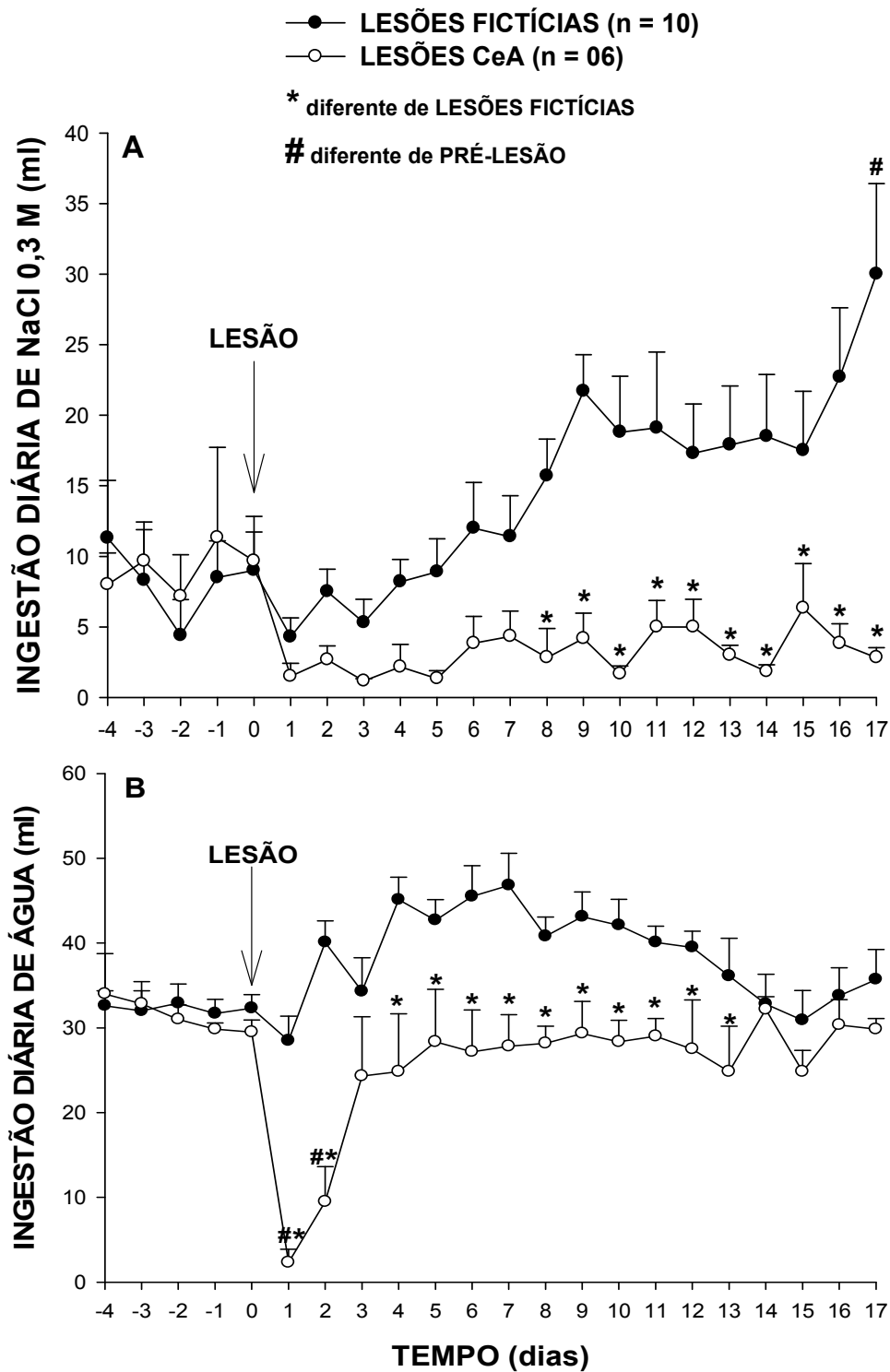


FIGURA 3. Ingestão diária de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos a lesões fictícias ou lesões eletrolíticas bilaterais do CeA. Resultados são expressos como média \pm EPM; n = número de ratos.

Tabela 1: Peso corporal de ratos com lesões fictícias ou eletrolíticas do CeA.

TEMPO (dias)	PESO CORPORAL (g)	
	LESÕES FICTÍCIAS (n = 10)	LESÕES CeA (n = 06)
-5	262 ± 3	260 ± 3
0	294 ± 2	286 ± 3
5	312 ± 6	263 ± 13*
8	328 ± 7	292 ± 10*
15	356 ± 5	313 ± 12*
18	371 ± 7	330 ± 13*

0 dia das lesões. * diferente de LESÕES FICTÍCIAS.

Valores são media ± SEM; $p < 0,05$; n = número de ratos.

4.3. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados com lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL de ratos com lesões fictícias do CeA induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($16,1 \pm 5,4$ ml/4 h, vs. salina: $1,3 \pm 0,5$ ml/4 h), [F(3,224) = 23,0; $p < 0,001$], e ingestão de água ($8,2 \pm 3,5$ ml/4 h, vs. salina: $1,6 \pm 0,7$ ml/4 h), [F(3,224) = 9,7; $p < 0,001$] (Figura 4).

Lesões bilaterais do CeA (3 dias) aboliram a ingestão de água ($0,1 \pm 0,05$ ml/4 h) e NaCl 0,3 M ($0,1 \pm 0,1$ ml/4 h) produzida pelas injeções de muscimol no NPBL em ratos com lesões fictícias (Figura 4).

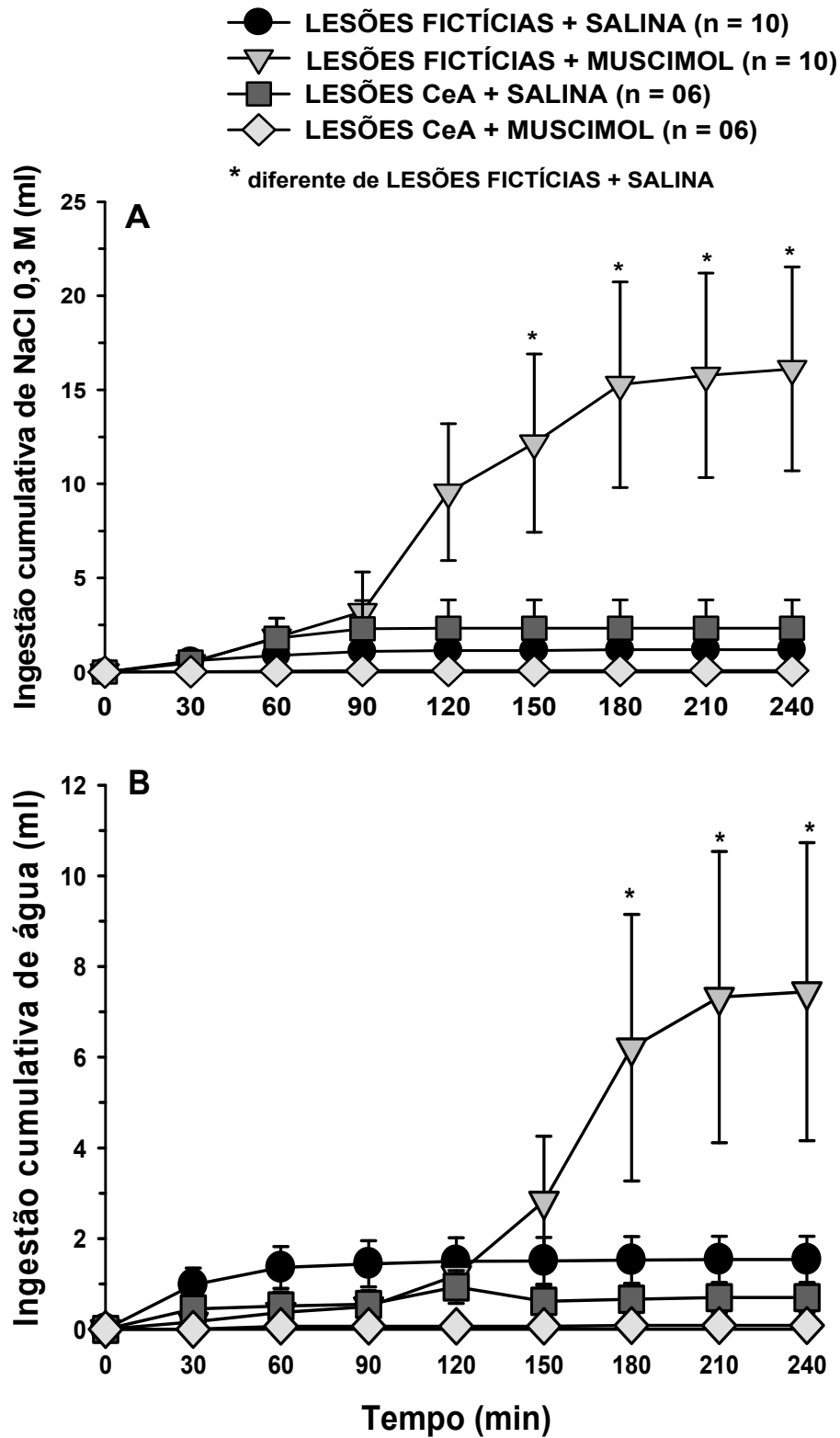


FIGURA 4. Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M e **B)** água em ratos submetidos a lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL. Resultados são expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

4.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP em ratos submetidos a lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA tratados com moxonidina no NPBL.

Comparado-se com a ingestão em ratos com lesões fictícias, as lesões bilaterais do CeA (5 e 8 dias) não afetaram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc (Figura 5).

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL de ratos com lesões fictícias tratados com FURO + CAP sc promoveram um aumento na ingestão de NaCl 0,3 M ($31,5 \pm 4,2$ ml/2 h vs. veículo: $5,2 \pm 0,9$ ml/2 h) [$F(3,140) = 74,1$; $p < 0,001$] (Fig. 5A), e água ($19,9 \pm 3,2$ ml/2 h, vs. veículo: $12,8 \pm 0,7$ ml/2 h) [$F(3,140) = 21,06$; $p < 0,001$] (Figura 5B).

Lesões bilaterais do CeA (5 e 8 dias) aboliram o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M ($11,7 \pm 2,8$ ml/2 h) produzido pelas injeções de moxonidina no NPBL de ratos com lesões fictícias tratados com FURO+CAP sc (Figura 5A). Mais do que abolir o aumento da ingestão de água, lesões bilaterais do CeA combinadas com injeções de moxonidina no NPBL reduziram a ingestão de água induzida por FURO+CAP sc para valores abaixo dos níveis controle ($6,7 \pm 1,8$ ml/2 h) (Figura 5B).

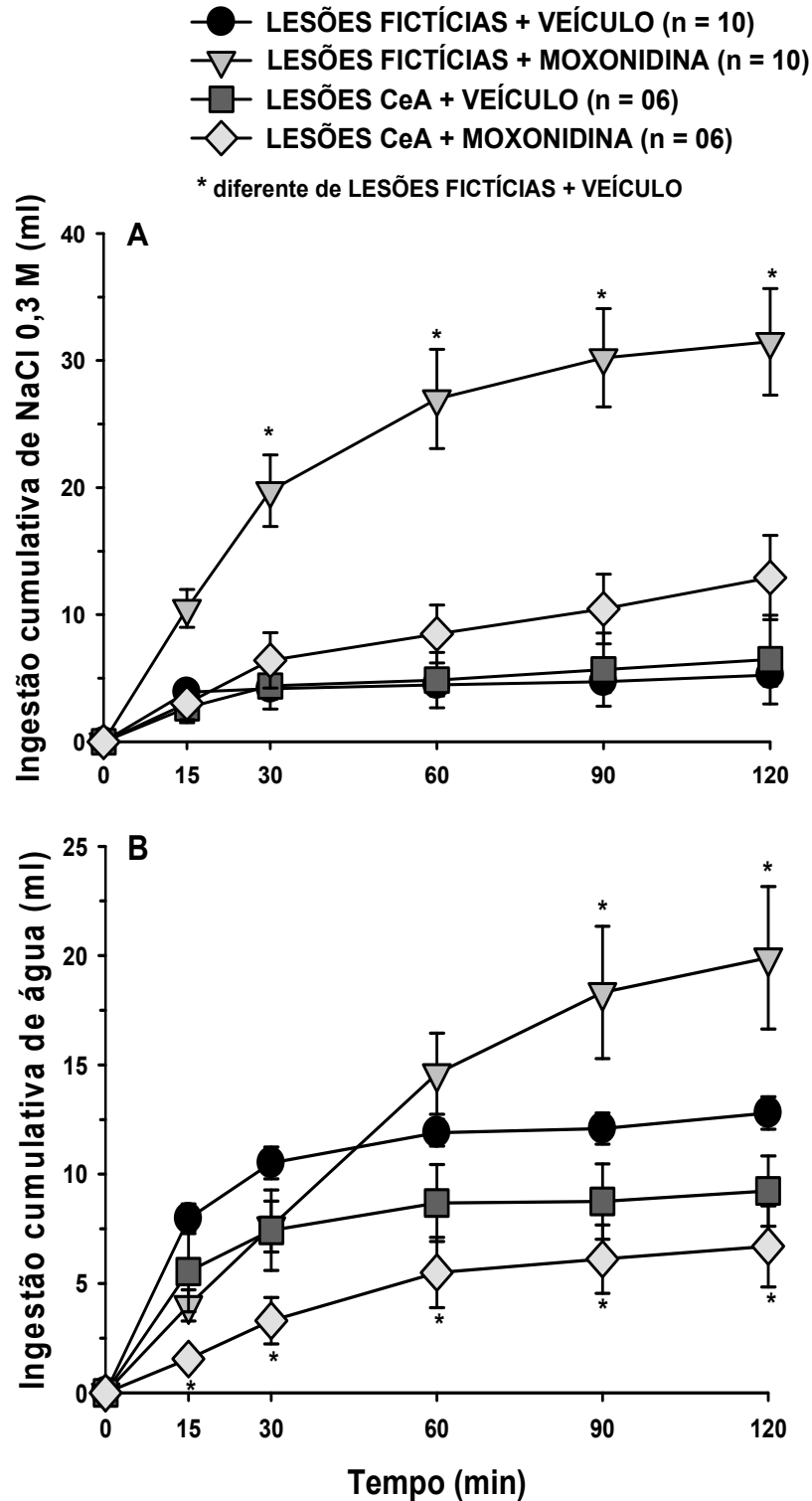


FIGURA 5. Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M e **B)** água induzida por FURO+CAP sc em ratos submetidos a lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL 5 e 8 dias após as lesões. Resultados são expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

4.5. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP em ratos submetidos a lesões fictícias ou eletrolíticas do CeA tratados com metisergida no NPBL.

Comparado-se com a ingestão em ratos com lesões fictícias, as lesões bilaterais do CeA (15 e 18 dias) também não afetaram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc (Figura 6).

Injeções bilaterais de metisergida (4 µg/0,2 µl) no NPBL de ratos com lesões fictícias tratados com FURO + CAP aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M (18,3 ± 3,1 ml/2 h, vs. veículo: 8,3 ± 1,1 ml/2 h) [F (3,140) = 13,8; p <0,001] e água (22,4 ± 2,5 ml/2 h vs. veículo: 11,7 ± 1,2 ml/2 h) [F (3,140) = 16,7; p <0,001] (Figura 6).

Lesões bilaterais do CeA (15 e 18 dias) aboliram o aumento na ingestão de NaCl 0,3 M e água produzida pelas injeções de metisergida no NPBL de ratos submetidos a lesões fictícias tratados com FURO+CAP (Figura 6).

Exceto o aumento na ingestão de água e NaCl 0,3 M, após as injeções de metisergida ou moxonidina no NPBL, ratos com lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA não apresentaram outras respostas comportamentais anormais.

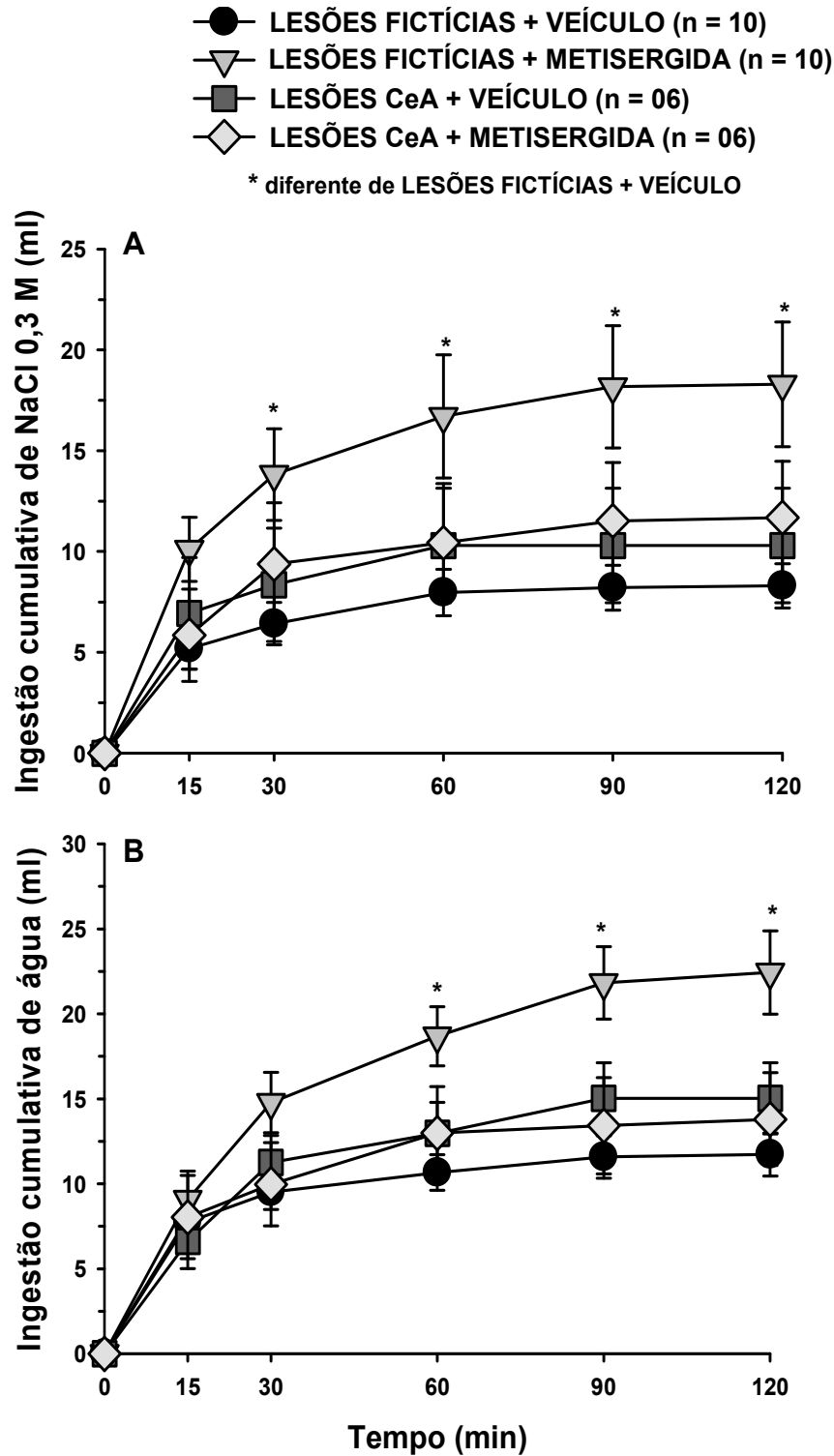


FIGURA 6. Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M e **B)** água induzida por FURO+CAP sc em ratos submetidos a lesões fictícias ou eletrolíticas bilaterais do CeA que receberam injeções bilaterais de metisergida (4 μ g/0,2 μ l) ou veículo no NPBL 15 e 18 dias após as lesões. Resultados são expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

4.6. Especificidade do NPBL como área onde as injeções de moxonidina ou metisergida produzem efeitos na ingestão de água e NaCl 0,3 M.

A especificidade do NPBL como o sitio de injeções que produzem os efeitos da moxonidina e metisergida na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO+CAP foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos nos quais a moxonidina, metisergida ou salina foram bilateralmente injetadas 1 mm acima do NPBL. Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) 1 mm acima do NPBL não produziram qualquer efeito na ingestão de NaCl 0,3 M [$F(2,12) = 0,93$; $p > 0.05$] nem na ingestão de água [$F(2,12) = 0,21$; $p > 0.05$] induzida por FURO+CAP sc (Tabela 2), quando comparado ao tratamento com veículo no NPBL. Injeções bilaterais de metisergida (4 µg/0,2 µl) 1 mm acima do NPBL também não produziram qualquer efeito na ingestão de NaCl 0,3 M nem na ingestão de água induzida por FURO+CAP sc (Tabela 2), quando comparado ao tratamento com veículo no NPBL.

Tabela 2. Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO+CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l), metisergida (4 μ g/0,2 μ l) ou veículo 1 mm acima do NPBL.

Tratamento	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)				
	15	30	60	90	120 min
Veículo	3,7 \pm 0,8	3,9 \pm 0,8	4,1 \pm 0,9	4,3 \pm 0,9	4,4 \pm 0,8
Moxonidina	4,2 \pm 1,1	7,1 \pm 1,5	7,5 \pm 1,5	7,7 \pm 1,5	7,7 \pm 1,5
Metisergida	2,1 \pm 0,9	3,1 \pm 0,9	4,9 \pm 1,8	5,8 \pm 2,2	7,0 \pm 2,5

Tratamento	Ingestão de água (ml)				
	15	30	60	90	120 min
Veículo	11,6 \pm 0,8	12,7 \pm 1,1	14,1 \pm 1,3	14,1 \pm 1,3	14,1 \pm 1,3
Moxonidina	8,3 \pm 2,0	12,7 \pm 1,0	15,9 \pm 1,3	16,1 \pm 1,3	16,1 \pm 1,4
Metisergida	8,6 \pm 1,5	13,6 \pm 1,4	16,1 \pm 1,8	16,7 \pm 2,1	17,5 \pm 2,3

Valores são media \pm EPM; n = 08.

4.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e no CeA

Muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) injetado bilateralmente no NPBL combinado com injeções de salina no CeA em ratos saciados induziu ingestão de água ($8,8 \pm 3,2$ ml/4 h vs. salina: $0,9 \pm 0,5$ ml/4 h) [$F(3,30) = 6,61$; $p < 0,05$], (Figura 7A) e de NaCl 0,3 M ($19,1 \pm 6,4$ ml/4 h vs. salina: $1,2 \pm 0,8$ ml/4 h) [$F(3,30) = 9,22$; $p < 0,05$], (Figura 7B).

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no CeA aboliram a ingestão de água ($0,1 \pm 0,02$ ml/4 h) e de NaCl 0,3 M ($0,1 \pm 0,04$ ml/4h) induzida pelas injeções de muscimol no NPBL. Injeções bilaterais de muscimol no CeA combinadas com salina no NPBL não promoveram qualquer ingestão de água ou de NaCl.

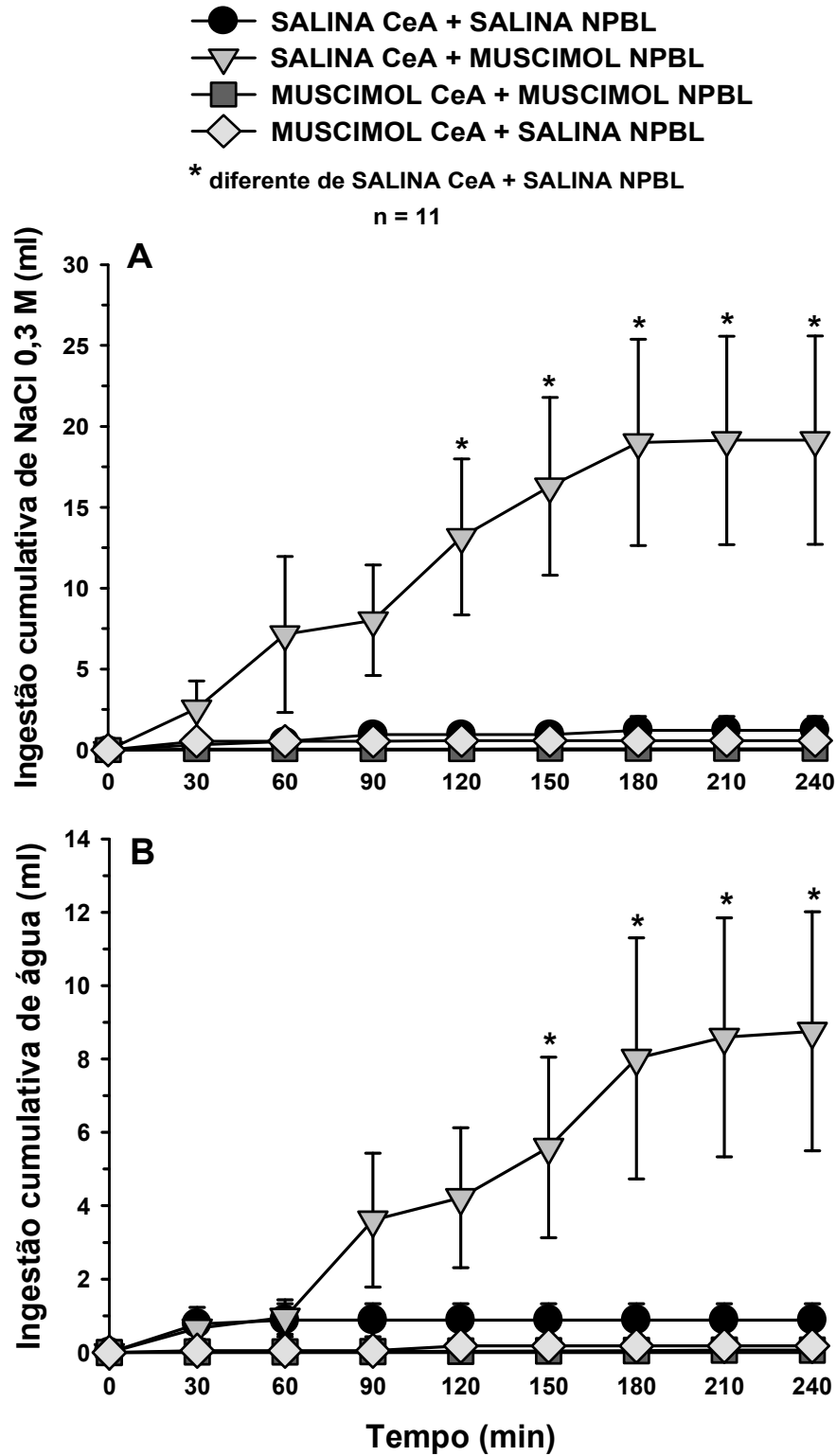


FIGURA 7. Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M e **B)** água em animais saciados tratados com muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina no CeA e no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

4.8. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc em ratos tratados com moxonidina no NPBL combinada com muscimol no CeA.

Em animais tratados com FURO+CAP sc que receberam injeções de salina no CeA, as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram tanto a ingestão de água, ($26,4 \pm 6,7$ ml/2 h vs. veículo: $8,2 \pm 1,6$ ml/2 h) [F(3,18) = 9,1; $p < 0,05$], (Figura 8A), quanto a ingestão de NaCl 0,3 M ($29,7 \pm 7,2$ ml/2 h vs. veículo: $4,4 \pm 1,6$ ml/2 h) [F(3,18) = 10,0; $p < 0,05$], (Figura 8B).

Injeções bilaterais de muscimol (0,25 nmol/0,2 μ l) no CeA aboliram o aumento da ingestão de água ($3,3 \pm 2,3$ ml/2 h) e de NaCl 0,3 M ($2,8 \pm 1,6$ ml/2 h) induzido pelas injeções de moxonidina no NPBL. Muscimol injetado no CeA em ratos tratados com veículo no NPBL não modificou a ingestão de água ($4,2 \pm 1,5$ ml/2 h) e de sódio ($1,1 \pm 0,5$ ml/2 h) induzida por FURO+CAP.

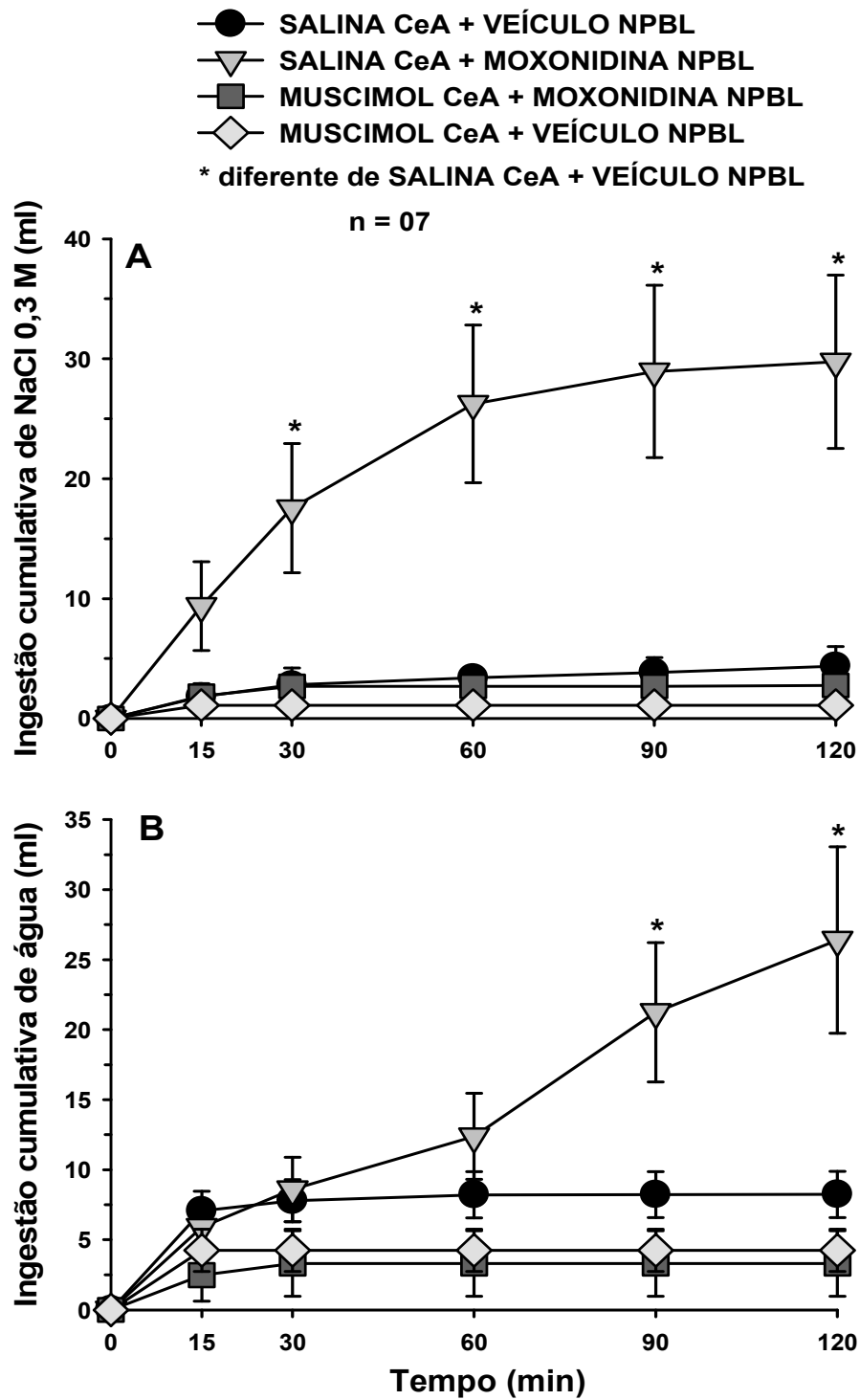


FIGURA 8. Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M e **B)** água induzida por FURO+CAP sc em ratos tratados com muscimol (0,25 nmol/0,2 ml) ou salina no CeA e moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veiculo no NPBL. Resultados são expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que lesões bilaterais do CeA aboliram a ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de muscimol no NPBL em animais saciados e normovolemicos, assim como o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de moxonidina ou metisergida no NPBL em animais previamente tratados com FURO+CAP sc. As lesões do CeA não afetaram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc, sugerindo que lesões do CeA, nessa situação particular, prejudica principalmente os mecanismos que estimulam o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M após a desativação de mecanismos inibitórios pelo bloqueio de receptores serotoninérgicos ou ativação de receptores adrenérgicos α_2 ou gabaérgicos no NPBL.

Como a lesão eletrolítica além de destruir os neurônios do CeA, também danifica fibras de passagem, foi realizado um protocolo adicional para verificar se os efeitos das lesões do CeA seriam devidos especificamente a destruição de corpos celulares dos neurônios. Assim, foram utilizadas injeções de muscimol no CeA, o qual produz uma inibição neuronal reversível o que permitiu comparar o comportamento do mesmo animal estando o CeA com sua atividade normal ou inibida pelo muscimol.

Os resultados mostram que injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol) no CeA também aboliram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzidas pelas injeções de muscimol (0,5 nmol) no NPBL, como também muscimol (0,25 nmol) no CeA aboliu o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções de moxonidina no NPBL em animais tratados com FURO+CAP. Esses resultados confirmam a importância do CeA no comportamento de ingestão de sódio produzido quando o mecanismo inibitório do NPBL está bloqueado.

Para os testes com muscimol no CeA foram utilizadas duas doses diferentes (0,25 e 0,5 nmol). Inicialmente foi utilizada a dose de 0,5 nmol no CeA combinada com a mesma dose de muscimol no NPBL, mas essa dose de muscimol no CeA pareceu induzir um pouco de sedação nos animais o que poderia comprometer os resultados. Assim, nos testes seguintes em combinação com moxonidina no NPBL a dose de muscimol no CeA foi reduzida para 0,25 nmol. A

dose de 0,25 nmol de muscimol no CeA aparentemente não produziu nenhuma sedação e os resultados na ingestão de sódio e água são coerentes com o que foi obtido com a dose maior de muscimol no CeA. Assim como ocorreu com as lesões eletrolíticas do CeA, também as injeções de muscimol no CeA não modificaram a ingestão de água e de sódio produzida por FURO+CAP, embora tenha ocorrido uma tendência de redução desses comportamentos após o tratamento do CeA com muscimol. Como o volume de NaCl 0,3 M ingerido pelos animais tratados com FURO+CAP é pequeno, muitas vezes é difícil se observar uma eventual inibição dessa ingestão. Assim, estudos usando protocolos onde a ingestão de NaCl 0,3 M é maior (como, por exemplo, o protocolo de 24 h de depleção de sódio) terão que ser feitos para se confirmar os efeitos das injeções de muscimol no CeA na ingestão de sódio numa condição na qual os mecanismos inibitórios do NPBL não estejam inibidos.

Outros estudos já avaliaram os efeitos da injeção de muscimol no CeA sobre outras respostas comportamentais. O labirinto em cruz elevado é um modelo para se testar ansiedade em animais, o qual se baseia na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são usados como indicadores inversamente relacionados à ansiedade: quanto mais intensa a exploração dos braços abertos, menor a ansiedade (PELLOW e cols., 1985; HOGG, 1996). A administração de ansiolíticos, como clordiazepóxido e diazepam, promovem aumentos seletivos na exploração dos braços abertos (PELLOW e cols., 1985). Moreira e colaboradores (2007) mostraram que a inativação do CeA, produzida pela injeção de muscimol (1 nmol/0,2 µl), causa um efeito semelhante à administração de ansiolíticos, pois eleva o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos. Esses resultados mostram que após a injeção de muscimol no CeA há um aumento no comportamento exploratório, ou seja, o animal não se encontra debilitado, pois sua atividade locomotora está intacta e até mesmo aumentada. Portanto, com esses dados da literatura também é possível se confirmar que as doses de muscimol (0,25 e 0,5 nmol) que foram injetadas no CeA no presente estudo não seriam doses capazes de comprometer a atividade motora dos animais, ou seja, a inibição da ingestão de água e sódio produzida pelas injeções de muscimol no CeA não se deve a incapacidade motora dos animais. Porém, diferentemente das lesões eletrolíticas do CeA que já se sabe que inibe

especificamente a ingestão de sódio, no caso das injeções de muscimol, não se pode ainda excluir alguma inibição inespecífica dos comportamentos ingestivos por esse tratamento.

A amígdala apresenta particular interesse no comportamento motivado de ingestão de sódio por manter conexões recíprocas com áreas bulbares como o NTS e da ponte como o NPBL, que são centros processadores de informações gustatórias e viscerais (NORGREN, 1995). Estudos prévios mostraram que lesões eletrolíticas bilaterais do CeA aboliram a ingestão diária de NaCl 0,5 M e o apetite ao sódio induzido por DOCA ou ioimbina sc, injeções icv de renina ou por 24 h de depleção de sódio, sem modificar a ingestão de solução de sacarose ou água (GALAVERNA e cols., 1992; ZARDETTO-SMITH e cols., 1994). Entretanto, os resultados do presente estudo mostram que as lesões do CeA não afetaram a ingestão de sódio induzida por FURO+CAP por razões ainda não entendidas. Talvez isto esteja relacionado com a extensão das lesões produzidas no presente estudo quando comparado com outros trabalhos (GALAVERNA e cols., 1992; ZARDETTO-SMITH e cols., 1994) ou é uma particularidade do modelo FURO+CAP que combina o aumento da formação central de ANG II com uma hipotensão branda (FITTS & MASSON, 1989; THUNHORST & JOHNSON, 1994). Além disso, a maioria dos estudos relacionados testaram os efeitos de lesões do CeA na ingestão de NaCl 0,5 M, concentração esta considerada mais aversiva que o NaCl 0,3 M testado no presente estudo.

Embora as lesões do CeA não tenham afetado a ingestão de sódio induzida por FURO+CAP, essas lesões aboliram a ingestão de sódio dependente da desativação dos mecanismos inibitórios produzida pelas injeções de moxonidina, metisergida ou muscimol no NPBL, o que sugere conexão entre os mecanismos inibitórios do NPBL e os mecanismos facilitatórios do CeA no controle da ingestão de sódio.

O NPBL, uma estrutura pontina que situa-se dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior, apresenta um importante mecanismo inibitório que controla a ingestão de água e NaCl, (EDWARDS & JOHNSON, 1991; MENANI & JOHNSON, 1995; COLOMBARI e cols., 1996; MENANI e cols., 1996; 1998a,b; 2000). O NPBL recebe muitas fibras provenientes da AP/NTSm (NORGREN, 1981; SHAPIRO & MISELIS, 1985). A região AP/NTSm, por sua vez, recebe projeções aferentes dos receptores de volume (barorreceptores arteriais e receptores

cardiopulmonares), receptores gustatórios e outros receptores viscerais (NORGREN, 1981) e estes receptores podem influenciar a ingestão de água e sódio (JOHNSON & THUNHORST, 1997). O NPBL também envia projeções para as áreas anteriores do cérebro envolvidas no controle hidroeletrólítico, tais como OSF, MnPO, NPV e amígdala (CIRIELLO e cols., 1984; JHAMANDAS e cols., 1992; KRUKOFF e cols., 1993). Dessa forma, o NPBL pode ser uma região de integração entre as vias ascendentes vindas do NTSm e AP e as áreas anteriores envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico. As células do NPBL são ativadas após a ingestão de soluções de sódio por animais com desidratação intra e extracelular, (KOBASHI e cols., 1993; YAMAMOTO e cols., 1993; FRANCHINI & VIVAS, 1999), sugerindo que as células do NPBL podem ser ativadas por estímulos viscerais e talvez de sabor. Sinais vindos de diferentes tipos de receptores ativariam mecanismos inibitórios para o controle da ingestão de água e NaCl liberando diferentes neurotransmissores no NPBL tais como serotonina, CCK, glutamato, peptídeos opioidérgicos, GABA e também influenciando a atividade de receptores adrenérgicos α_2 (MENANI & JOHNSON, 1995; COLOMBARI e cols., 1996; MENANI e cols., 1996; XU e cols., 1997; MENANI & JOHNSON, 1998, 1998a,b, 2000; DE GOBBI e cols., 2001; ANDRADE e cols., 2004; CALLERA e cols., 2005; ANDRADE e cols., 2006; DE OLIVEIRA e cols., 2007, 2008).

Com a associação de técnicas de marcadores neuronais retrógrados e anterógrados e imunoistoquímica, foi demonstrada a existência de conexões monossinápticas GABAérgicas entre o CeA e o NPBL, (JIA e cols., 2005). Recentemente foi verificado que injeções da subunidade β da toxina colérica no NPBL produziu tanto marcação retrógrada em corpos celulares de neurônios do NTS sensíveis a aldosterona, quanto marcação axonal anterógrada no CeA, enquanto que a injeção dessa toxina no CeA evidenciou uma projeção descendente da amígdala para o NTS medial, (GEERLING & LOEWY, 2006). O CeA também está diretamente conectado com o NTS particularmente com a região do NTS rico em neurônios HSD2 que são ativados por mineralocorticóides e desativados pela ingestão de sódio (GEERLING & LOEWY, 2007). Esses autores sugeriram que esse circuito NTS – NPBL – CeA – NTS pode ser considerado como uma base neuroanatômica para a modulação da ingestão de sódio pelo CeA (GEERLING & LOEWY, 2006).

Os presentes resultados mostram que injeções bilaterais de muscimol no CeA e/ou lesões eletrolíticas do CeA aboliram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelas injeções de muscimol no NPBL e também o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções de moxonidina ou metisergida no NPBL em animais tratados com FURO+CAP. Portanto, a ingestão de água e mais especificamente de NaCl 0,3 M que resulta do bloqueio do mecanismo inibitório do NPBL parece ser totalmente dependente de sinais facilitatórios presentes no CeA. A Figura 9 apresenta um possível modelo esquemático mostrando a interação entre o NPBL e o CeA no controle da ingestão de água e sódio. De maneira geral, sugere-se que mecanismos excitatórios tais como mineralocorticóides e ANG II ativados pelo tratamento com FURO+CAP promovem a ativação de áreas prosencefálicas tais como a CeA e órgãos cincunventriculares, o que leva a ativação e facilitação da ingestão de sódio. Com o aumento da ingestão de sódio, informações de receptores viscerais ou gustatórios chegam ao NPBL, por intermédio da AP/NTS, ativando o seu mecanismo inibitório, inibindo assim as áreas prosencefálicas ou mais especificamente o CeA, inibindo ou reduzindo assim a ingestão de sódio. Porém, com os presentes resultados, não é possível saber se os mecanismos inibitórios do NPBL inibem diretamente neurônios do CeA ou inibem neurônios de outras áreas do cérebro que são ativadas por sinais enviados a partir do CeA. Ainda assim, considerando-se essa segunda possibilidade, haveria uma interação entre sinais facilitatórios provenientes da amígdala e sinais inibitórios provenientes do NPBL controlando então a ingestão de sódio.

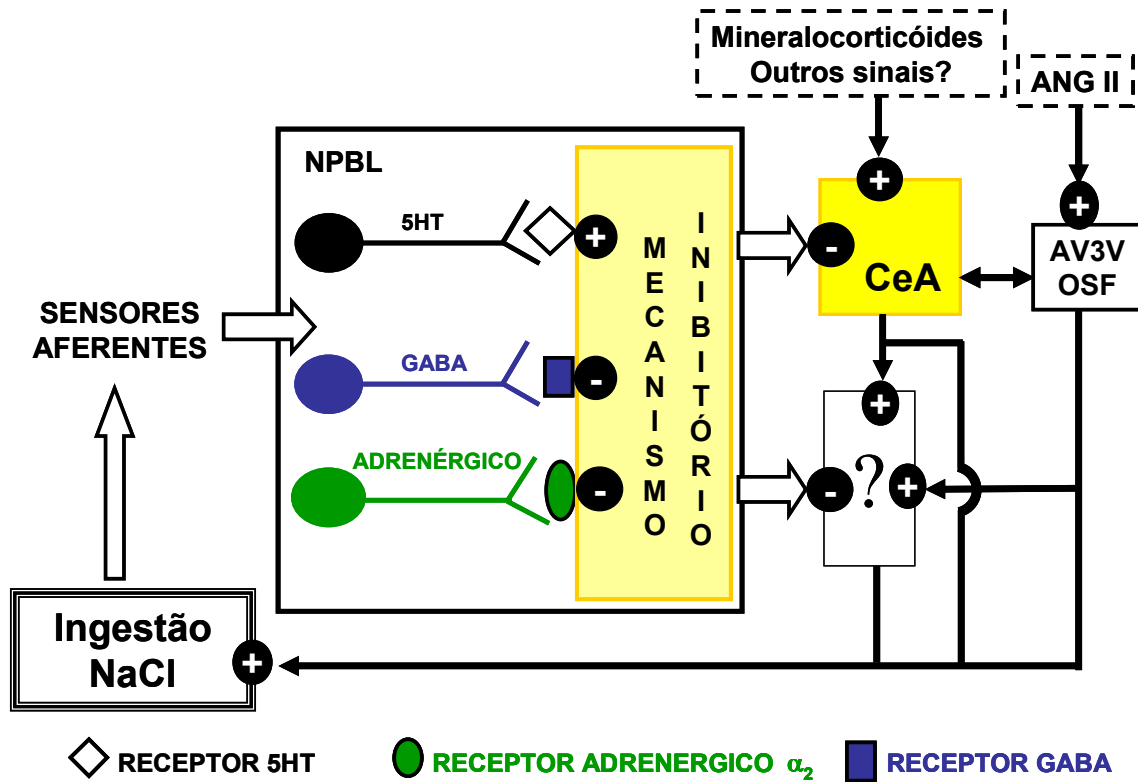


FIGURA 9. Diagrama esquemático mostrando um possível modelo para a conexão entre o mecanismo inibitório do NPBL e o mecanismo facilitatório do CeA para o controle da ingestão de sódio. 5HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AV3V, região anteroventral do terceiro ventrículo; CeA, núcleo central da amígdala; OSF, órgão subfornical.

Portanto, o presente estudo sugere que o NPBL e o CeA estão fortemente conectados no controle do apetite ao sódio. Parece que o aumento na ingestão de sódio produzida pela desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL é totalmente dependente dos mecanismos facilitatórios presentes no CeA. É possível que os mecanismos inibitórios do NPBL atuem reduzindo a atividade dos neurônios do CeA e, portanto, após lesões ou bloqueios farmacológicos do CeA os mecanismos inibitórios do NPBL não possam mais modular a ingestão de sódio, devido à inexistência do mecanismo facilitatório que seria modulado.

Os efeitos das lesões do CeA abolindo o aumento da ingestão de sódio produzido pelas injeções de metisergida no NPBL em ratos tratados com FURO+CAP é semelhante ao efeito do bloqueio dos receptores AT₁ do OSF com losartan, que também aboliu o aumento da ingestão de sódio produzido pelas injeções de metisergida no mesmo protocolo experimental (COLOMBARI e cols., 1996). Portanto, considerando os prévios e os presentes resultados parece que sinais facilitatórios produzidos pela ativação de receptores AT₁ do OSF em ratos tratados com FURO+CAP assim como os sinais facilitatórios oriundos do CeA seriam essenciais para que ocorresse o aumento da ingestão de sódio quando os mecanismos inibitórios do NPBL são desativados pela ação da metisergida. Com esses resultados, é possível se pensar também que o CeA estaria sendo ativado por sinais facilitatórios provenientes da ação da ANG II produzida pelo tratamento com FURO+CAP atuando no OSF, ou seja, ANG II ativaria neurônios do OSF, que por sua vez ativariam neurônios do CeA antes de se alcançar circuitos superiores que estimulariam a motivação para a ingestão de sódio. No CeA ou em algum outro ponto do circuito ativado a partir do CeA esses sinais facilitatórios seriam modulados pela ação dos mecanismos inibitórios do NPBL.

Outro aspecto interessante é que o bloqueio dos receptores AT₁ do OSF com losartan, à semelhança do que acontece com as lesões bilaterais ou injeções de muscimol no CeA, também não afeta a ingestão de sódio induzida pelo tratamento apenas com FURO+CAP, isto é, na ausência das injeções de metisergida no NPBL, quando o mecanismo do NPBL está atuando normalmente, os mecanismos facilitatórios do OSF ou do CeA não estariam envolvidos na ingestão de sódio produzida por FURO+CAP. Portanto, essa é mais uma evidência de uma possível conexão entre os mecanismos facilitatórios do OSF e do CeA no controle da ingestão de sódio. No caso, as duas áreas seriam importantes para a ingestão de

sódio que ocorre na ausência do mecanismo inibitório do NPBL, mas não para a ingestão basal induzida por FURO+CAP. Por outro lado, embora não seja devido à ativação de receptores AT_1 do OSF, a ingestão de água induzida por FURO+CAP é dependente da ação central da ANG II (FITTS & MASSON, 1989; THUNHORST e cols., 1998). Existem outras áreas centrais como OVLT e MnPO onde a ANG II também poderia atuar para estimular a ingestão basal de sódio produzida por FURO+CAP, mas somente futuros estudos envolvendo especificamente essas áreas poderão determinar qual delas seria a responsável por essa ingestão de sódio. E enquanto os sinais facilitatórios para ingestão de sódio produzidos pela ativação angiotensinérgica do OSF, assim como os do CeA poderiam ser totalmente inibidos pelos mecanismos do NPBL, os sinais facilitatórios das outras áreas não estariam sujeitos ao mesmo controle e seriam capazes de produzir a ingestão basal de sódio produzido pelo tratamento com FURO+CAP.

6. CONCLUSÃO

- Lesões eletrolíticas bilaterais do CeA não modificaram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO+CAP sc, mas aboliram tanto a ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de muscimol no NPBL em animais saciados e normovolemicos como o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de moxonidina ou metisergida no NPBL em animais previamente tratados com FURO+CAP sc.

- O bloqueio farmacológico do CeA com injeções bilaterais de muscimol aboliu tanto o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pelas injeções de moxonidina no NPBL em animais tratados com FURO+CAP sc, quanto a ingestão de água e NaCl 0,3 M produzida pelas injeções bilaterais de muscimol no NPBL em animais saciados e normovolemicos, confirmando assim a importância do CeA no comportamento de ingestão de sódio.

- Portanto, parece que o aumento na ingestão de sódio produzido pela desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL é totalmente dependente da integridade do CeA, sugerindo uma conexão entre os mecanismos inibitórios do NPBL e os mecanismos facilitatórios do CeA no controle da ingestão de sódio.

7. REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. M., MCKINLEY, M. J., MENDELSON, F. A. O. Comparative neuroanatomy of angiotensin receptor localization in the mammalian hypothalamus. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 15, p. 137-145, 1988.
- ANDERSSON, B. Regulation of water intake. **Physiol. Rev.**, v. 58, p. 582-603, 1978.
- ANDRADE, C.F.A.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA JR, L.A.; MENANI, J.V. Activation of alpha₂-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25-34, 2004.
- ANDRADE, C.F.A.; DE LUCA JR, L.A.; COLOMBARI, D.S.A; MENANI, J.V. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21-28, 2006.
- ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S. M., ROGERS, L. C., SAMSON, W. K. Atrial natriuretic factor inhibits water intake in conscious rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 8720-8724, 1985.
- ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S. M., SAMSON, W. K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. **Endocrinology**, v. 118, p. 1726-1729, 1986.
- AZUMA, S., YAMAMOTO, T., KAWAMURA, Y. Studies on gustatory responses of amygdaloid neurons in rats. **Exp. Brain Res.**, v. 56, p. 12-22, 1984.
- BAXTER, J. D., LEWICKI, J. A., GARDNER, D. G. Atrial Natriuretic Peptide. **Bio. Technology**, v. 295, p. 529-546, 1988.
- BLACKBURN, R. E., SAMSON, W. K., FULTON, R. J., SRICKER, E. M., VERBALIS, J. G. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. R245-R251, 1995.
- BONINI, J.S., BEVILAQUA, L.R., ZINN, C.G., KERR, D.S., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Horm. Behav.**, v. 50, p. 308-313, 2006.
- BOOTH, R. E., JOHNSON, J. P., STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 26, p. 8-20, 2002.
- CALLERA, J. C., OLIVEIRA, L. B., BARBOSA, S. P., COLOMBARI, D. S. A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. GABAA receptor activation in the lateral

- parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, p. 725-735, 2005.
- CIRIELLO, J., LAWRENCE, D., PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res.**, v. 322, p. 388-392, 1984.
- COLOMBARI, D. S. A., MENANI, J. V., JOHNSON, A. K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. R1470-R1476, 1996.
- COVIAN, M. R., ANTUNES-RODRIGUES, J., GENTIL, C. G., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. A., SILVA NETO, C. R. Central control of salt balance. In: MOGENSEN, G. J., CALARESU, F. R. (Eds.). **Neural Integration of Physiological Mechanisms and Behaviour**. Toronto: University of Toronto Press, 1975. p. 267-282.
- DE OLIVEIRA, L.B., DE LUCA JR, L.A., COLOMBARI, D.S.A., COLOMBARI, E., MENANI, J.V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, p. 350-358, 2008.
- DE OLIVEIRA, L. B., CALLERA, J. C., DE LUCA JR, L. A., COLOMBARI, D. S. A., MENANI, J. V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Res. Bull.**, v. 73, p. 238-247, 2007.
- DE BOLD, A. J., BOVEINSTEIN, H. B., VERESS, A. T., SONERBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci.**, v. 28, p. 98-94, 1981.
- DE CASTRO E SILVA, E., FREGONEZE, J. B., JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 290, p. R1136-R1141, 2006.
- 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 Res.**, v. 880, p. 131-138, 2000.
- DE GOBBI, J. I. F., DE LUCA JR, L. A., JOHNSON, A. K., MENANI, J. V. Interaction of serotonin and cholecystinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. R1301-R1307, 2001.
- DE GOBBI, J.I.F., BELTZ, T.G., JOHNSON, R.F., MENANI, J.V., THUNHORST, R.L., JOHNSON, A.K. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Res.**, v. 1301, p. 44-51, 2009.

- DE LUCA JR, L. A., BARBOSA, S. P., MENANI, J. V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, p. 1055-1061, 2003.
- DE LUCA JR, L. A., VIVAS, L., MENANI, J. V. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A. C., ELIAS, L. L. K., CASTRO, M. (Eds.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 10 , p. 116-131.
- EDWARDS, G. L. & JOHNSON, A. K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. R1039-R1044, 1991.
- FITTS, D. A. & MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav. Neurosci.**, v. 103, p. 865-872, 1989.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 583-686, 1998.
- FRANCHINI, L. F. & VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1180-R1187, 1999.
- FULWILER, C. E. & SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 319, p. 229-259, 1984.
- GALAVERNA, O., DE LUCA JR, L. A., SCHULKIN, J., YAO, S. Z., EPSTEIN, A. K. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 28, n. 1, p. 89-98, 1992.
- GALAVERNA, O. G., SEELEY, R. J., BERRIDGE, K. C. GRILL, H. J., EPSTEIN, A. N, SCHULKIN, J. Lesion of the central nucleus of the amygdala I: effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. **Behav. Brain Res.**, v. 59, p. 11-17, 1993.
- GEERLING, J. C. and LOEWY, A. D. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. **J. Comp. Neurol.**, v. 497, p. 646-657, 2006.
- GEERLING, J. C. & LOEWY, A. D. Sodium Deprivation and Salt Intake Activate Separate Neuronal Subpopulations in the Nucleus of the Solitary Tract and the Parabrachial Complex. **J. Comp. Neurol.**, v. 504, p. 379-403, 2007.

- HERBERT, H., MOGA, M. M., SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 293, p. 540-580, 1990.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 21-30, 1996.
- 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. **Neurosci. Lett.**, v. 382, p. 153–157, 2005.
- JHAMANDAS, J. H., HARRIS, K. H., PETROV, T., KRUKOFF, T. L. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 4, p. 461-471, 1992.
- JHAMANDAS, J. H., PETROV, T., HARRIS, K. H., VU, T., KRUKOFF, T. L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat. Electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res. Bull.**, v. 39, p. 115-126, 1996.
- JOHNSON, A. K., CUNNINGHAM, J. T., THUNHORST, R. L. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 23, p. 183-191, 1996.
- JOHNSON, A. K., EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: GANTEN, D., PFAFF, D. (Eds.). **Current Topics in Neuroendocrinology, Behavioral Aspects of Neuroendocrinology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. p. 149-190.
- JOHNSON, A. K. & THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol.**, v. 18, p. 292-353, 1997.
- KERR, D.S., BEVILAQUA, L.R., BONINI, J.S., ROSSATO, J.I., KÖHLER, C.A., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT₂ receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacol.**, v. 179, p. 529-535. 2005
- KOBASHI, M., ICHIKAWA, H., SUGIMOTO, T., ADACHI, A. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus

- to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci. Lett.**, v. 158, p. 47-50, 1993.
- KRUKOFF, T. L., HARRIS, K. H., JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res. Bull.**, v. 30, p. 163-172, 1993.
- LANÇA, A. J. & VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, p. 1117-1126, 1985.
- LEWIS, S. J., ALLEN, A. M., VERBERNE, A. J. M., FIGDOR, R., JARROT, B., MENDELSON, F. A. O. Angiotensin II receptor binding in the rat nucleus solitarius is reduced after unilateral nodose ganglionectomy or vagotomy. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 305-307, 1986.
- LUNDY, R.F., NORGRÉN, R. Pontine gustatory activity is altered by electrical stimulation in the central nucleus of the amygdala. **J. Neurophysiol.**, v. 85, p. 770-783, 2001.
- McCANN, S. M., FRANCI, C., GUTKOWSKA, J., FAVARETTO, A. L., ANTUNES-RODRIGUES, J. Neural control of atrial natriuretic peptide actions on fluid intake and excretion. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 213, p. 117-127, 1996.
- McCANN, S. M., GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 165-181, 2003.
- McKINLEY, M. J., ALLEN, A. M., CLEVERS, J., PAXINOS, G., MENDELSON, F. A. O. Angiotensin receptor binding in the human hypothalamus: autoradiographic localization. **Brain Res.**, v. 420, n. 2, p. 375-379, 1987.
- McKINLEY, M. J. & JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 1-6, 2004.
- MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A., THUNHORST, R. L., JOHNSON, A. K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. R126-R131, 2000.
- MENANI, J. V., COLOMBARI, D. S. A., BELTZ, T. G., THUNHORST, R. L., JOHNSON, A. K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, v. 801, p. 29-35, 1998a.

- MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A., JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. R555-R560, 1998b.
- MENANI, J. V. & JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. R1044-R1049, 1995.
- MENANI, J. V. & JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst e salt appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. R1431-R1437, 1998.
- MENANI JV, COLOMBARI DS, BELTZ TG, THUNHORST RL, JOHNSON AK. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, v. 801, p. 29-35, 1998.
- MENANI, J. V., THUNHORST, R. L., JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. R162-R168, 1996.
- MOREIRA, C. M., MASSON, S., CARVALHO, M. C., BRANDÃO, M. L. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. **Brain Res. Bull.**, v. 71, p. 466–474, 2007.
- NORGREN, R. Gustatory system. In: Paxinos, G. **The rat nervous system**. p. 751-771. Austrália, Academic Press, 1995.
- NORGREN, R. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. In: **Brain mechanisms of sensation**. KATSUKI, Y., NORGRN, R., SATO, M. (Eds.). New York: Wiley, 1981. p. 143-160.
- OHMAN, L. E. & JOHNSON, A. K. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. R504-R509, 1986.
- OHMAN, L. E. & JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. R264-R269, 1989.
- PASTUSKOVAS, C. V. & VIVAS, L. Effect of intravenous captopril on c-fos expression induced by sodium depletion in neurons of the lamina terminalis. **Brain Res. Bull.**, v. 44, p. 233-236, 1997.

- PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5 ed. San Diego, Academic press, 2004.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E., BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- SAKAI, R. R., MA, L., ZHANG, D. M., MCEWEN, B. S., FLUHARTY, S. J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendoc.**, v. 64, p. 425-429, 1996.
- SEELEY, R. J., GALAVERNA, O. G., SCHULKIN, J., EPSTEIN, A. N., GRILL, H. J. Lesion of the central nucleus of the amygdala II: effects on intraoral NaCl intake. **Behav. Brain Res.**, v. 59, p. 19-25, 1993.
- SATO, M. A., SUGAWARA, A. M., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. **Regul. Pept.**, v. 69, p. 137-142, 1997.
- SHAPIRO, R. E. & MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 234, p. 344-364, 1985.
- THUNHORST, R. L. & JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. R458-R465, 1994.
- THUNHORST, R. L., XU, Z., CICHA, M. Z., ZARDETTO-SMITH, A. M., JOHNSON, A. K. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. R1807-R1814, 1998.
- VERBALIS, J. G., BLACKBURN, R. E., HOFFMAN, G. E., STRICKER, E. M. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 395, p. 209-225, 1995.
- VIVAS, L., CHIARAVIGLIO, E., CARRER, H. F. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. **Brain Res.**, v. 519, p. 294-300, 1990.
- VIVAS, L., PASTUSKOVAS, C. V., TONELLI, L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.**, v. 679, p. 34-41, 1995.

- VENDRAMINI, R. C., PEREIRA, D. T., BORELLA, T. L., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Damage to the central amygdala produces differential encephalic c-fos expression in the water deprivation-partial rehydration protocol. **Brain Res.**, v. 1304, p. 80-89, 2009.
- XU, J., WOODWORTH, C. H., JOHNSON, A. K. Glutamate and the role of the lateral parabrachial nucleus in the control of water and salt intake in rats. **Soc. Neurosc. Abstr.**, v. 23, n. 1348, 1997.
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKO, N., SAKAI, N., TANIMIZU, T., WAKISAKA, S. c-Fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. **Neuroreport.**, v. 4, n. 11, p. 1223-1226, 1993.
- 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 Res.**, v. 654, p. 123-134, 1994.