

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

RODRIGO ANDERSON TOMEIO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABAÉRGICOS,
SEROTONINÉRGICOS E ADRENÉRGICOS DO NÚCLEO DO TRATO
SOLITÁRIO NA INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO INDUZIDA POR
DIFERENTES TIPOS DE DESIDRATAÇÃO**

ARARAQUARA

2016

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

RODRIGO ANDERSON TOMEIO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABAÉRGICOS,
SEROTONINÉRGICOS E ADRENÉRGICOS DO NÚCLEO DO TRATO
SOLITÁRIO NA INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO INDUZIDA POR
DIFERENTES TIPOS DE DESIDRATAÇÃO**

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

Orientador: Prof^a Dr^a Patrícia Maria De Paula

ARARAQUARA

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO ANDERSON TOMEIO

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABAÉRGICOS, SEROTONINÉRGICOS E ADRENÉRGICOS DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO NA INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE DESIDRATAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração: Fisiologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 20/12/2016

Orientadora:

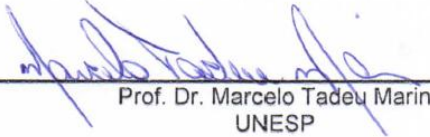


Prof. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

Examinadores:



Prof. Dr. João Carlos Callera
UNESP



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
UNESP



Profa. Dra. Regina Célia Vendramini
UNESP



Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade
UNESP

DADOS CURRICULARES

RODRIGO ANDERSON TOMEIO

NASCIMENTO	21.01.1980 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	Pedro Aparecido Tomeo Sueli Aparecida T Tomeo
2012/2016	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).
2008/2010	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).
1999/2002	Curso de Graduação em Educação Física Universidade Federal de São Carlos- UFSCar

Dedicatória

Á minha família, por acreditarem em mim em todos os momentos.
Aos meus filhos Letícia e Pedro, simplesmente pelo fato de existirem!
A minha esposa Elaine, pela paciência e apoio.

Agradecimentos

Agradeço à DEUS, por me oferecer uma família muito especial que representa o Amor, Amizade, Paz e que me traz muita felicidade e por todas as graças alcançada ao longo da minha vida

Aos meus filhos Letícia e Pedro que me fizeram entender o conceito do Amor verdadeiro e incondicional e que são a razão do meu viver.

À minha esposa Elaine, a você agradeço por estar ao meu lado, me apoiar, incentivar e possibilitar a bênção de ser pai.

Agradeço a minha mãe Sueli e meu pai Pedro por acreditarem em mim e por me fazer acreditar que tudo é possível, com dedicação, amor, humildade, respeito e honestidade.

Agradeço minha irmã Cristiane por ser meu exemplo, o meu “coraçõzinho” que me impulsiona, e me faz querer ser cada dia melhor, como ela sempre acreditou que sou, mas principalmente por me dar meus futuros sobrinhos, Caetano e Maria Júlia.

Agradeço especialmente a Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria De Paula, pela orientação e oportunidade.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Patologia da Unesp de Araraquara, pelo incentivo, conhecimento, contribuição a este trabalho e pela amizade.

Aos amigos do laboratório, pela amizade, respeito e pela ajuda na execução deste trabalho. Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade, Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin, Profa. Dra. Regina Célia Vendramini, Prof. Dr. João Carlos Callera; por aceitarem o convite e pela disponibilidade de leitura da tese.

Ao Serviço Social da Indústria (SESI) e seus gestores por permitir minha participação em congressos, disciplinas e outros eventos científicos, possibilitando a busca pelo conhecimento.

Ao órgão de fomento CNPq por tornar possível a realização deste trabalho, pela concessão da bolsa.

Sumário

1 Introdução.....	20
2 Objetivos.....	31
3 Materiais e Métodos	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guias de aço inoxidável dirigidas para o núcleo do trato solitário (NTS) e para o ventrículo lateral (VL).....	32
3.3 Injeções no NTS e no VL	33
3.4 Fármacos utilizados	34
3.5 Canulação da artéria femoral.....	35
3.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	35
3.7 Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M	35
3.8 Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio.	36
3.9 Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida injeção central de angiotensina II (ANG II).....	37
3.10 Análise histológica	37
3.11 Análise estatística	38
3.12 Protocolos experimentais.....	38
3.12.1 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA _A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	38
3.12.2 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA _A (muscimol) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normovolêmicos.....	39
3.12.3 Efeito da injeção intraperitoneal (ip) do antagonista adrenérgico α_1 (prazosina) combinado com injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA _A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	39
3.12.4 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	41
3.12.5 Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) + agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) no NTS sobre a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	42

3.12.6 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares após desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig).....	43
3.12.7 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação extracelular (furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio).....	43
3.12.8 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por ANG II injetada no VL.....	44
3.12.9 Efeito de injeções bilaterais de agonista adrenérgico α_2 /imidazólico (moxonidina) no NTS sobre a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Análise Histológica	47
4.2 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA _A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	49
4.3 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA _A (muscimol) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normovolêmicos.....	53
4.4 Efeito da injeção intraperitoneal (ip) do antagonista adrenérgico α_1 (prazosina) combinado com injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA _A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	55
4.5 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) no NTS na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	57
4.6 Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) + agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) serotoninérgico no NTS sobre a ingestão de água e induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig).....	60
4.7 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares após desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig).....	63
4.8 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação extracelular (furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio).....	66
4.9 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT _{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT _{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por ANG II injetada no VL.....	69

4.10 Efeito de injeções bilaterais de agonista adrenérgico α_2 /imidazólico (moxonidina) no NTS sobre a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)	72
5 Discussão	74
5.1 Receptores gabaérgicos GABA _A do NTS	74
5.2 Receptores serotoninérgicos 5-HT _{1/2} do NTS	76
5.3 Receptores adrenérgicos α_2 do NTS	79
6 Conclusão	80
7 Referências	82

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática dos sinais aferentes, da integração pelo sistema nervoso central e das respostas efetoras envolvidas com a regulação do volume e osmolaridade dos líquidos corporais.

Figura 2: Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP, área postrema; CC, canal central; Gr, núcleo grácil; Cu, núcleo cuneato; X, núcleo dorsal motor do nervo vago; XII, núcleo do hipoglosso) [Modificado de Ter Horst & Streefland (1994)].

Figura 3: Representação esquemática de possíveis fontes de neurotransmissores serotoninérgicos, gabaérgicos e adrenérgicos para o NTS.

Figura 4: (A) Fotomicrografia de um corte transversal do bulbo de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de injeções bilaterais no núcleo do trato solitário (NTS, setas). A área postrema (AP) e o canal central (CC) foram usados como referência anatômica. A maioria das injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediária e caudal (comissural) do NTS. (B) Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo, de outro rato representativo do grupo, mostrando o sítio de injeção no ventrículo lateral (VL, seta). Comissura anterior (CA).

Figura 5: Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de muscimol (0,25 nmol/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais, * diferente de salina, $p < 0,05$.

Figura 6: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de salina, $p < 0,05$.

Figura 7: Variação de pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em ratos normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,25 e 0,5 nmol/100 nl) ou salina no NTS. Resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de salina, $p < 0,05$.

Figura 8: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5

nmol/100 nl) ou salina no NTS combinado com prazosina (1 mg/kg de peso corporal) ou salina ip. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais, * diferente de salina ip + salina NTS, $p < 0,05$.

Figura 9: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de DOI (2,5 μ g/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de salina, $p < 0,05$.

Figura 10: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 μ g/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais.

Figura 11: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 μ g/100 nl) + DOI (2,5 μ g/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de veículo + salina, $p < 0,05$. # diferente de metisergida + DOI, $p < 0,05$.

Figura 12: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) em ratos com desidratação intracelular que receberam injeções bilaterais de DOI (2,5 μ g/100 nl) ou salina no NTS. Resultados expressos como média \pm EPM, n, número de animais.

Figura 13: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por depleção de sódio (furosemida + 24 h com dieta deficiente em sódio) em ratos que receberam injeção bilateral de DOI (2,5 μ g/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais.

Figura 14: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por depleção de sódio (furosemida + 24 h com dieta deficiente em sódio) em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 μ g/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais.

Figura 15: Ingestão cumulativa de água induzida por injeção icv de ANG II em ratos que receberam injeção bilateral de DOI (2,5 μ g/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de salina, $p < 0,05$.

Figura 16: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por injeção icv de ANG II em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 µg/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais.

Figura 17: Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de moxonidina (0,5 nmol/100 nl, painel A ou 5 nmol/100 nl, painel B) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ingestão cumulativa de água induzida por desidratação intracelular (sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, 2 ml) em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina em áreas adjacentes (fora) ao NTS.

Tabela 2: Ingestão cumulativa de água induzida por desidratação intracelular (sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, 2 ml) em ratos que receberam injeções bilaterais de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina em áreas adjacentes (fora) ao NTS.

Tabela 3: Parâmetros cardiovasculares de ratos antes e após receberem sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (desidratação intracelular).

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANG II – angiotensina II;

ANG I – angiotensina I;

ANOVA – análise de variância;

AP – área postrema;

ANP – peptídeo natriurético atrial;

AVP – vasopressina;

AV3V – área ântero-ventral do terceiro ventrículo;

bpm – batimentos por minutos;

CAP – captopril;

CC – canal cental;

DOI – Hidrocloro de dimetoxi-4-iodoanfetamina;

EPM – erro padrão da média;

FC – frequência cardíaca;

FURO – furosemida;

GABA – Ácido gama-aminobutírico;

icv – intracerebroventricular;

ip – intraperitoneal;

ig – intragástrica;

LEC – líquido extracelular;

LIC – líquido intracelular;

LT – lâmina terminal;

M – molar;

mmHg – milímetros de mercúrio;

MnPO – núcleo pré-óptico mediano;

n – número de ratos;

NaCl – cloreto de sódio;

nl – nanolitro(s);

nmol – nanomol(es);

NPBL – núcleo parabraquial lateral;

NTS – núcleo do trato solitário;

OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal;

PAM – pressão arterial média;

PAP – pressão arterial pulsátil;

pH – potencial hidrogeniônico;

sc – subcutânea;

OSF – órgão subfornical;

SNC – sistema nervoso central;

SRAA – sistema renina-angiotensina-aldosterona;

µg – micrograma(s);

µl – microlitro(s);

µm – micrometro(s);

5-HT – serotonina.

Resumo

Tomeo, RA. Participação dos receptores gabaérgicos, serotoninérgicos e adrenérgicos do núcleo do trato solitário na ingestão de água e sódio induzida por diferentes tipos de desidratação. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2016.

O núcleo do trato solitário (NTS), sítio primário das aferências cardiovasculares e dos osmorreceptores periféricos, recebe importantes sinais inibitórios envolvidos no controle da ingestão de água e sódio. Porém, não se sabe quais os neurotransmissores envolvidos na transmissão dessas informações. Mecanismos gabaérgicos, serotoninérgicos e adrenérgicos centrais estão envolvidos no controle da ingestão de água e sódio e estudos de imunohistoquímica mostraram que estes receptores estão presentes no NTS. Portanto, no presente estudo, investigamos os efeitos de muscimol (agonista de receptores gabaérgicos GABA_A), DOI (agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C}), metisergida (antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2}) e moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos/imidazólicos α_2) injetados no NTS na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (um protocolo de desidratação intracelular), por angiotensina II (ANG II) intracerebroventricular (icv) ou por depleção de sódio (furosemida + 24 h com dieta deficiente em sódio, um protocolo de desidratação extracelular). Ratos Holtzman (290-310 g), n=3-20 (por grupo), tiveram cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NTS e no ventrículo lateral (VL). Injeções bilaterais de muscimol (0,25 e 0,5 nmol/100 nl) e DOI (2,5 μ g/100 nl) no NTS reduziram a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml/rato) sem alterações na ingestão de NaCl 0,3 M. Injeções bilaterais de DOI no NTS reduziram a ingestão de água induzida por ANG II icv. No entanto, injeções bilaterais de DOI no NTS não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por depleção de sódio. Injeções bilaterais de metisergida (2 μ g/100 nl) no NTS não produziram alterações na ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzidas por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, ANG II icv ou depleção de sódio. O pré-tratamento com metisergida bloqueou o efeito de DOI na ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Além disso, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 e 5 nmol/100 nl) no NTS não alteraram a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Os resultados sugerem que os receptores gabaérgicos e serotoninérgicos, mas não os adrenérgicos do NTS fazem parte de um mecanismo envolvido

no controle inibitório da ingestão de água induzida por desidratação intracelular. Nossos resultados também sugerem que receptores serotoninérgicos do NTS participam do controle da ingestão de água induzida por injeção icv de ANG II.

Palavras-chave: Desidratação intracelular, desidratação extracelular, sede, apetite ao sódio, núcleo do trato solitário.

Abstract

Tomeo, RA. Participation of gabaergic, serotonergic and adrenergic receptors of the nucleus of the solitary tract in the water and sodium intake induced by different types of dehydration. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2016

The nucleus of the solitary tract (NTS), the primary site of peripheral osmoreceptor and cardiovascular afferences, is suggested to receive important inhibitory signals involved in the control of water and sodium intake. However, it is not known which neurotransmitters are involved in the transmission of this information. Central gabaergic, serotonergic and adrenergic mechanisms are involved in the control of sodium and water intake and immunohistochemical studies have shown that these receptors are present in the NTS. Therefore, in the present study, we investigated the effects of muscimol (a GABA_A receptor agonist), DOI (a serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptor agonist), methysergide (a serotonergic 5-HT_{1/2} receptor antagonist) and moxonidine (α_2 adrenergic/imidazoline receptor agonist) injected into the NTS on water and 0.3 M NaCl intake induced by intragastric load of 2 M NaCl (a cellular dehydration protocol), by intracerebroventricular (icv) angiotensin II (ANG II) or by sodium depletion (furosemide + 24 h diet deficient in sodium, a extracellular dehydration protocol). Holtzman rats (290-310 g, n=3-20) had stainless steel cannulas implanted bilaterally into the NTS and into the lateral ventricle (LV). Bilateral injection of muscimol (0.25 and 0.5 nmol/100 nl), and DOI (2.5 μ g/100 nl) reduced water intake induced by intragastric load of 2 M NaCl (2 ml/rat) and water intake induced by icv ANG II (50 ng/100nl) without changing 0.3 M NaCl intake. Bilateral injection of DOI reduced water intake induced by icv ANG II. However, DOI produced no changes in the 0.3 M NaCl and water intake induced by sodium depletion. Injections of methysergide (2 μ g/100 nl) produced no changes in the water and 0.3 M NaCl intake induced by intragastric load of 2 M NaCl, icv ANG II or sodium depletion. The pre-treatment with methysergide blocked the effect of DOI on water intake induced by intragastric load of 2 M NaCl. Besides that, bilateral injections of moxonidine (0.5 and 5 nmol/100 nl) produced no changes on water intake induced by intragastric load of 2 M NaCl. The results suggest that gabaergic, serotonergic, but not adrenergic, receptors in the NTS are part of a mechanism involved in the inhibitory control of water intake induced by cellular dehydration. Our results also suggest that serotonergic receptors into the NTS participate in the control of water intake induced by icv injection of ANG II.

Keywords: cellular dehydration, extracellular dehydration, thirst, sodium appetite, nucleus of the solitary tract.

1 Introdução

Diariamente perdemos água e eletrólitos, principalmente o íon sódio, através da respiração, suor e predominantemente pela excreção urinária. A regulação precisa do volume dos compartimentos corporais e da osmolaridade plasmática dentro de uma faixa estreita de variação é fundamental para o controle da pressão arterial e a adequada irrigação tecidual, além da sobrevivência das células (VERBALIS, 2003). Em um adulto jovem a água é responsável por cerca de 60% do peso corporal, podendo variar conforme sexo, idade e quantidade de gordura corporal. Deste total de água corporal, dois terços estão no compartimento intracelular (dentro das células) enquanto um terço está no compartimento extracelular (VERBALIS, 2003).

Os compartimentos intra e extracelulares são separados por uma membrana plasmática (semipermeável) que regula a passagem de íons, mas permite a livre passagem de água por osmose, o que promove uma diferença nas concentrações de íons e também de água. Com relação ao líquido intracelular (LIC), o potássio é um dos seus principais íons, enquanto que o sódio é um dos principais íons do líquido extracelular (LEC). A composição dos íons do LIC e LEC possuem diferentes concentrações, e assim se mantém, principalmente pela ação da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+) que faz com que o sódio (Na^+) presente no interior da célula (LIC) se desloque para o líquido extracelular contra um gradiente de concentração, bem como o influxo de potássio (K^+) do LEC para o interior da célula, realizando este transporte ativo, com consequente gasto energético (VERBALIS, 2003).

Desta forma, o íon sódio Na^+ representa um importante constituinte do compartimento extracelular e o maior determinante da osmolaridade e do volume do LEC por criar um gradiente osmótico que permite o movimento de água entre os compartimentos intra e extracelular. Assim, o conteúdo total de sódio e dos ânions (Cl^- e HCO_3^-) que o acompanham determinam, no nosso organismo, a osmolaridade plasmática e o volume do líquido extracelular (VERBALIS, 2003). Alterações da osmolaridade em cerca de 2% ou uma redução da volemia (hipovolemia) em torno de 10% já são suficientes para promover a sede (FITZSIMONS, 1998).

Alterações na osmolaridade e volume dos líquidos corporais podem ser determinadas pelo desequilíbrio entre a ingestão de água e sódio (consumo de líquidos ou alimentos) e de suas perdas, através do suor, respiração, salivação e principalmente pelo aumento ou diminuição da excreção renal (JOHNSON e THUNHORST, 1997). O mecanismo regulatório destas alterações depende de uma ação integrada dos rins e dos centros da sede e secretores de

hormônios, como o hipotálamo, que secreta o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina (AVP) como também é conhecido pela sua característica vasoconstritora.

A excreção de sódio é decorrente de uma ação dos rins, influenciada pelo sistema nervoso simpático e hormônios. Assim, os sinais hormonais e neurais modulam a excreção renal de sódio para que não haja o acúmulo ou a falta deste íon no organismo. Os rins exercem um papel importante na regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos corporais graças a sua capacidade de variar a excreção de água e solutos durante o processo de formação de urina, podendo excretar uma urina hipo ou hiperosmótica, de acordo com as necessidades do indivíduo ou animal (STANTON e KOEPPEN, 2009).

A única forma de repor água e sódio que foram excretados é através do comportamento ingestivo, e esta ingestão contínua é fundamental para a regulação do equilíbrio hidroeletrólítico. A ingestão de água ocorre pelo estímulo da sede, que é uma sensação que motiva a procura, a obtenção e o consumo de água. O apetite ao sódio envolve um comportamento, inato e específico, de ingestão de minerais contendo sódio. Esse comportamento é bem desenvolvido em animais que vivem em ambiente pobre em sódio, ou cuja dieta tem baixo teor desse íon (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2008).

Para que esta regulação aconteça com eficiência, é necessário que ocorra detecção precisa destas alterações (variações de pressão arterial, volume e/ou da osmolaridade plasmática), integração adequada desses sinais no sistema nervoso central (SNC) e ativação coordenada dos comandos neurais e endócrinos aos órgãos efetores, gerando as respostas neuroendócrinas e comportamentais necessárias (figura 1).

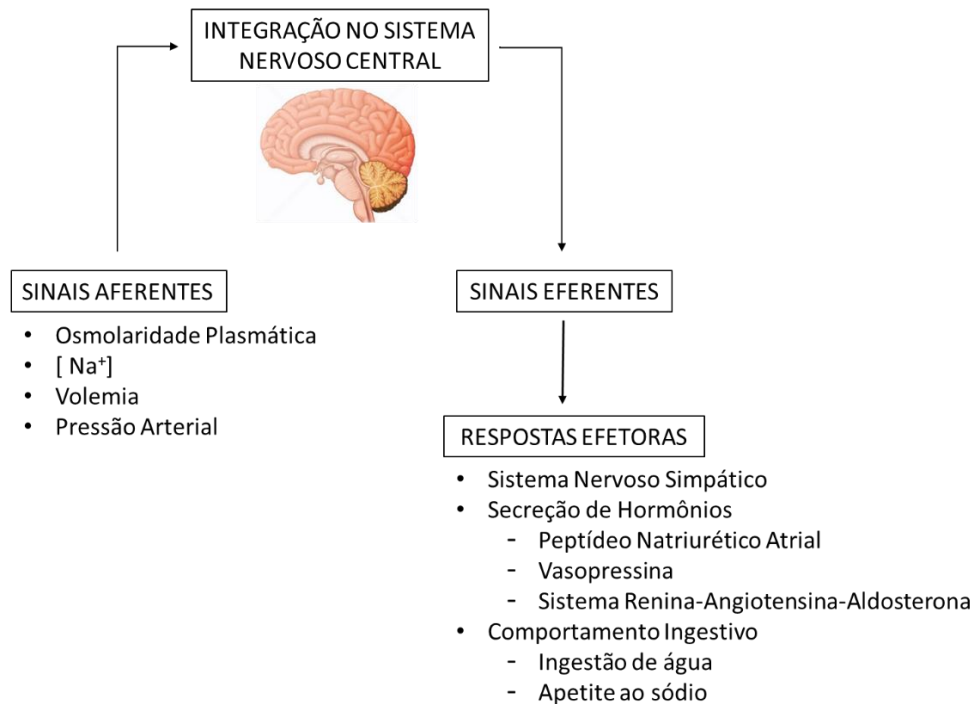


Figura 1. Representação esquemática dos sinais aferentes, da integração pelo sistema nervoso central e das respostas eferentes envolvidas com a regulação do volume e osmolaridade dos líquidos corporais.

O organismo dispõe de mecanismos comportamentais, humorais e neurais para promover ajustes na ingestão e excreção de água e sódio permitindo assim restabelecer a sua homeostase (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2008). Em alguns casos, quando estes ajustes não são realizados adequadamente, o indivíduo pode apresentar algum tipo de desidratação.

A diminuição da água ou do volume corporal pode ocorrer no compartimento intracelular (desidratação intracelular), no compartimento extracelular (desidratação extracelular) ou em ambos (desidratação absoluta ou mista). Mecanismos específicos, para restabelecer a água ou volume, são ativados quando ocorre a desidratação seletiva de um ou de outro compartimento (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2008).

A perda de água dos compartimentos intra e extracelular simultaneamente caracteriza a desidratação absoluta. Este tipo de desidratação pode ser induzida experimentalmente pela privação hídrica por 24 h ou por 36 h (VENDRAMINI et al., 2009, DE LUCA et al., 2010). A desidratação absoluta ativa um potente estímulo de sede, entretanto, somente a ingestão de água não é suficiente para o reestabelecimento do equilíbrio eletrolítico, pois o animal se mantém hipovolêmico e com o balanço de sódio negativo, assim, o apetite ao sódio também está presente neste tipo de desidratação.

A redução do volume do líquido extracelular e do íon sódio, que caracterizam um estado de hipovolemia e natriurese, causados por diarreia, vômito ou o uso de diuréticos (furosemida), podem levar à desidratação extracelular. Nesta condição, porém, não ocorrem alterações na osmolaridade, uma vez que quantidades de água e soluto, neste caso o íon sódio, são excretados em quantidades equivalentes (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2008). Um protocolo experimental utilizado para induzir desidratação extracelular emprega diuréticos como a furosemida que age na alça de Henle inibindo o cotransportador de íons $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ combinado a período de 24 horas com dieta deficiente em sódio (fubá, 0,001% sódio e 0,33% de potássio) e água a vontade (SAKAI et al., 1987).

Estudo de Jalowiec (1974) mostrou que nas primeiras oito horas após a injeção subcutânea (s.c.) de furosemida o animal já apresenta desidratação extracelular devido a um grande pico de excreção urinária, promovendo uma redução de volume, ativando assim mecanismos compensatórios como o aumento de ANG II circulante que leva ao comportamento de sede, mas não do apetite ao sódio. O comportamento de apetite ao sódio aparece no modelo de desidratação extracelular que utiliza a injeção s.c. de furosemida seguida de 24 h com dieta deficiente em sódio e é um modelo muito utilizado em nosso laboratório para estudo deste comportamento (SATO et al., 1996, MENANI et al., 1998b, NOZAKI et al., 2002, DE OLIVEIRA et al., 2003, DE OLIVEIRA et al., 2007, MENEZES et al., 2011). Sabe-se que 24 h após este tratamento, o animal apresenta níveis elevados tanto de ANG II quanto de aldosterona, o que leva ao apetite ao sódio (SPEILMAN e DAVIS, 1974, HABER, 1976;).

Na desidratação extracelular ocorre o decréscimo de 5 a 10% da volemia, e esta hipovolemia ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que auxilia no aumento da reabsorção renal de água e sódio e da pressão arterial, e induzem a sede e o apetite ao sódio (SPEILMAN e DAVIS, 1974, HABER, 1976). O SRAA é um sistema hormonal ativado em situações de deficiência de água e sódio no organismo. 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 principalmente nos endotélios da circulação pulmonar, e produz um octapeptídeo ativo, identificado como angiotensina II (ANG II). Sabemos que a fonte de renina é o aparelho justaglomerular renal, e que as células da mácula densa também participam do controle da secreção da renina. A 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 adrenérgicos do subtipo β_1 , são fatores que estimulam a secreção de renina (FITZSIMONS, 1998).

A ação da ANG II periférica, inclui o aumento da reabsorção renal de sódio, vasoconstrição sistêmica e renal, além de agir nas células da zona glomerulosa das supra-renais estimulando a secreção de aldosterona. A aldosterona é um mineralocorticoide que atua nos ductos coletores renais e cólon para regular a reabsorção de sódio e secreção de potássio (BOOTH et al., 2002). Atuando no SNC, em áreas como no núcleo central da amígdala, a aldosterona induz aumento do apetite ao sódio (GALAVERNA et al., 1992, SAKAI et al., 1996, JOHNSON e THUNHORST, 1997). A ANG II central pode agir em seus receptores AT_1 presentes nos órgãos cincunventriculares prosencefálicos, tais como órgão subforminal (OSF) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVL), presentes na lâmina terminal (LT) na parede ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V). Estas áreas tem projeções para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), que integra as informações provenientes destas áreas e distribui estes sinais para outras áreas envolvidas no equilíbrio hidroeletrolítico que modularão os comportamentos de sede e apetite ao sódio (JOHNSON et al., 1996).

A perda de água corporal pode ocorrer no compartimento intracelular, causando a desidratação intracelular. Neste caso, um aumento na pressão osmótica efetiva do LEC resultante de uma maior concentração de solutos osmoticamente ativos, principalmente o sódio, promove uma redução do volume do líquido intracelular (LIC) devido ao deslocamento da água do meio de menor concentração (LIC) para o de maior (LEC), causando então, a desidratação intracelular. Experimentalmente, este tipo de desidratação é induzida sob dieta com alto teor de sódio, através da infusão de soluções hipertônicas ou por sobrecarga intragástrica (ig) de soluções hipertônicas de sódio, como o NaCl 2 M (PEREIRA et al., 2002).

A sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (12%, gavagem), produz a desidratação intracelular por promover elevação de 4% da concentração plasmática de sódio e da osmolaridade, reduz a atividade da renina plasmática, sem alterações no hematócrito, proteínas plasmáticas totais ou peptídeo natriurético atrial (ANP). Adicionalmente este protocolo induz sede, natriurese e aumenta AVP e ocitocina plasmáticas (PEREIRA et al., 2002, ANDRADE et al., 2012, BLANCH et al., 2013).

Os comportamentos de busca e ingestão de água e sódio (este geralmente na forma de NaCl) é controlado por alterações na volemia ou osmolaridade plasmática (JOHNSON, 2007). Essas alterações são monitoradas por receptores, sensoriais ou de membrana, localizados em diferentes partes do corpo, os barorreceptores e os osmorreceptores.

Alterações de pressão e volume sanguíneos são detectadas por barorreceptores (mecanorreceptores) localizados no arco aórtico e seio carotídeo e nas paredes de grandes veias e dos átrios (receptores de volume) (JOHNSON e THUNHORST, 1997). Os sinais oriundos dos barorreceptores trafegam em direção ao SNC através do IX e X pares de nervos cranianos (nervos glossofaríngeo e vago, respectivamente), o que desencadeará uma menor ativação, essencialmente, da área postrema (AP) e núcleo do trato solitário (NTS), localizados no tronco encefálico (JOHNSON, 2007). A hipovolemia causa um menor estiramento dos barorreceptores, que leva a uma menor inibição do tronco encefálico sobre circuitos da sede e apetite ao sódio (JOHNSON e THUNHORST, 1997, MENANI et al., 2014) além de produzir a liberação reflexa de AVP e ativar o sistema nervoso simpático agindo nas células do aparelho justaglomerular dos rins, aumentando a produção de renina (JOHNSON, 2007). Além de barorreceptores, receptores para hormônios tais como ANG II e aldosterona, informam o encéfalo sobre redução na volemia a partir da ativação de algumas regiões encefálicas específicas e também pode gerar sede e apetite ao sódio.

Os osmorreceptores podem ser periféricos ou centrais e respondem às alterações da osmolaridade e da concentração plasmática de sódio. Os osmorreceptores periféricos estão presentes no trato gastrointestinal, aparentemente na veia porta e na circulação hepática. Estas células especializadas convertem a concentração de sódio em atividade nervosa hepática aferente, cujos sinais são enviados ao SNC pelo X par de nervos cranianos, o nervo vago (HABERICH, 1968). Já os osmorreceptores centrais estão situados nos órgãos circumventriculares, tais como OSF, OVLT e MnPO (BOURQUE e OLIET, 1997). O aumento da osmolaridade plasmática ativa os osmorreceptores, tanto centrais quanto periféricos e estes irão promover a resposta comportamental de sede (KRALY et al., 1995, STRICKER et al., 2002). Em comum, todos estas aferências, provenientes da periferia, convergem seus sinais para o NTS, onde fazem sua primeira sinapse no SNC (COTTLE, 1964, PALKOVITS e ZABORSZKY, 1977, ADACHI, 1984).

O NTS, localizado na porção dorsal do bulbo, é a primeira estação sináptica no SNC que recebe as informações das aferências cardiovasculares sobre pressão arterial e volume (PALKOVITS e ZABORSZKY, 1977). O NTS pode ser dividido em três porções: NTS rostral, NTS intermediário e NTS comissural ou caudal (figura 2). Várias evidências apontam uma importante participação dos subnúcleos intermediário e comissural do NTS na regulação cardiovascular e do equilíbrio hidrosalino (OHMAN e JOHNSON, 1989, SCHREIHOFFER et al., 2000, COLOMBARI et al., 2001, MACHADO, 2001, GUYENET, 2006).

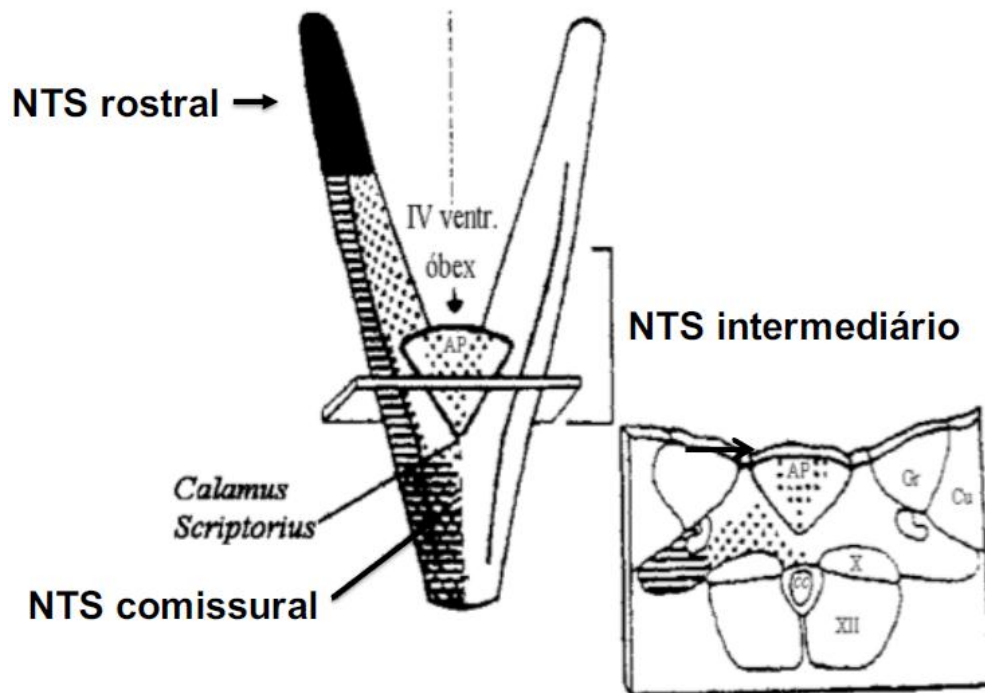


Figura 2. Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP, área postrema; CC, canal central; Gr, núcleo grácil; Cu, núcleo cuneato; X, núcleo dorsal motor do nervo vago; XII, núcleo do hipoglosso) [Modificado de Ter Horst & Streefland (1994)].

O NTS recebe projeções da área postrema (VAN DER KOOY e KODA, 1983), bem como envia projeções para várias áreas rostrais do encéfalo que estão envolvidas com o controle hidroeletrolítico, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V). O NTS também envia projeções para áreas do tronco encefálico (ponte) como o núcleo parabraquial lateral (NPBL), importante área envolvida no controle da ingestão de água e sódio (RICARDO e KOH, 1978, SAPER et al., 1983, HERBERT et al., 1990). Portanto, o NTS é considerado uma importante área de conexão entre as aferências periféricas e áreas encefálicas envolvidas com o equilíbrio hidroeletrolítico e regulação cardiorrespiratória.

O NTS é conhecido como uma área de controle inibitório de comportamentos ingestivos (OHMAN e JOHNSON, 1989, SCHREIHOFER et al., 2000, BLANCH et al., 2007, OGIHARA et al., 2009, BLANCH et al., 2013, FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2015). A lesão eletrolítica do NTS aumenta a ingestão de água induzida por angiotensina II e este efeito é atribuído à perda de sinais inibitórios produzidos pelos barorreceptores no NTS (SCHREIHOFER et al., 2000). Ohman e Johnson (1989) também mostraram um aumento da ingestão de água induzida por ANG II central (icv) e periférica (sc) após lesão eletrolítica do

NTS. Este tipo de lesão do NTS também aumenta a ingestão de água induzida por isoproterenol (BLANCH et al., 2007), um estímulo que aumenta a ANG II periférica, e a ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M (BLANCH et al., 2013). Adicionalmente, lesões mais específicas do NTS, como lesões do grupamento noradrenérgico (A2) do NTS comissural também aumentam a ingestão água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M (FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2015). Além da ingestão de água, a lesão eletrolítica no NTS comissural também aumenta a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (OGIHARA et al., 2009).

Estes resultados sugerem que o NTS é parte de um mecanismo inibitório no controle da ingestão de água e sódio induzidos por diferentes protocolos de desidratação, entre eles a sobrecarga ig de NaCl 2 M (desidratação intracelular), a depleção de sódio (furosemida + 24 h com dieta deficiente em sódio, desidratação extracelular) e a injeção icv de ANG II (mimetiza a desidratação extracelular). No entanto, este tipo de lesão destrói corpos celulares de neurônio, mas também elimina fibras de passagem que poderiam nos proporcionar interpretações equivocadas, portanto, se faz necessário o estudo do bloqueio farmacológico temporário do NTS, com o objetivo de investigar se alguns destes efeitos relacionados a lesão deste núcleo, como alterações na ingestão de água e sódio induzidas por diferentes protocolos de desidratação serão reproduzidos. Este tipo de investigação pode ser conduzida através de injeção de agonistas de receptores gabaérgicos, como o muscimol no NTS.

O NTS apresenta uma alta densidade de terminais nervosos contendo o ácido γ -aminobutírico (GABA), além de receptores gabaérgicos do tipo GABA_A e GABA_B (MEELEY et al., 1985, BOWERY et al., 1987, PICKEL et al., 1989). Estudos mostram que a neurotransmissão dos reflexos cardiovasculares no NTS é influenciado por diferentes neurotransmissores ou neuromoduladores, dentre eles o GABA (CATELLI et al., 1987, CALLERA et al., 1999, 2000, CALLERA et al., 2005a). Porém, não sabemos se estes receptores no NTS estão envolvidos no controle da ingestão de água e sódio. Estudo de nosso laboratório demonstrou a participação de receptores gabaérgicos do NPBL no controle hidroeletrólítico (CALLERA et al., 2005b). Neste estudo, injeções bilaterais de agonista GABA_A, muscimol, no NPBL induziu intensa ingestão de NaCl hipertônico (0,3 M) acompanhada de um aumento na ingestão de água, sem alterar a ingestão de alimento, em ratos normohidratados e normovolêmicos (CALLERA et al., 2005b).

Além do GABA outro importante neurotransmissor presente em várias áreas do tronco encefálico, incluindo o NTS e o NPBL, é a serotonina (5-HT) (STEINBUSCH, 1981, LANCA e VAN DER KOOY, 1985). Vários estudos da literatura evidenciam a participação

dos vários subtipos dos receptores serotoninérgicos do NPBL na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico (MENANI e JOHNSON, 1995, COLOMBARI et al., 1996, MENANI et al., 1996, MENANI et al., 1998a, MENANI et al., 1998b, DE GOBBI et al., 2000, DE LUCA et al., 2003, DAVID et al., 2015). Estudos mostraram que a injeção bilateral do antagonista de receptor serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NPBL aumentou a ingestão de água e de NaCl hipertônico induzidas por 24 horas de privação hídrica ou depleção de sódio (furosemida + 24 h com dieta deficiente em sódio) (MENANI et al., 1998a, MENANI et al., 1998b). Outros estudos mostraram que metisergida injetada no NPBL aumenta a ingestão de NaCl induzida pela ANG II administrada tanto icv quanto no OSF (COLOMBARI et al., 1996, MENANI et al., 1996). Em adição, metisergida injetada bilateralmente no NPBL também aumentou a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento combinando do diurético furosemida e o bloqueador da enzima conversora de angiotensina captopril (FURO/CAP), ambos injetados subcutaneamente (MENANI et al., 1996). Por outro lado, a injeção de DOI (agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) no NPBL reduziu a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento FURO/CAP (MENANI et al., 1996).

Desta forma, o conjunto destes resultados sugere que a serotonina no NPBL tem um importante papel inibitório na ingestão de água e sódio. Confirmando estes achados, De Gobbi e colaboradores (DE GOBBI et al., 2000), mostraram que estes mecanismos inibitórios serotoninérgicos do NPBL também 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. Além disso, estudo de De Luca e colaboradores (2003) demonstrou que o bloqueio serotoninérgico no NPBL combinado com o aumento da osmolaridade plasmática produzido por sobrecarga ig de NaCl induz um aumento paradoxal da ingestão de NaCl hipertônico além da ingestão normal de água. Porém, ainda não sabemos se estes receptores serotoninérgicos do NTS também estão envolvidos com o controle da ingestão de água e sódio.

Além do GABA e serotonina, outro importante neurotransmissor muito presente em todo SNC, incluindo NTS e NPBL, é a noradrenalina, agindo nos chamados receptores adrenérgicos. A literatura tem sugerido a participação destes receptores em mecanismos da sede e ingestão de sódio induzidos por diferentes tratamentos (MENANI et al., 1999, ANDRADE et al., 2003, DE OLIVEIRA et al., 2003). Injeções do agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, moxonidina, no VL e área septal medial, promovem inibição da ingestão de água e sódio hipertônico (MENANI et al., 1999; ANDRADE et al., 2003; DE

OLIVEIRA et al., 2003). Menani e colaboradores (1999) mostraram que o antagonismo de receptores adrenérgicos α_2 com injeções icv de RX 821002 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) aboliu os efeitos inibitórios da moxonidina sobre a ingestão de água induzida por ANG II. Além disso, injeções de RX 821002 e ioimbina, outro antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , bloquearam o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (DE OLIVEIRA et al., 2003). Esses resultados sugerem que os receptores adrenérgicos α_2 presentes em áreas prosencefálicas possuem efeitos inibitórios sobre a ingestão de água e sódio. Por outro lado, estudos de Andrade e colaboradores (2004), mostraram que a injeção bilateral de moxonidina no NPBL promoveu um grande aumento da ingestão de sódio induzida por FURO/CAP. Esses resultados são contrários aos efeitos inibitórios descritos em áreas do prosencéfalo, ou seja, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos em áreas prosencefálicas inibe a ingestão de água e NaCl hipertônico (MENANI et al., 1999; ANDRADE et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2003) e a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos no NPBL potencia a ingestão de NaCl hipertônico (ANDRADE et al., 2004). Isso indica papéis opostos para receptores adrenérgicos α_2 na regulação da ingestão de sódio e água de acordo com sua distribuição no encéfalo. Estudos de imunohistoquímica detectaram uma grande expressão de receptores adrenérgicos no NTS (LORENZ et al., 1990, BHUIYAN et al., 2009). No entanto, também não sabemos o envolvimento dos receptores adrenérgicos do NTS no controle da ingestão de água e sódio.

Estudos da literatura evidenciam que a principal fonte de serotonina para o NTS são os núcleos da rafe (THOR e HELKE, 1987; SCHAFFAR et al., 1988), as aferências dos barorreceptores (HOSFORD et al., 2015) e o gânglio nodoso (GAUDIN-CHAZAL et al., 1982; NOSJEAN et al., 1990; THOR et al., 1988). Além disso, o NTS recebe aferências gabaérgicas do núcleo central da amígdala (MALEY, 1996; SAHA, 2000; BATTEN et al., 2002), além de possuir interneurônios que armazenam e liberam GABA (LASITER et al., 1988; HALSELL et al., 1996). Vale destacar também que o NTS é um núcleo catecolaminérgico, possuindo grupamentos neuronais adrenérgicos (C2) e noradrenérgicos (A2) (Kvetnansky et al., 2009). Adicionalmente, o núcleo central da amígdala também é uma fonte de noradrenalina para o NTS, ativando o grupamento noradrenérgico C2 (PICKEL et al., 1995) do NTS. A figura 3 apresenta uma representação esquemática de possíveis fontes de neurotransmissores serotoninérgicos, gabaérgicos e adrenérgicos para o NTS.

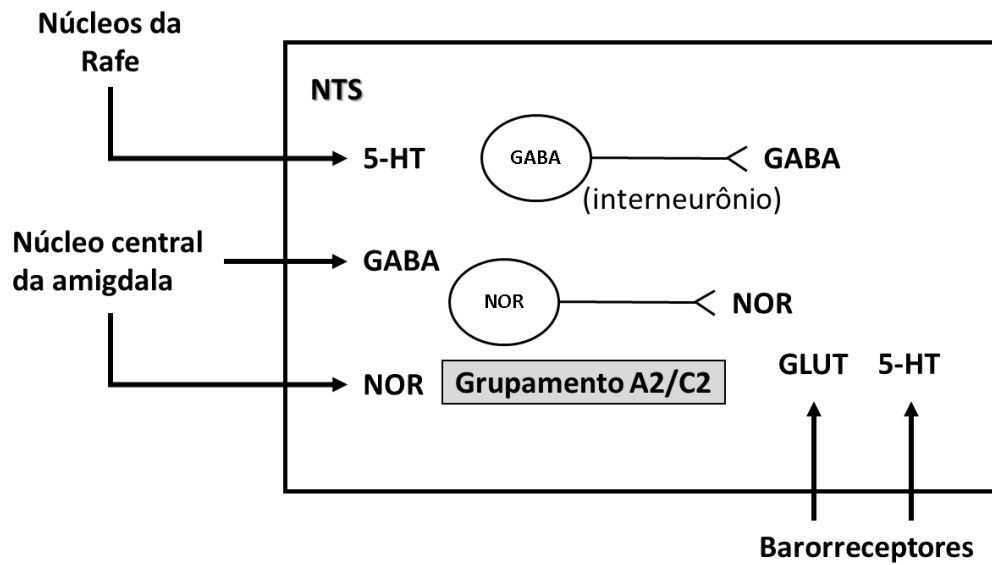


Figura 3. Representação esquemática de possíveis fontes de neurotransmissores serotoninérgicos, gabaérgicos e adrenérgicos para o NTS, núcleo do trato solitário; 5-HT, serotonina; NOR, noradrenalina; GABA, ácido gama-aminobutírico, GLUT, L-glutamato; Grupamento A2/C2, grupamento de neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos respectivamente.

De acordo com o conjunto de dados acima, é provável que o NTS participe de um mecanismo inibitório no controle da ingestão de água e sódio. Assim, é interessante investigar a participação dos receptores gabaérgicos, serotoninérgicos e adrenérgicos do NTS nos mecanismos inibitórios que controlam o equilíbrio hidroeletrólítico durante diferentes modelos de desidratação.

2 Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram investigar a participação de receptores:

- a) Gabaérgicos $GABA_A$ do NTS na ingestão de água e sódio induzida por desidratação intracelular;
- b) Serotoninérgicos $5-HT_{1/2}$ e $5-HT_{2A/2C}$ do NTS na ingestão de água e sódio induzida por desidratação intra e extracelular e injeção icv de ANG II;
- c) adrenérgicos α_2 /imidazólicos do NTS na ingestão de água induzida por desidratação intracelular.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 290-310 g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração Guabi (Paulínia, SP), água e sódio hipertônico (NaCl 0,3 M quando necessário) e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de 12 h no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal - CEUA (Proc. CEUA nº 14/2013) da FOAr – UNESP.

3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guias de aço inoxidável dirigidas para o núcleo do trato solitário (NTS) e para o ventrículo lateral (VL).

Para o implante de cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados com quetamina (Cristália, Itapira, SP, Brasil, 80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil, 7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900, David-Kopf, Tujunga, CA, EUA). A seguir foi injetado subcutaneamente o anestésico local lidocaína com vasoconstrictor na região do escalpo a ser aberta, reduzindo assim o sangramento. Após a anti-sepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente irrigada com solução fisiológica e água oxigenada. A torre do estereotáxico foi colocada na posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal foi ajustada até que os pontos bregma e lambda da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e então foram feitas as leituras das coordenadas ântero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV) a partir do bregma. O ponto de introdução da cânula guia foi determinado utilizando-se as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (1998) em relação ao bregma.

As coordenadas utilizadas para o implante das cânulas-guias de aço inoxidável 23-gauge (15 mm) em direção ao NTS foram: AP = 14,5 mm caudal ao bregma; L = $\pm 0,5$ mm à linha média e DV = 7,5 mm abaixo do osso (PAXINOS e WATSON, 1998). Neste ponto foi

feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas de aço inoxidável (23-gauge) de 15 mm de comprimento, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 15 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos.

Em outro grupo de animais, uma terceira cânula-guia de aço inoxidável 23-gauge (10 mm) foi introduzida em direção ao ventrículo lateral (VL, para injeção de ANG II) usando as seguintes coordenadas: AP = 0,3 mm caudal ao bregma; L = \pm 1,6 mm à linha média e DV = 3,6 mm abaixo do osso, de acordo com Paxinos e Watson (1998). No intuito de evitar obstrução da cânula-guia foi introduzido na mesma um mandril (oclusor de 10 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro da cânula até a realização dos experimentos.

As cânulas-guias, direcionadas ao NTS e VL, foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica e de pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente colocados na calota craniana. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia cerebral, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de pentabiótico veterinário – pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1% - 0,1 ml/rato, Mundo Animal, São Paulo, SP). Os animais ficaram em observação e recuperação durante 6 dias e neste período eram manipulados diariamente pelo experimentador.

3.3 Injeções no NTS e no VL

Os fármacos utilizados foram manualmente injetados no NTS em um volume de 0,1 μ l (100 nl) em cada sítio desta região, utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ l, Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no NTS pela cânula guia previamente fixada nesta região. A cânula injetora foi 1,2 mm mais longa do que as cânulas-guias a fim de que as injeções atingissem diretamente o NTS. As injeções foram bilaterais e realizadas de modo sequenciado, ou seja, injeção de um lado do NTS seguida da injeção do lado contralateral.

O grupo de animais com cânulas direcionadas ao VL, recebeu ANG II em um volume de 1 µl, utilizando-se da seringa Hamilton conectada a um tubo de polietileno PE-10 e este a uma agulha injetora, que neste caso, foi 2 mm mais longa do que a cânula-guia previamente fixada no crânio em direção ao VL.

3.4 Fármacos utilizados

Brometo de muscimol, agonista de receptores gabaérgicos GABA_A, (Research Biochemicals Internationals-RBI, Natick, MA, USA) foi dissolvido em salina isotônica e administrado no NTS nas doses de 0,25 e 0,5 nmol/100 nl.

Cloridrato de moxonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em veículo prolipenoglicol + H₂O (2:1) e administrado no NTS na dose de 0,5 e 5 nmol/100 nl.

Hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI), agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C}, (Research Biomedical International-RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvido em salina isotônica e administrado no NTS na dose de 2,5 µg/100 nl.

Maleato de metisergida, antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2}, (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), foi dissolvida em prolipenoglicol + H₂O (2:1) e administrado no NTS na dose de 2 µg/100 nl.

Angiotensina II (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) foi dissolvida em salina isotônica e administrada no VL na dose de 50 ng/1 µl.

Hidrocloreto de prazosina, antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α_1 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em salina isotônica e administrado intraperitonealmente na dose de 1 mg/kg de peso corporal.

Furosemida (FURO), diurético natriurético (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) foi dissolvida em salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (NaOH) (20 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea 1 ml/rato, como descrito na literatura (YADA et al., 1997a, YADA et al., 1997b).

As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores da literatura (MENANI e JOHNSON, 1995, MENANI et al., 1996, MENANI et al., 1998a, MENANI et al., 1998b, MENANI et al., 2002, CALLERA et al., 2005b, ANDRADE-FRANZE et al., 2010a, ANDRADE-FRANZE et al., 2010b, GASPARINI et al., 2013)

3.5 Canulação da artéria femoral

Um dia antes dos experimentos os animais foram anestesiados com quetamina (Cristália, Itapira, SP, Brasil, 80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil, 7 mg/kg de peso corporal) e então foi realizada a canulação da artéria femoral.

Este procedimento consiste em introduzir uma cânula, confeccionada previamente com um tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ) de 3,5 cm, soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de 15 cm, na aorta abdominal, através da artéria femoral. Uma vez implantadas, as cânulas são dirigidas subcutaneamente, com auxílio de um trocáter, para a região escapular do rato, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura.

Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pino de metal. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial pulsátil (PAP) e cálculo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

3.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

Os registros da PAP, PAM e FC foram realizados em ratos não anestesiados e com livre movimentação no dia seguinte ao da canulação da artéria femoral. A cânula arterial, previamente heparinizada (250 UI/ml), foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db, Dover, NH, EUA) acoplado a um sistema computadorizado de registro (modelo Powerlab 16/30SP, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). Esses registros foram realizados para avaliar os efeitos hemodinâmicos dos agonistas e antagonistas utilizados.

3.7 Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M

Neste protocolo experimental avaliamos a medida de ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M (12%), 2 ml/rato, em animais com implantes bilaterais de cânulas em direção ao NTS.

Antes do início dos experimentos os animais foram adaptados (treinados) a sobrecarga ig sendo submetidos a este procedimento com NaCl 0,15 M (salina isotônica 0,9%) uma vez por dia durante 3 dias. Esta técnica consiste em segurar o animal cuidadosamente e introduzir

um polietileno (PE-200) adaptado a uma seringa de 5 ml até o estômago do animal e então administrar 1 ml de NaCl 0,15 M, esta técnica é conhecida também como gavagem.

Após o período de treinamento, no momento do experimento, água, ração e NaCl 0,3 M foram removidos das gaiolas e os animais receberam a gavagem de NaCl 2 M (2 ml/rato). Depois de 45 ou 60 min os animais receberam injeções bilaterais dos fármacos ou veículos no NTS e então, água e NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais uma hora após a gavagem.

A sobrecarga ig de NaCl 2 M (12%) produz uma elevação de 4% na osmolaridade e sódio plasmático, induzindo uma desidratação intracelular ou hiperosmótica e assim ingestão de água. Neste modelo não ocorre desidratação extracelular indicado pela redução da atividade da renina plasmática e pela não alteração no volume plasmático (PEREIRA et al., 2002). Este protocolo de desidratação intracelular é específico para induzir ingestão de água, no entanto, alguns tratamentos [tais como injeções de metisergida (DE LUCA et al., 2003) e moxonidina (ANDRADE et al., 2004) no NPBL] também induzem ingestão de sódio hipertônico, portanto, neste protocolo foram oferecidas buretas contendo água e NaCl 0,3 M aos animais avaliados.

Em todos os experimentos de comportamento ingestivo, para o registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M, foram utilizados tubos (buretas) de vidro graduados (divisão de 0,1 ml). A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi medida durante 2 h aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Durante o período de medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M, os ratos não tiveram acesso à ração e ao término do experimento, água, NaCl 0,3 M e ração foram disponibilizados aos animais. Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

Cada animal foi submetido a 2 ou 4 experimentos, de acordo com o objetivo do protocolo proposto. Em cada experimento, o grupo de ratos foi dividido em 2 subgrupos e cada subgrupo recebeu um dos tratamentos. A sequência dos tratamentos, nos grupos de animais submetidos a 2 ou 4 experimentos, foi aleatória e ao final dos experimentos todos os animais receberam todos os tratamentos.

3.8 Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio.

Neste protocolo experimental avaliamos a medida de ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS submetidos à depleção de sódio obtida pelo tratamento com o diurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal) subcutaneamente (sc), seguido de manutenção dos ratos por 24 h com dieta deficiente em

sódio (fubá, 0,001% sódio e 0,33% de potássio) e água *ad libitum* antes de se iniciarem as medidas de ingestão de água e de NaCl 0,3 M.

O tratamento com furosemida (depleção de sódio) induz uma perda de sódio de 1,5 a 2,0 mEq e induz ingestão de sódio hipertônico (JALOWIEC, 1974, SAKAI et al., 1989, ROWLAND e FREGLY, 1992).

3.9 Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida injeção central de angiotensina II (ANG II).

Neste protocolo experimental avaliamos a medida de ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por ANG II icv, em animais com implantes bilaterais de cânulas em direção ao NTS, além de uma terceira cânula direcionada ao ventrículo lateral (VL).

No dia do experimento, água, ração e NaCl 0,3 M foram removidos das gaiolas e os animais receberam injeções bilaterais dos fármacos (DOI e metisergida) ou veículos no NTS. 15 min depois, os animais receberam injeção de ANG II (50 ng/100 nl) no VL e imediatamente após este procedimento, os ratos tiveram acesso à água e NaCl 0,3 M.

A injeção central de ANG II é estímulo associado à hipovolemia e promove ingestão de água em virtude da ação deste peptídeo em seus receptores AT1 em áreas circunventriculares como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), órgão subfornical (OSF), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e núcleo pre-óptico mediano (MnPO).

3.10 Análise histológica

Ao final dos experimentos foi injetado 100 nl de solução de azul de Evans 2% bilateralmente no NTS ou 1 µl deste marcador no VL para confirmação do local das injeções. Os ratos foram profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução de formalina 10% (20 ml). Em seguida, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por 2-4 dias. Cortes transversais (60 ou 50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção do NTS e VL com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização do sítio de injeção no NTS e VL foi feita em microscópio óptico. Somente os ratos nos quais o local da injeção estava situado corretamente no NTS e VL foram utilizados para a análise estatística dos dados.

3.11 Análise estatística

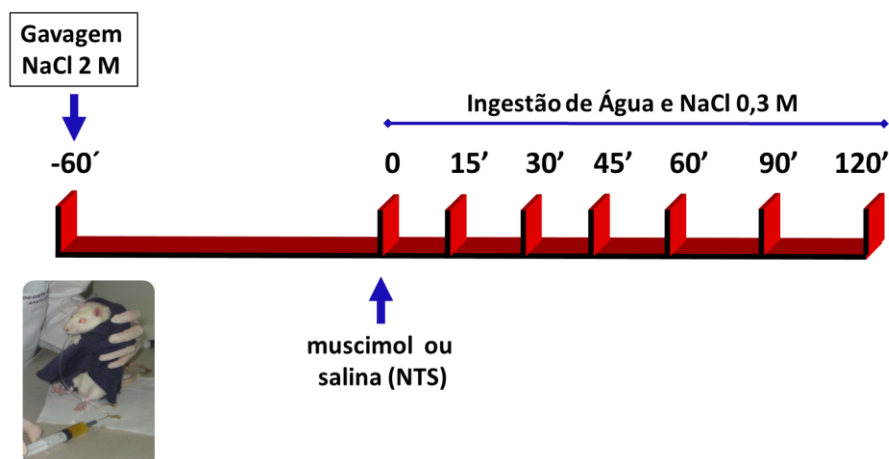
Os dados obtidos estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Test *t* de Student e análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguidas do pós-teste de Student-Newman-Keuls foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos e grupos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

3.12 Protocolos experimentais

3.12.1 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA_A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Neste protocolo avaliamos a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS que foram submetidos a gavagem ou sobrecarga ig de NaCl 2 M, que promove desidratação intracelular, 60 minutos antes dos experimentos. Após este período foram realizadas as injeções bilaterais de muscimol (0,25 ou 0,5 nmol/100 nl) ou salina no NTS e então os animais tiveram acesso à água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água e NaCl, os ratos não tiveram acesso à ração.

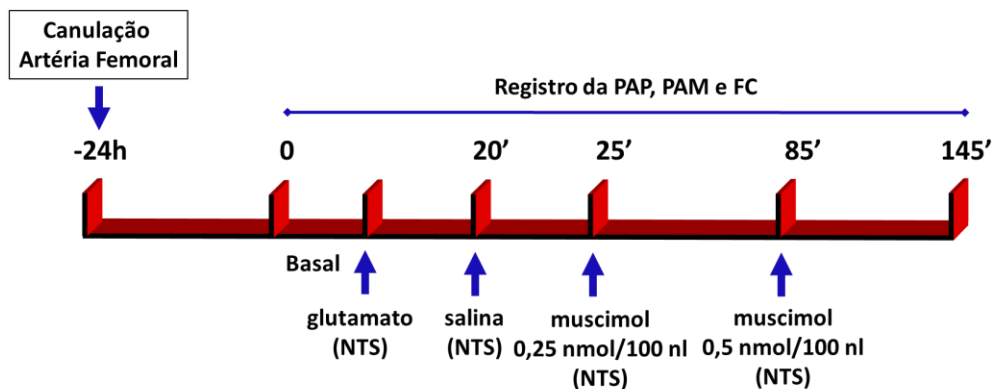
Para este estudo, os animais foram submetidos a 2 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Em cada teste, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, e cada subgrupo recebeu uma das seguintes combinações de tratamentos: 1) gavagem de NaCl 2 M + muscimol no NTS ou 2) gavagem de NaCl 2 M + salina no NTS. No teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada.



3.12.2 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA_A (muscimol) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normovolêmicos.

Neste protocolo foram realizados os registros dos parâmetros cardiovasculares de animais normovolêmicos que receberam injeções bilaterais do agonista gabaérgico, muscimol, no NTS.

Os animais eram conectados a um transdutor de pressão acoplado a um sistema computadorizado de registro, e após um período de aclimatação do animal, foi realizado o registro basal dos parâmetros cardiovasculares e teste funcional com injeções bilaterais de Glutamato (5 nmol/100 nl) no NTS [sabe-se que glutamato injetado no NTS de ratos não anestesiado promove aumento da PAM e queda da FC (MACHADO e BONAGAMBA, 1992)]. Ao término deste período que correspondeu a 20 minutos, os animais receberam injeções bilaterais de salina e após 5 min, receberam injeções bilaterais de muscimol (0,25 nmol/100 nl) no NTS. A PA, PAM e FC foram monitoradas por mais 60 min ou até que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos valores imediatamente anteriores às injeções de muscimol 0,25 nmol/100 nl. Após este período, foram realizadas injeções bilaterais de muscimol na dose de 0,5 nmol/100 nl e então, a PA, PAM e FC foram monitoradas por mais 60 min.



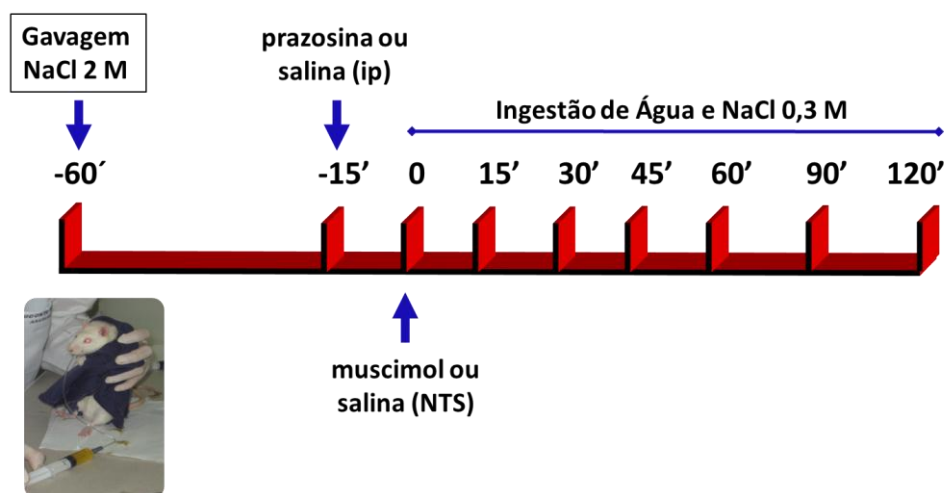
3.12.3 Efeito da injeção intraperitoneal (ip) do antagonista adrenérgico α_1 (prazosina) combinado com injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA_A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Neste protocolo avaliamos a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS que foram submetidos a gavagem (sobrecarga ig de NaCl

2 M), que promove desidratação intracelular, 60 minutos antes dos experimentos. Utilizamos a prazosina para retirar o efeito pressor do muscimol quando injetado no NTS.

Após 45 min, os animais receberam injeções intraperitoneais (ip) do antagonista de receptores adrenérgico α_1 , prazosina (1 mg/kg de peso corporal) ou salina, após 15 min todos os animais receberam injeções bilaterais do agonista gabaérgico, muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina bilateralmente no NTS e então os animais tiveram acesso à água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água e NaCl os ratos não tiveram acesso à ração.

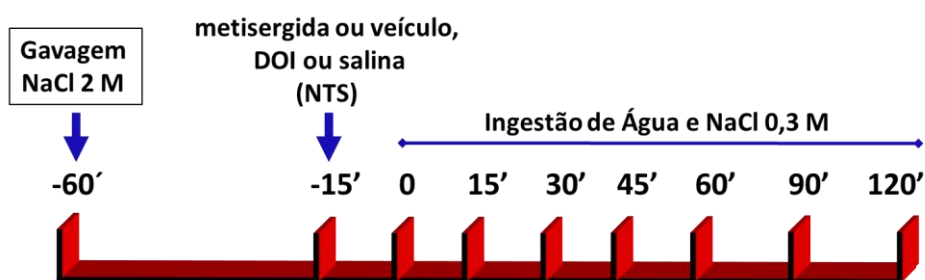
Para este estudo, os animais foram submetidos a 4 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Em cada teste, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, e cada subgrupo recebeu uma das seguintes combinações de tratamentos: 1) gavagem de NaCl 2 M + prazosina ip + muscimol no NTS ou 2) gavagem de NaCl 2 M + salina ip + muscimol no NTS. No teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada. 3) gavagem de NaCl 2 M + prazosina ip + salina no NTS ou 4) gavagem de NaCl 2 M + salina ip + salina no NTS e da mesma forma que o experimento anterior, no teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada.



3.12.4 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Neste protocolo avaliamos a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS que foram submetidos a gavagem ou sobrecarga ig de NaCl 2 M, que promove desidratação celular, 60 minutos antes dos experimentos. Após este período foram realizadas as injeções bilaterais de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina (veículo) no NTS e então os animais tiveram acesso à água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. Em outro grupo de animais, foram realizadas as injeções bilaterais de metisergida (2 µg/100 nl) ou propilenoglicol + H₂O (2:1, veículo) no NTS, 45 minutos após sobrecarga ig e então os animais tiveram acesso à água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água e NaCl os ratos não tiveram acesso à ração.

Para estes estudos, os animais foram submetidos a 2 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Em cada teste, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, e cada subgrupo recebeu uma das seguintes combinações de tratamentos: 1) gavagem de NaCl 2 M + DOI ou metisergida no NTS ou 2) gavagem de NaCl 2 M + salina ou propilenoglicol + H₂O (2:1) no NTS. No teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada.

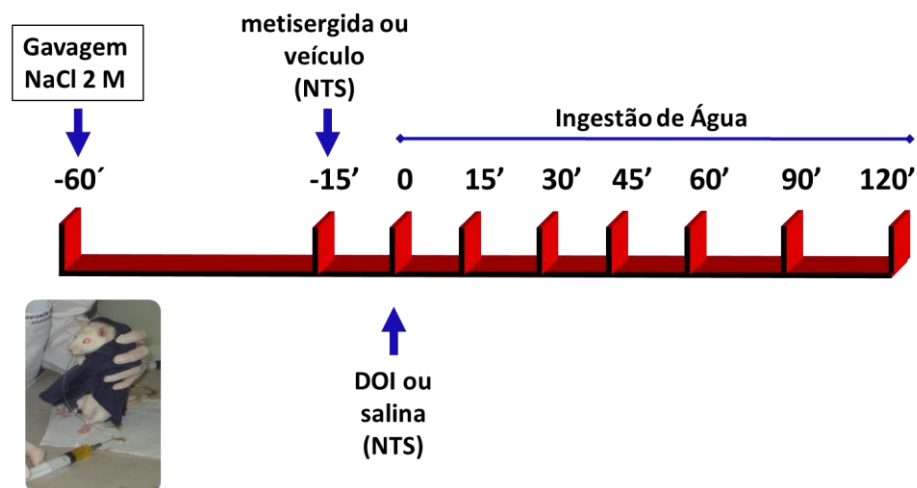


3.12.5 Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) + agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) no NTS sobre a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Neste protocolo avaliamos a ingestão de água em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS que foram submetidos a gavagem (sobrecarga ig de NaCl 2 M), que promove desidratação celular, 60 minutos antes dos experimentos.

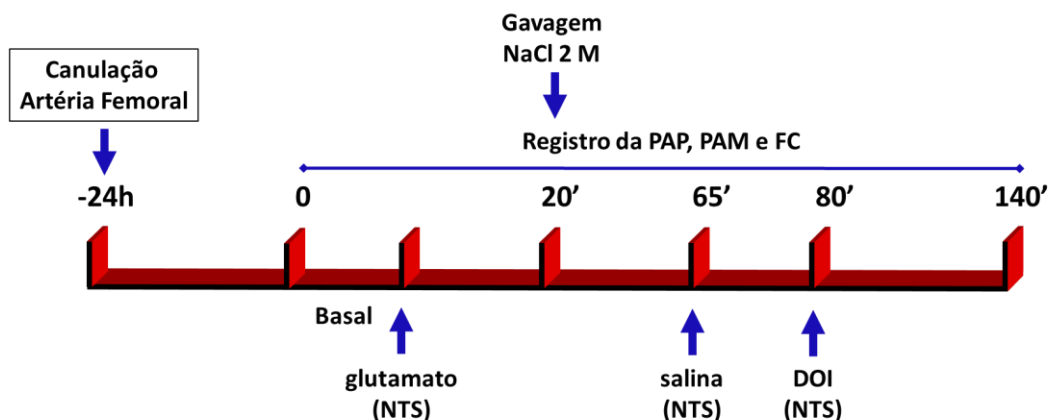
Após 45 min, os animais receberam injeções bilaterais do antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2}, metisergida (2 µg/100 nl) ou propilenoglicol + H₂O no NTS, após 15 min todos os animais receberam injeções bilaterais do agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C}, DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina bilateralmente no NTS e então os animais tiveram acesso à água em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água os ratos não tiveram acesso à ração.

Para este estudo, os animais foram submetidos a 4 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Em cada teste, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, e cada subgrupo recebeu uma das seguintes combinações de tratamentos: 1) gavagem de NaCl 2 M + metisergida no NTS + salina ou 2) gavagem de NaCl 2 M + propilenoglicol + H₂O (2:1) + salina. No teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada. 3) gavagem de NaCl 2 M + metisergida + DOI no NTS ou 4) gavagem de NaCl 2 M + propilenoglicol + H₂O (2:1) + DOI no NTS e da mesma forma que o experimento anterior, no teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada.



3.12.6 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares após desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Neste protocolo foram realizados os registros basais dos parâmetros cardiovasculares de animais submetidos a desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig) e que receberam agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) no NTS. Após a aclimação do animal foi realizado o registro basal dos parâmetros cardiovasculares e teste funcional com injeções bilaterais de glutamato (5 nmol/100 nl) no NTS. Ao término deste período o registro foi interrompido para que fosse realizada a gavagem de 2 ml de NaCl 2 M (12%) e imediatamente após este procedimento os animais foram novamente conectados ao transdutor de pressão. A PA, PAM e FC foram monitoradas por mais 45 min, quando foram realizadas as injeções de salina e após 15 min de registro, foram realizadas as injeções bilaterais do agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} DOI (2,5 µg/100 nl) no NTS. O registro das alterações cardiovasculares induzidas por gavagem + DOI no NTS foi realizada por 60 min.



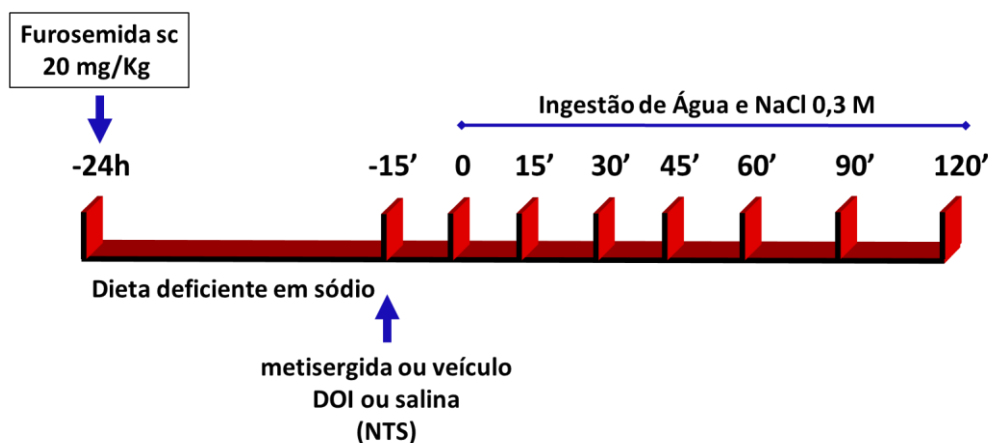
3.12.7 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação extracelular (furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio)

A ingestão de NaCl 0,3 M e água foi avaliada em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS submetidos à desidratação extracelular (24 h de depleção de sódio induzida por furosemida 20 mg/kg sc + fubá). Após este período o fubá foi removido e os animais receberam injeções bilaterais de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina no NTS. Em outro

grupo, os animais receberam injeções bilaterais de metisergida (2 $\mu\text{g}/100 \text{ nl}$) ou propilenoglicol + H_2O (2:1) no NTS.

Quinze minutos após as injeções no NTS, foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água e NaCl os ratos não tiveram acesso à ração.

Para este estudo, os animais foram submetidos a 2 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Os animais foram divididos em dois grupos e cada subgrupo recebeu um dos seguintes tratamentos: 1) Furosemida + DOI ou metisergida no NTS ou 2) Furosemida + salina ou propilenoglicol + H_2O (2:1) no NTS. A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos, ou seja, no teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada.



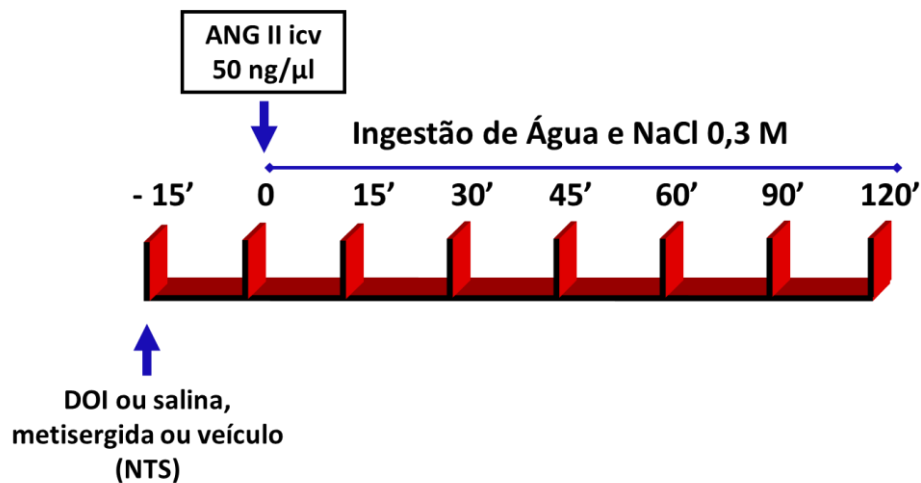
3.12.8 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por ANG II injetada no VL

Neste protocolo avaliamos a ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS e uma terceira cânula no VL onde receberam injeção de ANG II (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

Os animais receberam injeções bilaterais de DOI (2,5 $\mu\text{g}/100 \text{ nl}$) ou salina no NTS e após 15 min receberam injeção de ANG II (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 1 μl) no VL. Outro grupo de animais recebeu injeções bilaterais de propilenoglicol + H_2O (2:1) ou metisergida (2 $\mu\text{g}/100 \text{ nl}$) no

NTS e após 15 min recebeu injeção de ANG II (50 ng/ μ l, 1 μ l) no VL. Imediatamente após a injeção icv de ANG II, foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água e NaCl os ratos não tiveram acesso à ração.

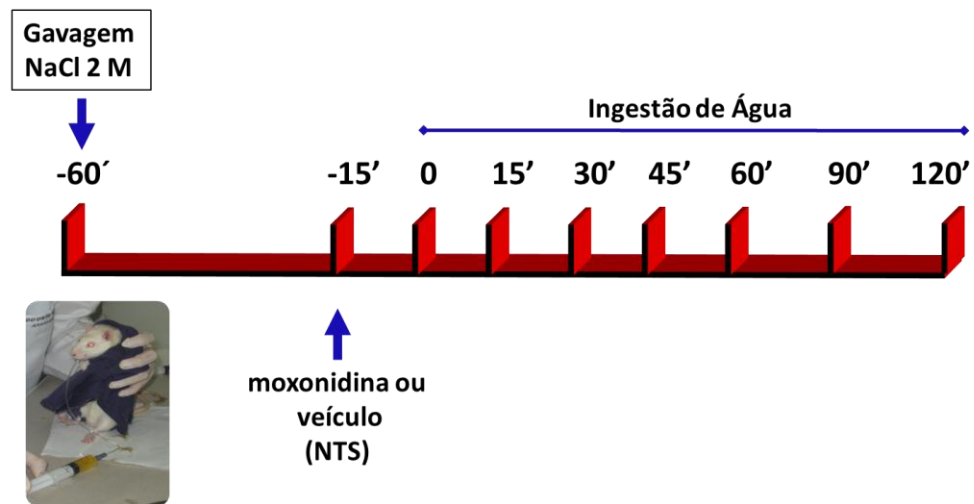
Para este estudo, os animais foram submetidos a 2 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Os animais foram divididos em dois grupos e cada subgrupo recebeu um dos seguintes tratamentos: 1) ANG II icv + DOI ou metisergida no NTS ou 2) ANG II icv + salina ou propilenoglicol + H₂O (2:1) no NTS. A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.



3.12.9 Efeito de injeções bilaterais de agonista adrenérgico/imidazólico α_2 (moxonidina) no NTS sobre a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Neste protocolo avaliamos a ingestão de água em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS que foram submetidos a gavagem ou sobrecarga ig de NaCl 2 M, que promove desidratação celular, 60 minutos antes dos experimentos. Após este período foram realizadas as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 ou 5 nmol/100 nl) ou propilenoglicol + H₂O (2:1, veículo) no NTS e então os animais tiveram acesso à água em tubos com divisão de 0,1 ml. A ingestão de água foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Durante o período de medida de ingestão de água e os ratos não tiveram acesso à ração.

Para este estudo, os animais foram submetidos a 2 testes com um intervalo de pelo menos 72 h entre eles. Em cada teste, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, e cada subgrupo recebeu uma das seguintes combinações de tratamentos: 1) gavagem de NaCl 2 M + moxonidina no NTS ou 2) gavagem de NaCl 2 M + propilenoglicol + H₂O (2:1) no NTS. No teste seguinte, os animais receberam as mesmas combinações de tratamentos de maneira contrabalanceada.

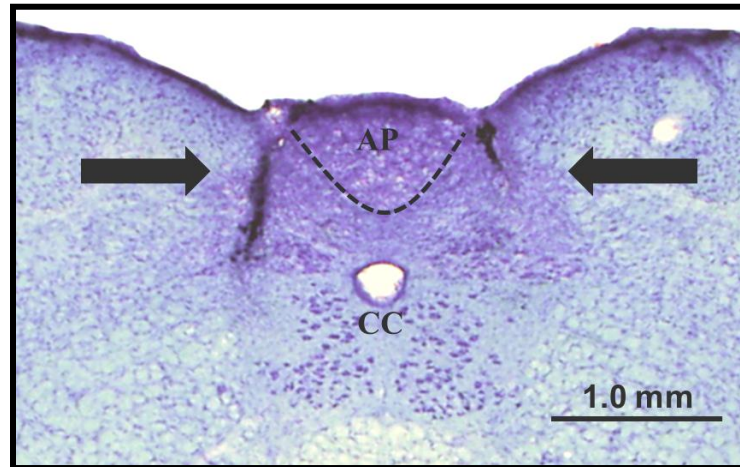


4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

A figura 4 (A) é uma fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados, mostrando os sítios de injeções bilaterais no NTS (setas). A área postrema (AP) e o canal central (CC) foram usados como referência anatômica. A maioria das injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediária e caudal (comissural) do NTS. (B) Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo, mostrando o sítio de injeção no ventrículo lateral (VL), conforme indicação da seta.

A



B

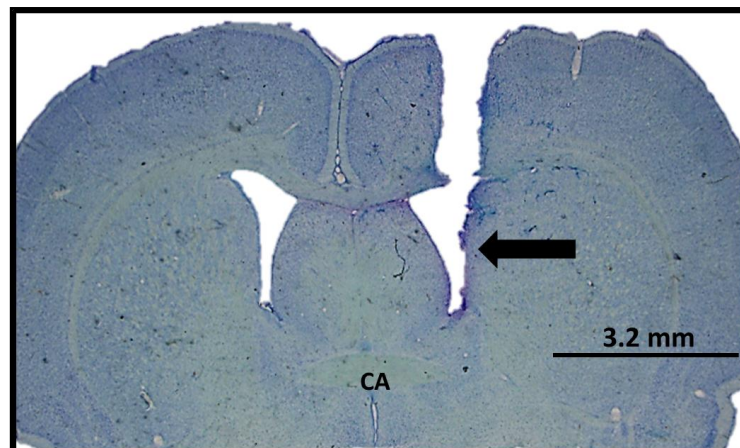


Figura 4: (A) Fotomicrografia de um corte transversal do bulbo de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de injeções bilaterais no núcleo do trato solitário (NTS, setas). A área postrema (AP) e o canal central (CC) foram usados como referência anatômica. A maioria das injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediária e caudal (comissural) do NTS. (B) Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo, de outro rato representativo do grupo, mostrando o sítio de injeção no ventrículo lateral (VL, seta). Comissura anterior (CA).

4.2 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA_A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Injeções bilaterais de agonista de receptores gabaérgicos GABA_A, muscimol na dose 0,25 nmol/100 nl, no NTS reduziram a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($3,6 \pm 1,6$ vs. salina: $8,9 \pm 1,6$ ml/2 h, figura 5) [$F(1,6) = 6,4$; $p < 0,05$].

Da mesma forma, as injeções bilaterais de agonista de receptores gabaérgicos GABA_A (muscimol, 0,5 nmol/100 nl) no NTS reduziram a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($2,6 \pm 0,8$, vs. salina: $9,1 \pm 1,5$ ml/2 h, figura 6 A) [$F(1,7) = 8,1$; $p < 0,05$]. Porém, a ingestão de sódio hipertônico não foi alterada pelo tratamento de muscimol (0,5 nmol/100 nl) no NTS ($1,5 \pm 0,9$, vs. salina: $1,4 \pm 0,5$ ml/2 h, figura 6 B) [$F(1,7) = 0,1$; $p > 0,05$].

A especificidade do NTS como local de ação do agonista gabaérgico foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos que receberam injeções de muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina (veículo) fora do NTS. Injeções bilaterais de muscimol fora do NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por desidratação intracelular (tabela 1).

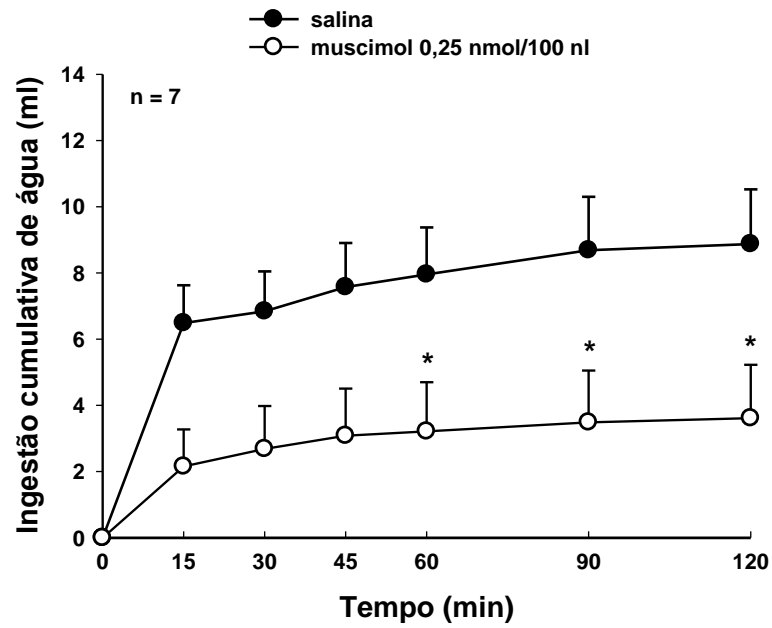


Figura 5: Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de muscimol (0,25 nmol/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais, * diferente de salina, $p < 0,05$.

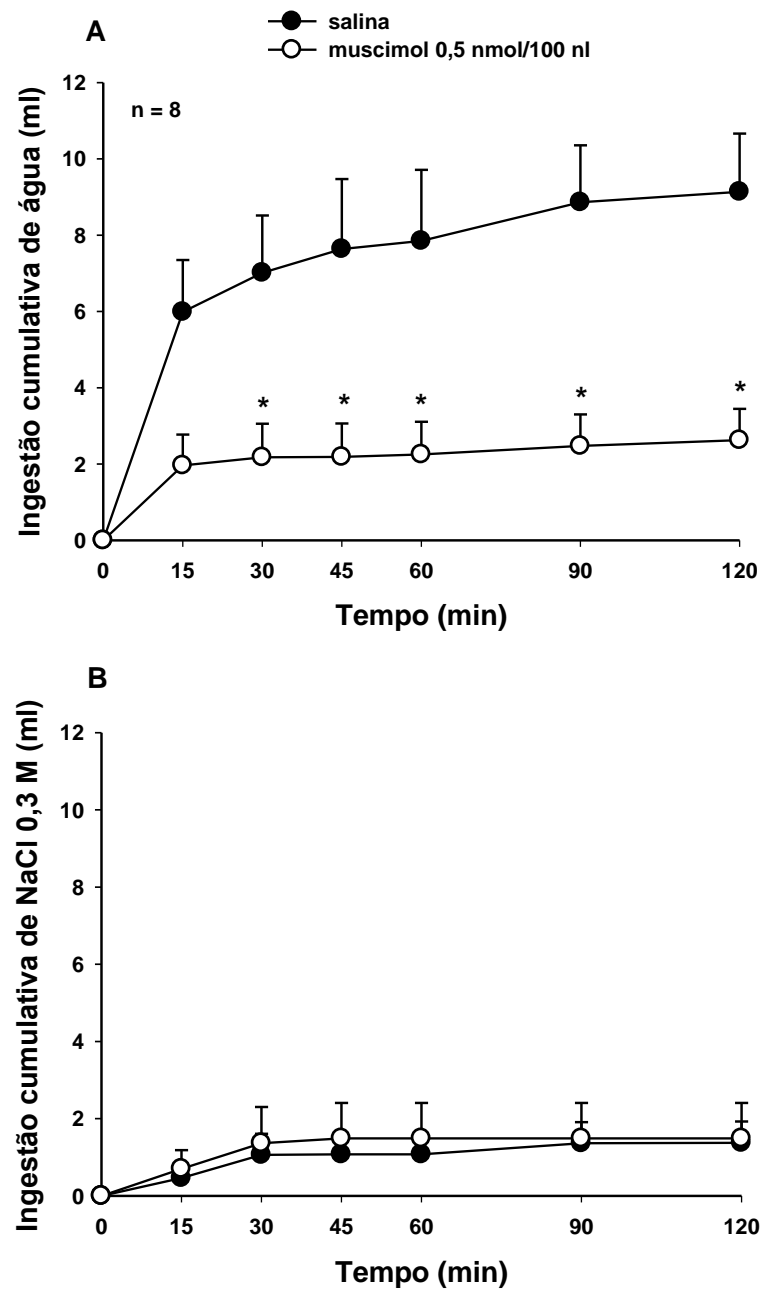


Figura 6: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de salina, $p < 0,05$.

Tabela 1. Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina em áreas adjacentes (fora) do NTS, como área postrema, núcleo gracillis, etc.

Tratamento	Tempo					
	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
	Ingestão de água (ml)					
salina	4,2 ± 1,2	6,6 ± 1,3	7,1 ± 1,5	8,3 ± 1,8	8,3 ± 1,8	8,3 ± 1,8
muscimol	4,3 ± 1,1	5,4 ± 1,5	6,4 ± 1,5	6,9 ± 1,5	6,9 ± 1,5	7,1 ± 1,5

Valores expressos como média ± E.P.M. Número de ratos = 11

4.3 Efeito de injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA_A (muscimol) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normovolêmicos.

Injeções bilaterais de agonista de receptores gabaérgicos GABA_A (muscimol 0,25 e 0,5 nmol/100 nl) no NTS produziram respostas pressoras ($36,0 \pm 6,8$ e $52,1 \pm 7,0$, respectivamente, vs. salina: $1,4 \pm 2,4$ mmHg, figura 7 A) [$F(2,14) = 20,6$; $p < 0,05$], no entanto, essas injeções não foram capazes de produzir alterações da FC ($36,7 \pm 14,9$ e $41,6 \pm 20,8$, respectivamente, vs. salina: $-4,2 \pm 9,9$ bpm figura 7 B) [$F(2,14) = 2,8$; $p < 0,05$] em ratos normovolêmicos e normohidratados. As análises foram realizadas utilizando-se o pico das respostas pressoras.

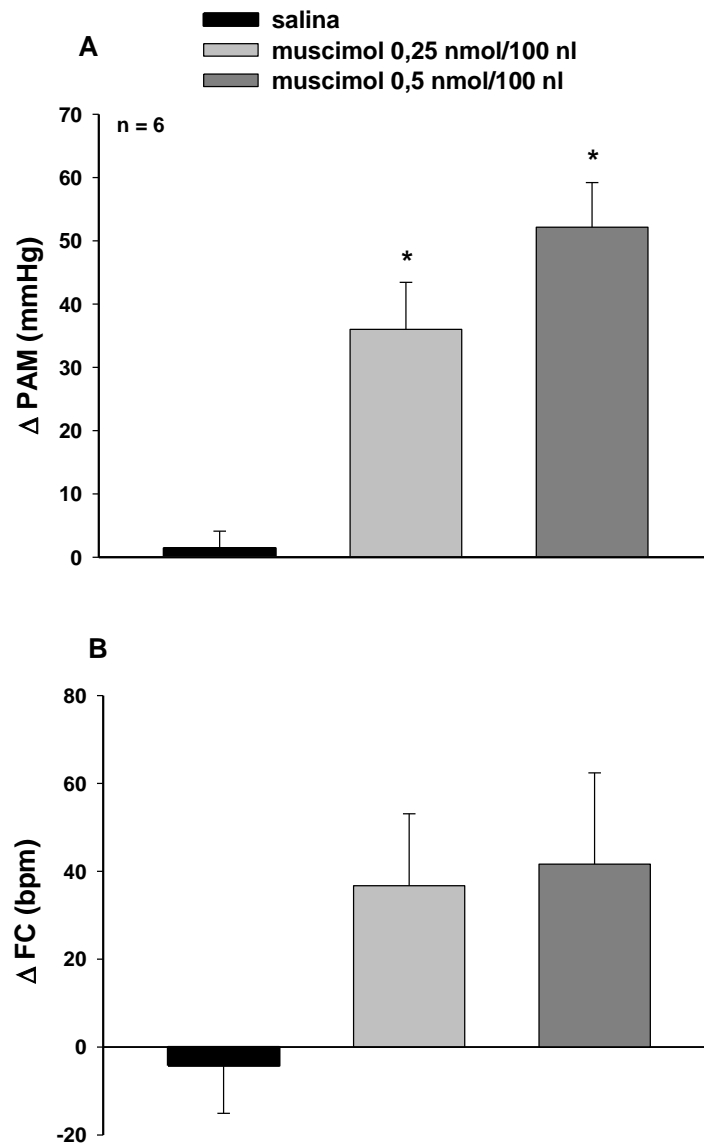


Figura 7: Variação de pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em ratos normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,25 e 0,5 nmol/100 nl) ou salina no NTS. Resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais. * diferente de salina, p < 0,05.

4.4 Efeito da injeção intraperitoneal (ip) do antagonista adrenérgico α_1 (prazosina) combinado com injeções bilaterais de agonista gabaérgico GABA_A (muscimol) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Injeções bilaterais de agonista de receptores gabaérgicos GABA_A (0,5 nmol/100 nl) no NTS reduziu a ingestão de água induzida por desidratação intracelular nos primeiros 30 minutos ($0,8 \pm 0,8$, vs. salina ip + salina NTS: $4,9 \pm 0,9$ ml/30 min, figura 8 A) [$F(3,18) = 4,0$; $p < 0,05$], mas não foi capaz de promover qualquer alteração na ingestão de sódio ($0,1 \pm 0,0$, vs. salina ip + salina NTS: $0,0 \pm 0,0$ ml/30 min, figura 8 B) [$F(3,18) = 1,2$; $p > 0,05$]. O tratamento com injeção ip do antagonista adrenérgico α_1 , prazosina (1 mg/kg de peso corporal), não foi capaz de bloquear os efeitos inibitórios das injeções bilaterais do muscimol no NTS, promovendo redução na ingestão de água nos primeiros 45 minutos ($0,5 \pm 0,5$ ml/45 min, figura 8 A) e também sem qualquer alteração na ingestão de sódio ($0,1 \pm 0,0$ ml/45 min, figura 8 B). Da mesma forma, a administração de prazosina ip seguido de injeções bilaterais de salina no NTS também reduziu a ingestão de água induzida por desidratação intracelular nos primeiros 30 minutos ($0,9 \pm 0,6$, vs. salina ip + salina NTS: $4,9 \pm 0,9$ ml/30 min, figura 8 A), mas não foi capaz de promover qualquer alteração na ingestão de sódio ($0,0 \pm 0,0$, vs. salina ip + salina NTS: $0,0 \pm 0,0$ ml/30 min, figura 8 B).

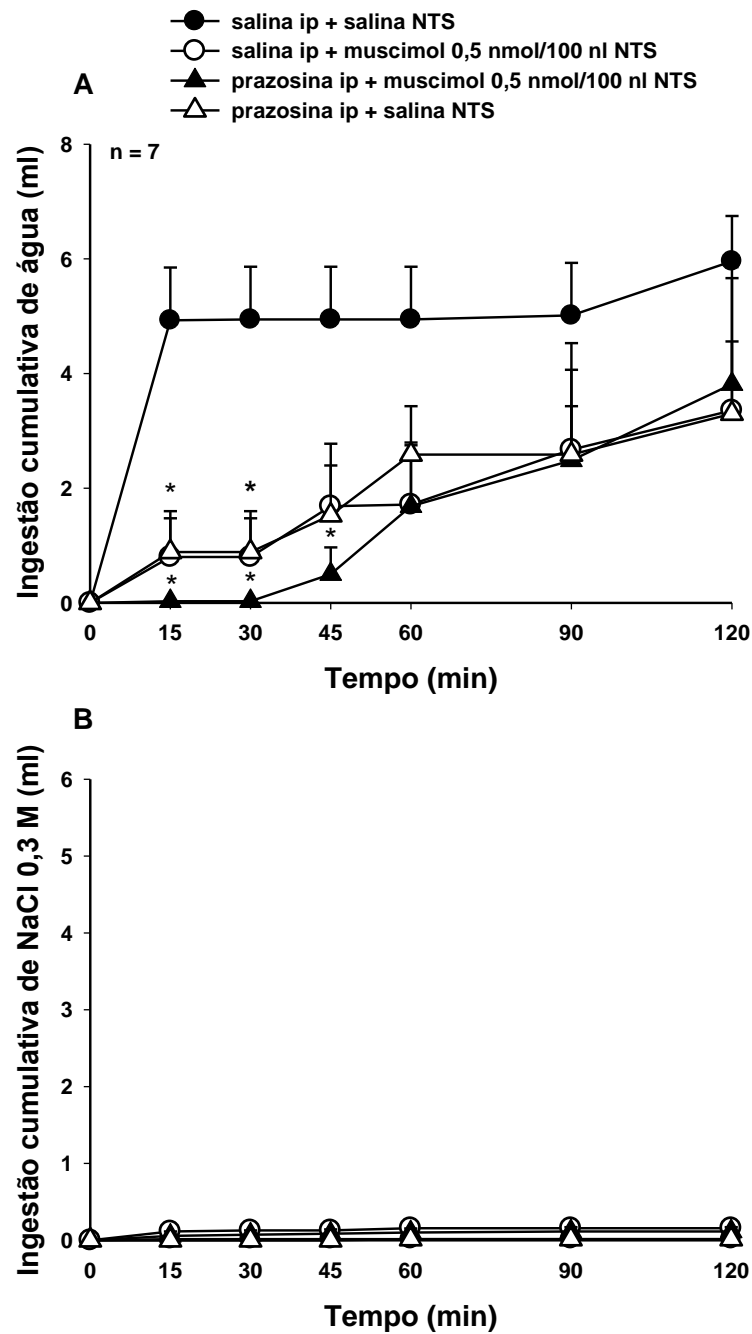


Figura 8: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/100 nl) ou salina no NTS combinado com prazosina (1 mg/kg de peso corporal) ou salina ip. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais, * diferente de salina ip + salina NTS, $p < 0,05$.

4.5 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NTS na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Injeções bilaterais de agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} (DOI, 2,5 µg/100 nl) no NTS reduziram a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($6,4 \pm 1,5$, vs. salina: $9,1 \pm 1,2$ ml/2 h, figura 9 A) [$F(1,18) = 4,56$; $p < 0,05$]. Porém, a ingestão de sódio hipertônico não foi alterada pelo tratamento de DOI no NTS ($0,3 \pm 0,1$, vs. salina: $0,9 \pm 0,3$ ml/2 h, figura 9 B) [$F(1,18) = 2,98$; $p > 0,05$].

Injeções bilaterais de antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} (metisergida, 2,0 µg/100 nl) no NTS não alteraram a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($9,6 \pm 1,3$, vs. salina: $9,0 \pm 1,3$ ml/2 h, figura 10 A) [$F(1,12) = 0,00$; $p > 0,05$]. Além disso, injeções bilaterais de metisergida no NTS também não alteraram a ingestão de sódio hipertônico ($0,9 \pm 0,5$, vs. salina: $0,3 \pm 0,2$ ml/2 h, figura 10 B) [$F(1,12) = 0,59$; $p > 0,05$].

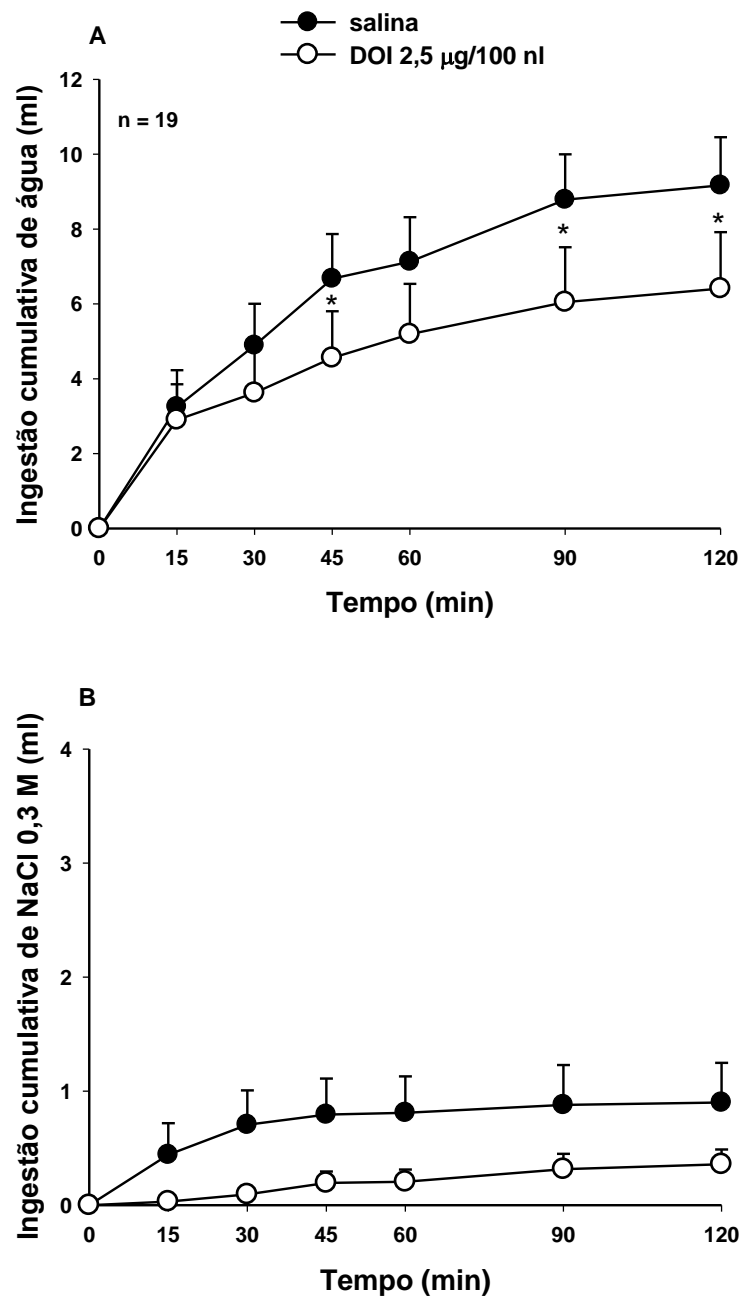


Figura 9: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais. * diferente de salina, $p < 0,05$.

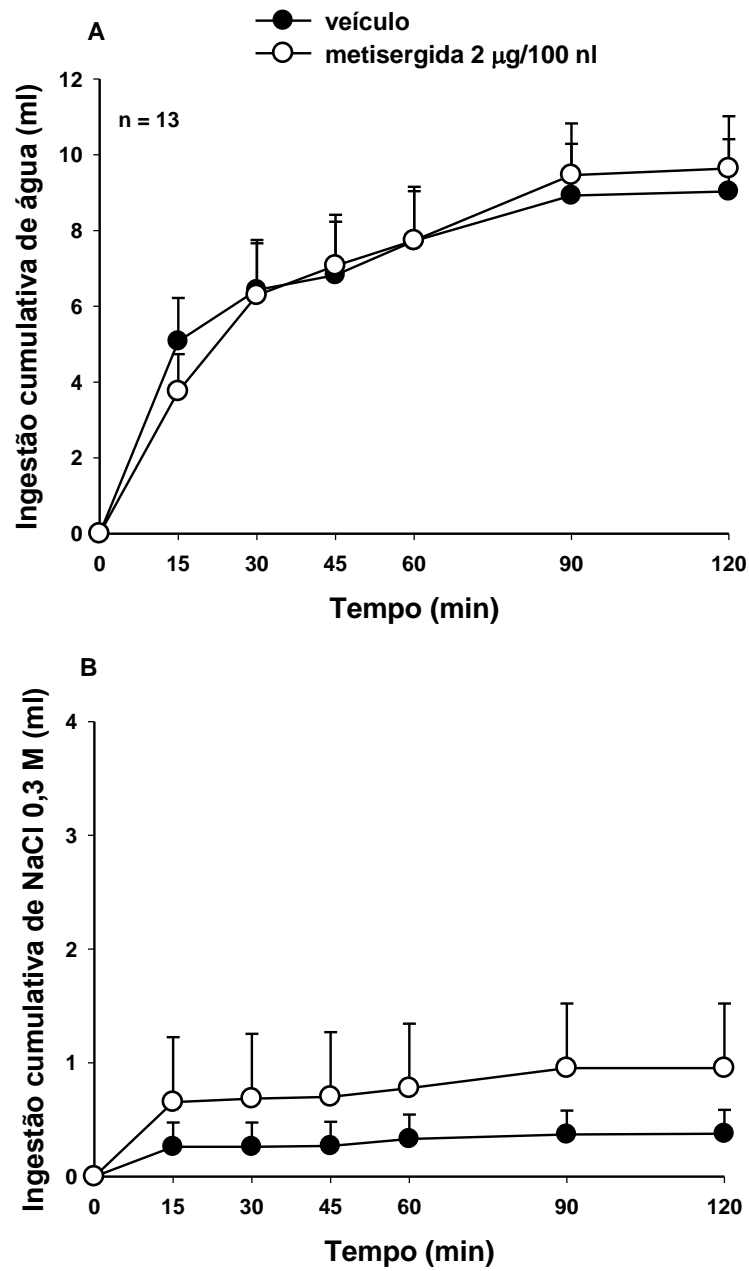


Figura 10: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 µg/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais.

4.6 Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) + agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) serotoninérgico no NTS sobre a ingestão de água e induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Injeções bilaterais de agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} (DOI, 2,5µg/100 nl) no NTS reduziram a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($1,7 \pm 0,8$, vs. veículo + salina: $7,3 \pm 1,8$ ml/2 h, figura 11) [F(3,21) = 16,2; p<0,05]. O pré-tratamento com injeções bilaterais de antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} (metisergida, 2,0 µg/100 nl) no NTS bloqueou o efeito de DOI na ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($5,9 \pm 1,3$ ml/2 h, figura 11) [F(3,21) = 16,2; p<0,05], enquanto a metisergida sozinha, não alterou a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($4,5 \pm 1,1$ ml/2 h, figura 11) [F(3,21) = 16,2; p<0,05].

A especificidade do NTS como local de ação do agonista serotoninérgico foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos que receberam injeções de DOI (2,5µg/100 nl) ou salina (veículo) fora do NTS. Injeções bilaterais de DOI fora do NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por desidratação intracelular (tabela 2).

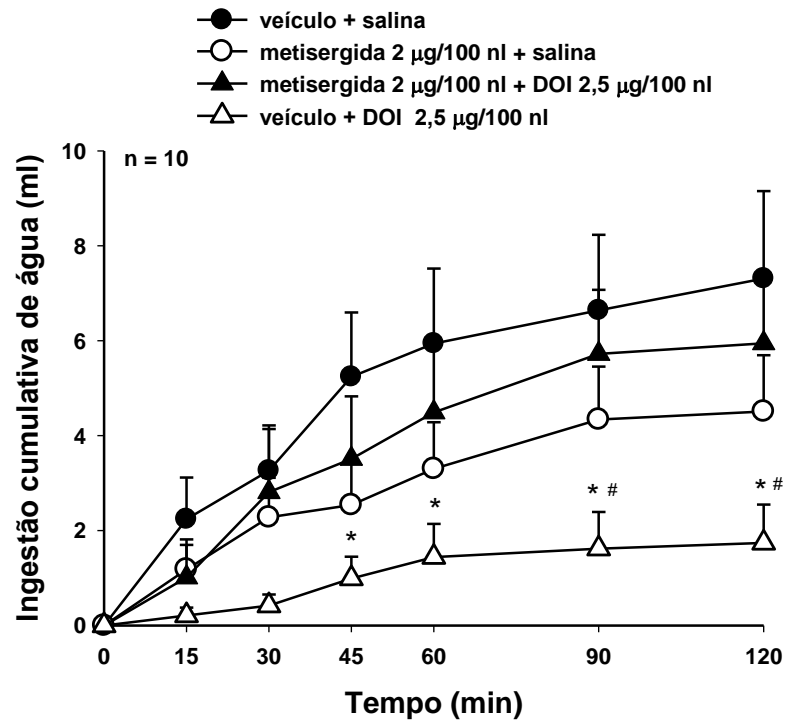


Figura 11: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 µg/100 nl) + DOI (2,5 µg/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais. * diferente de veículo + salina, $p < 0,05$. # diferente de metisergida + DOI, $p < 0,05$.

Tabela 2. Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M em ratos que receberam injeções bilaterais de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina em áreas adjacentes (fora) do NTS, como área postrema, núcleo gracillis, etc.

Tratamento	Tempo					
	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
	Ingestão de água (ml)					
salina	6,6 ± 0,2	6,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	7,2 ± 0,3
DOI	4,1 ± 2,6	5,8 ± 1,7	6,2 ± 1,6	6,2 ± 1,6	8,3 ± 2,2	8,3 ± 2,2

Valores expressos como média ± E.P.M. Número de ratos = 3

4.7 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) no NTS sobre parâmetros cardiovasculares após desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

A desidratação intracelular (induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M) promoveu aumento da pressão arterial média (PAM, $128 \pm 3,9$, vs. basal antes da gavagem: $114 \pm 3,2$ mmHg, tabela 3) [$t(14) = 2,7$; $p < 0,05$] sem qualquer alteração na frequência cardíaca (FC, $349 \pm 15,3$, vs. basal antes da gavagem: $339 \pm 10,1$ bpm, tabela 3) [$t(14) = 0,6$; $p = 0,585$].

Porém, injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI, 2,5 μ g/100 nl) no NTS não produziram alterações na PAM ($142 \pm 5,4$, vs. salina: $130 \pm 7,5$ mmHg, figura 12 A) [$t(10) = 1,2$; $p = 0,241$] e nem na FC ($338 \pm 12,7$, vs. salina: $318 \pm 21,1$ bpm figura 12 B) [$t(10) = 0,9$; $p = 0,409$] em ratos com desidratação intracelular.

Tabela 3. Parâmetros cardiovasculares de ratos antes e após receberem sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (desidratação intracelular).

Tratamento	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Basal	114 ± 3	339 ± 10
NaCl 2 M	128 ± 4*	349 ± 15

Valores expressos como média ± E.P.M. Número de ratos = 08.

*diferente de basal

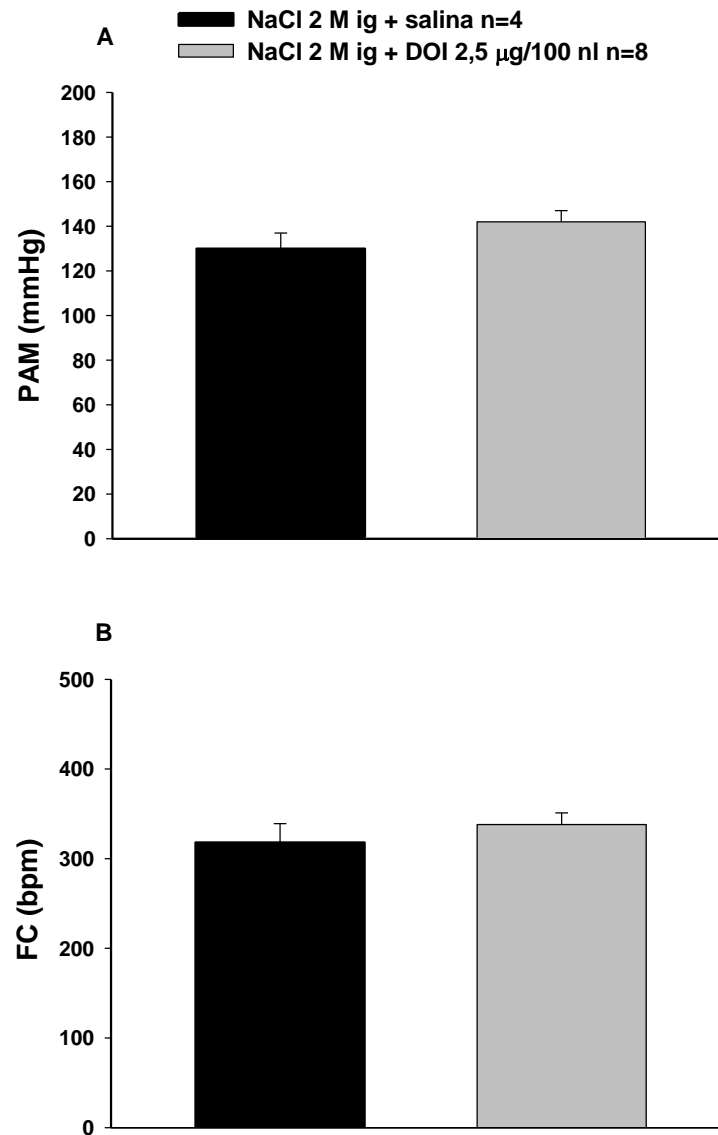


Figura 12: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) em ratos com desidratação intracelular que receberam injeções bilaterais de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina no NTS. Resultados expressos como média \pm EPM, n, número de animais.

4.8 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por desidratação extracelular (furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio)

Injeções bilaterais de agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} (DOI, 2,5 µg/100 nl) no NTS não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($9,6 \pm 2,6$, vs. salina: $13,8 \pm 2,8$ ml, figura 13 A) [$F(1,8) = 1,20$; $p < 0,05$] e a ingestão de água ($3,9 \pm 1,9$, vs. salina: $1,8 \pm 0,6$ ml, figura 13 B) [$F(1,8) = 0,29$; $p < 0,05$] induzida por desidratação extracelular (depleção de sódio induzida por furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio, fubá).

Injeções bilaterais de antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} (metisergida, 2,0 µg/100 nl) no NTS também não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($13,8 \pm 3,5$, vs. salina: $13,8 \pm 3,7$ ml, figura 14 A) [$F(1,7) = 0,00$; $p > 0,05$] e a ingestão de água ($4,4 \pm 1,5$, vs. salina: $3,3 \pm 1,6$ ml, figura 14 B) [$F(1,7) = 0,44$; $p > 0,05$] induzida por desidratação extracelular (depleção de sódio induzida por furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio, fubá).

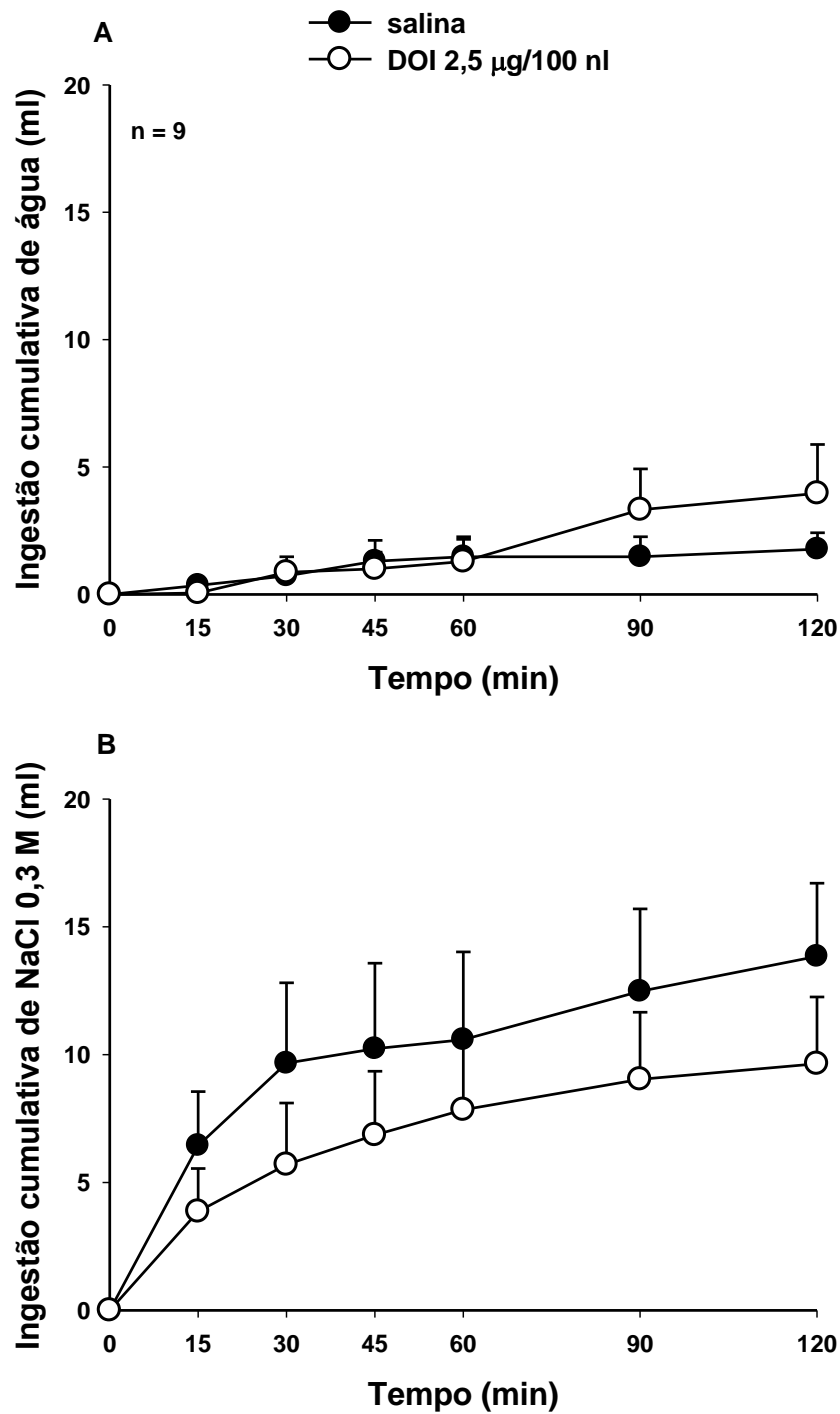


Figura 13: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por depleção de sódio (furosemda + 24 h com dieta deficiente em sódio) em ratos que receberam injeção bilateral de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais.

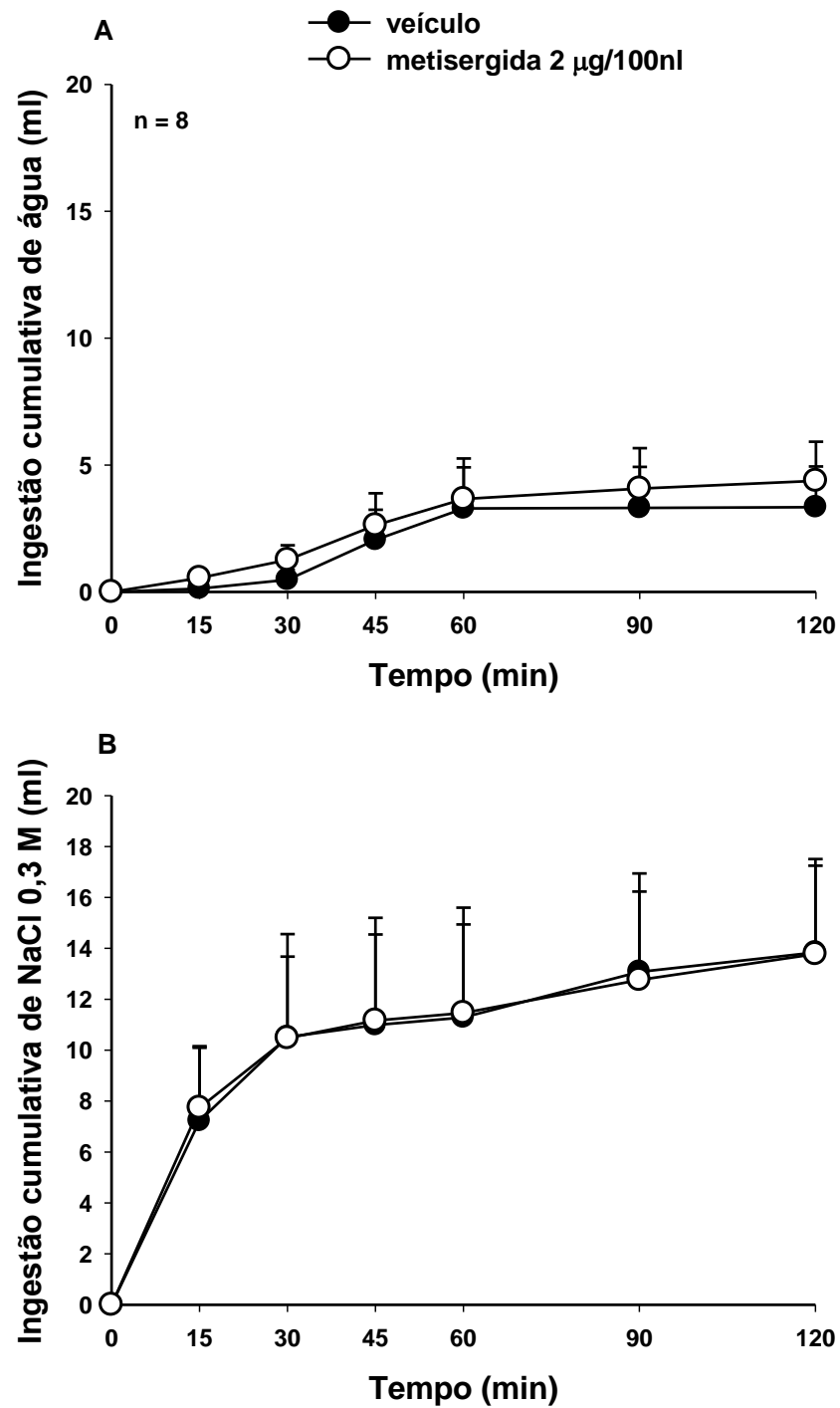


Figura 14: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por depleção de sódio (furosemida + 24 h com dieta deficiente em sódio) em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 µg/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais.

4.9 Efeito de injeções bilaterais de agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C} (DOI) ou de antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2} (metisergida) no NTS sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por ANG II injetada no VL

Injeções bilaterais de agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} (DOI, 2,5µg/100 nl) no NTS reduziram a ingestão de água induzida por ANG II injetada no VL (9,9 ± 1,1, vs. salina: 14,5 ± 1,3 ml/15 min, figura 15) [F(1,10) = 0,77; p<0,05].

Injeções bilaterais de antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} (metisergida, 2,0µg/100 nl) no NTS não alteraram a ingestão de água (14,0 ± 3,1, vs. salina: 14,3 ± 2,4 ml, figura 16 A) [F(1,6) = 0,01; p<0,05] e a ingestão de NaCl 0,3 M (3,8 ± 1,6, vs. salina: 5,6 ± 2,3 ml, figura 16 B) [F(1,6) = 0,23; p<0,05] induzida por ANG II injetada no VL.

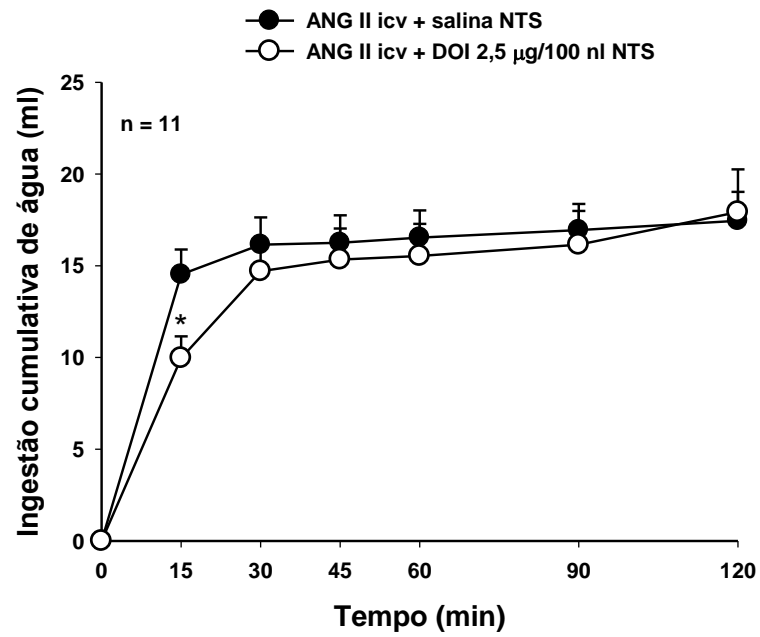


Figura 15: Ingestão cumulativa de água induzida por injeção icv de ANG II em ratos que receberam injeção bilateral de DOI (2,5 µg/100 nl) ou salina no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais. * diferente de ANG II icv + salina NTS, $p < 0,05$.

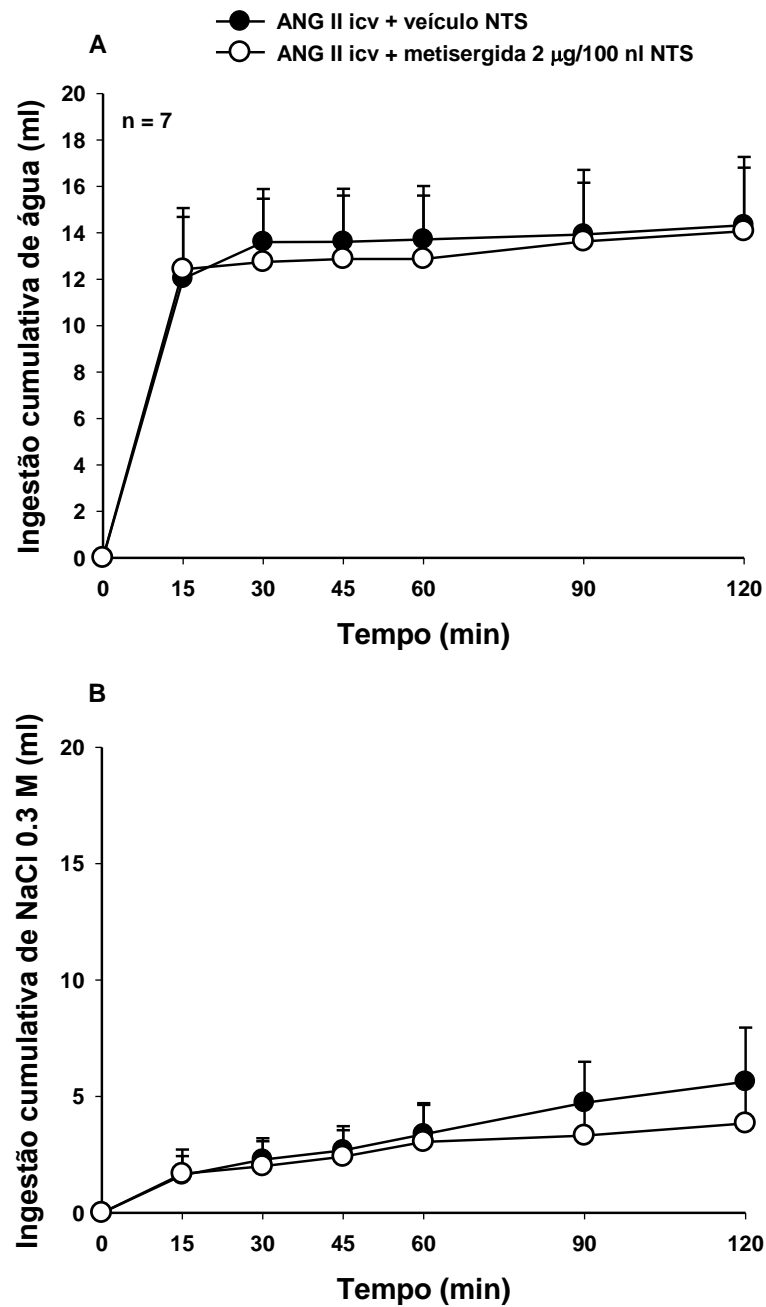


Figura 16: Ingestão cumulativa de água (A) e de NaCl 0,3 M (B) induzida por injeção icv de ANG II em ratos que receberam injeção bilateral de metisergida (2,0 µg/100 nl) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM, n, número de animais.

4.10 Efeito de injeções bilaterais de agonista adrenérgico α_2 /imidazólico (moxonidina) no NTS sobre a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (NaCl 2 M, ig)

Injeções bilaterais de agonista de receptores adrenérgicos α_2 (moxonidina, 0,5 e 5,0 nmol/100 nl) no NTS não alteraram a ingestão de água induzida por desidratação intracelular ($10,7 \pm 1,8$, vs. veículo: $10,9 \pm 2,6$ ml/2 h, figura 17 A) [$F(1,3) = 0,03$; $p > 0,05$] e ($6,0 \pm 1,3$, vs. veículo: $7,7 \pm 1,3$ ml/2 h, figura 17 B) [$F(1,5) = 0,08$; $p > 0,05$] respectivamente.

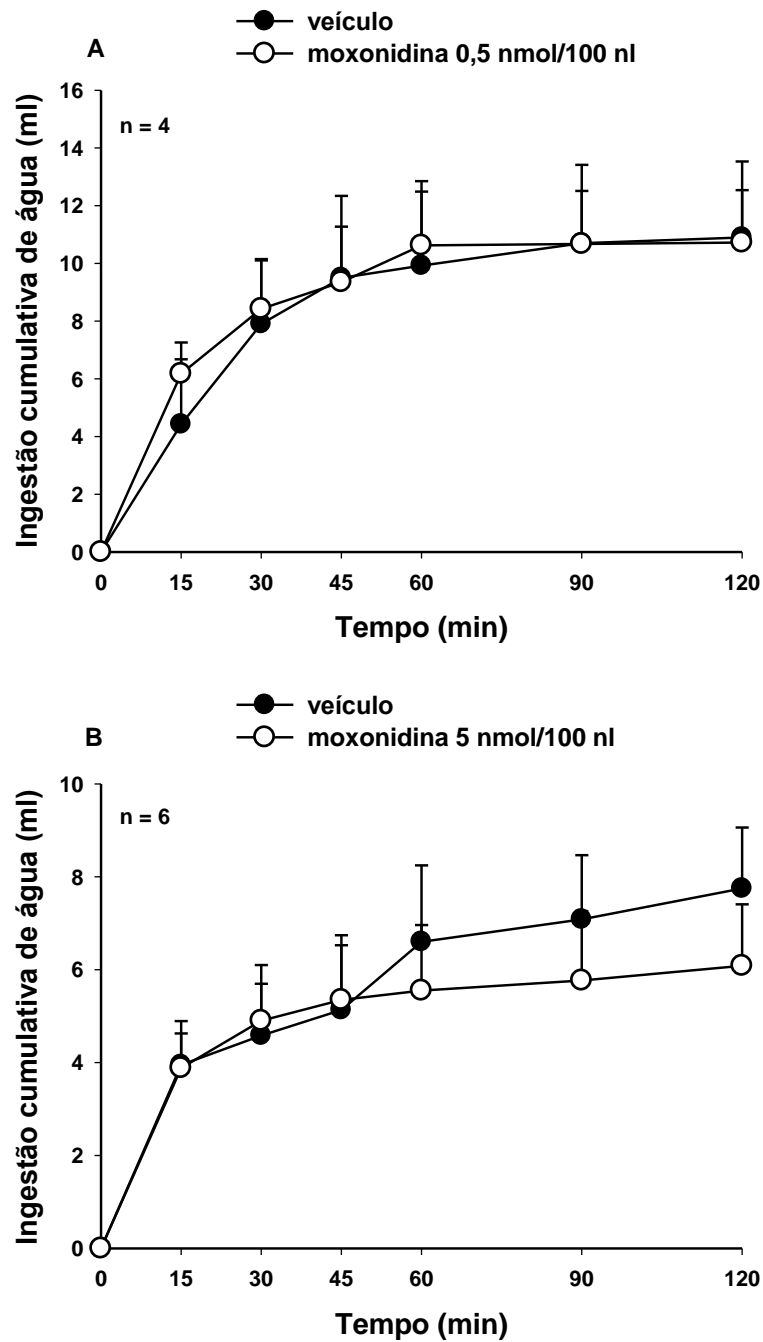


Figura 17: Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeção bilateral de moxonidina (0,5 nmol/100 nl, painel A ou 5 nmol/100 nl, painel B) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média \pm EPM, n, número de animais.

5 Discussão

5.1 Receptores gabaérgicos GABA_A do NTS

Os resultados mostraram que injeções bilaterais do agonista de receptores gabaérgicos GABA_A, muscimol (0,25 e 0,5 nmol/100 nl) no NTS reduziram a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (desidratação intracelular). No entanto, não houve qualquer alteração na ingestão de sódio após injeções deste agonista (0,5 nmol/100 nl) no NTS, sugerindo que os receptores gabaérgicos do subtipo A do NTS ativam o mecanismo inibitório principalmente para a ingestão de água e não de sódio.

Estudo recente de Blanch e colaboradores (2013) mostraram que a lesão eletrolítica do NTS comissural promoveu aumento da ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (desidratação intracelular) e este efeito, segundo os autores, é atribuído à retirada do mecanismo inibitório para ingestão de água presente no NTS. Em adição, estudo de Freiria-Oliveira e colaboradores (2015), mostraram que a lesão química e seletiva dos neurônios adrenérgicos do NTS comissural (utilizando saporina conjugada dopamina-beta-hidroxilase) também aumenta a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, sugerindo que são os neurônios adrenérgicos do NTS comissural que ativam o mecanismo inibitório para regular a ingestão de água durante a hiperosmolaridade, evitando a hipervolemia e a expansão de volume durante essa situação. Por outro lado, nossos resultados mostraram que o bloqueio farmacológico deste núcleo através de injeções bilaterais de agonista gabaérgico (muscimol) promoveu uma redução da ingestão de água induzida pelo mesmo tratamento, mostrando resultados opostos. Esta diferença entre os resultados pode ser atribuída a diferentes subregiões do NTS estudadas nos trabalhos. Os trabalhos de Blanch e colaboradores (2013) e Freiria-Oliveira e colaboradores (2015), realizaram lesões restritas ao subnúcleo comissural do NTS, já nossas injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediária e comissural (caudal) do NTS. Importante observar que utilizamos um volume de 100 nl injetado bilateralmente no NTS e esse volume promove um espalhamento de aproximadamente 1,0 mm o que atinge quase toda a extensão do NTS intermediário e comissural.

Vale destacar, que injeções bilaterais de muscimol fora do NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por desidratação intracelular, sugerindo que o efeito do muscimol sobre a ingestão de água é específico e dependente do NTS.

Nossos resultados também mostraram que injeções bilaterais de muscimol no NTS não promoveram alterações na ingestão de sódio hipertônico (NaCl 0,3 M) induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (desidratação intracelular). Em condições normais, a ingestão de sódio hipertônico é evitada durante hiperosmolaridade (STRICKER e VERBALIS, 1996) e nesse protocolo experimental com a sobrecarga ig de NaCl 2 M ocorre um aumento de 4% da concentração plasmática de sódio e da osmolaridade e redução da atividade da renina plasmática (PEREIRA et al., 2002). Por outro lado, estudo de Kimura e colaboradores (2008), mostrou que injeções bilaterais de muscimol no NPBL promoveu um grande aumento da ingestão de sódio hipertônico e água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, mostrando que a ingestão de NaCl hipertônico ocorreu apesar da hiperosmolaridade, hipernatremia, redução da atividade de renina plasmática e da normovolemia presentes nos ratos que recebem a sobrecarga ig de NaCl 2 M (KIMURA et al., 2008). Estes resultados sugerem que os níveis de renina e a osmolaridade plasmática não afetam a ingestão de sódio após o bloqueio do mecanismo inibitório do NPBL. Porém, nossos resultados mostraram que a inibição do NTS com muscimol, diferente do NPBL, não altera a ingestão de sódio hipertônico em animais submetidos a desidratação intracelular. Estudos de Callera e colaboradores (2005b) também mostraram que injeções bilaterais de muscimol no NPBL promove uma indução da ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos, e o prévio tratamento com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) reverteu esse efeito. No entanto, não sabemos qual seria o efeito sobre a ingestão de NaCl hipertônico e água após injeções bilaterais de muscimol no NTS de animais saciados e normovolêmicos.

Nossos resultados e Callera e colaboradores (2000) também mostraram que injeções bilaterais de muscimol no NTS promoveram aumento da PAM em ratos saciados e normovolêmicos e esse efeito pressor poderia estar levando a redução da ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Desta forma, utilizamos a prazosina (antagonista de receptores adrenérgicos α_1) em uma dose capaz de bloquear o efeito pressor do muscimol. Nossos resultados mostraram que a prazosina injetado intraperitonealmente não foi capaz de retirar o efeito inibitório sobre a ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M quando o muscimol foi injetado no NTS, mostrando que este efeito do muscimol não é dependente do efeito pressor. Além disso, Gasparini e colaboradores (2013) mostrou que a injeção ip de prazosina reduz a pressão arterial de animais normotensos e normovolêmicos o que poderia reduzir a inibição da ingestão de água promovida pela atividade dos receptores cardiovasculares, reduzindo a atividade dos barorreceptores e

possivelmente dos receptores de volume, o que poderia facilitar a ingestão de água. No entanto nossos resultados mostram que a ingestão de água permanece baixa nos grupos prazosina ip + muscimol NTS e prazosina ip + salina NTS (figura 6).

5.2 Receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} e 5-HT_{2A/2C} do NTS

Nossos resultados também mostraram que injeções bilaterais do agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C}, DOI, no NTS reduz a ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M. Este efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2}, metisergida no NTS, sugerindo que este efeito do agonista DOI, na ingestão de água induzida por este protocolo ocorre através da ativação de receptores 5-HT₂. Por outro lado, injeções bilaterais do antagonista, metisergida, sozinho no NTS, não produziu qualquer alteração na ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M. Estes resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2}, não possuem um efeito tônico no controle da ingestão de água induzida por desidratação intracelular e que a ativação dos receptores 5-HT_{2A/2C} no NTS ativa o mecanismo inibitório para ingestão de água nesta área.

Além disso, quando as injeções de DOI foram realizadas fora do NTS, a ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M, não foi alterada, sugerindo que o mecanismo serotoninérgico envolvido neste controle da ingestão de água está localizado especificamente no NTS.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos do nosso laboratório (BLANCH et al., 2007, BLANCH et al., 2013, FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2015) em que lesões do NTS comissural aumentam a ingestão de água induzida por isoproterenol (BLANCH et al., 2007) e a ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M (BLANCH et al., 2013). Além disso, lesões mais específicas do NTS comissural, como as lesões do grupamento de neurônios noradrenérgicos (A2), também aumentam a ingestão de água induzida por desidratação intracelular (FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2015). Estes estudos sugerem que o NTS comissural é parte de um circuito inibitório do controle da ingestão de água após estimulação hipertônica (BLANCH et al., 2013; FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2015). Porém, ainda não se sabia quais são os neurotransmissores ou neuromoduladores do NTS envolvidos neste mecanismo de desidratação intracelular e nosso trabalho sugere que a serotonina, ou mais especificamente os receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} do NTS estão envolvidos, uma vez que a injeção do agonista destes receptores serotoninérgicos, DOI, reduziu a ingestão de água induzida por estímulo hipertônico e esta redução foi bloqueada pelo antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2}, metisergida.

Nossos resultados também mostraram que injeções bilaterais de DOI ou metisergida no NTS não alteraram a ingestão de sódio induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M. Como já descrito anteriormente, durante a desidratação intracelular, animais normalmente evitam a ingestão de soluções hipertônicas de NaCl e mecanismos inibitórios devem estar presentes prevenindo o consumo excessivo de NaCl hipertônico (STRICKER e VERBALIS, 1996), porém, De Luca e colaboradores (2003) e David e colaboradores (2015) mostraram que injeções bilaterais de metisergida no NPBL promoveram um grande aumento da ingestão de sódio hipertônico induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M, sugerindo que a serotonina ou mais especificamente os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} do NPBL participam da inibição da ingestão de sódio durante a desidratação intracelular, evitando assim um maior aumento da osmolaridade. David e colaboradores (2015) mostraram também, através de estudo de imunohistoquímica, que os neurônios do NTS são fortemente ativados após a injeção bilateral de metisergida no NPBL em animais com sobrecarga ig de NaCl 2 M, porém esse tratamento não promoveu alterações na concentração plasmática de ocitocina, vasopressina, na PAM e FC.

Sabemos que os osmorreceptores periféricos enviam sinais ao SNC através do ramo hepático do nervo vago (KRALY et al., 1995, STRICKER et al., 2002) e realizam sua primeira sinapse no NTS (HABERICH, 1968; ADACHI, 1984; HOSOMI e MORITA, 1996). Além disso, existe uma via serotoninérgica conectando a AP e NTS com o NPBL (LANCA e VAN DER KOOY, 1985), podendo liberar serotonina neste importante núcleo da ponte, que está envolvido com o controle do apetite ao sódio, durante a desidratação intracelular. A presença de serotonina no NPBL promoveria a inibição da ingestão de sódio hipertônico, evitando uma maior desidratação das células, uma vez que as injeções de antagonista serotoninérgico, metisergida no NPBL produziram ingestão de sódio hipertônico durante a hiperosmolaridade (DE LUCA et al., 2003, DAVID et al., 2015). Assim, poderíamos esperar que a lesão eletrolítica ou o bloqueio farmacológico do NTS com muscimol, fossem capazes de aumentar a ingestão de sódio em animais que apresentam hiperosmolaridade. No entanto, nossos resultados mostraram que a ingestão de sódio hipertônico não foi alterada após injeções bilaterais de muscimol ou metisergida no NTS de ratos que receberam sobrecarga ig de NaCl 2 M. Da mesma forma, as lesões eletrolíticas (BLANCH et al., 2013) ou mesmo a lesão química seletiva de neurônios adrenérgicos (FREIRIA-OLIVEIRA et al., 2015) do NTS comissural, não foram capazes de alterar a ingestão de sódio induzida por desidratação intracelular. Estes dados sugerem que o receptores serotoninérgicos 5-HT_{1/2} do NTS não

participam diretamente do mecanismo inibitório para ingestão de sódio induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.

Nossos resultados mostraram que não houve alterações dos parâmetros cardiovasculares, PAM e FC, em animais que receberam injeções bilaterais do agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C}, DOI, no NTS após tratamento com sobrecarga ig de NaCl 2 M, indicando, que a inibição da ingestão de água promovida pelo DOI não foi devido a alterações hemodinâmicas da PAM e FC. Estudos da literatura mostraram que injeções bilaterais de baixas doses (pmol) de 5-HT e de DOI no NTS produziram hipotensão e bradicardia, porém a injeção de doses mais altas (nmol) produziram hipertensão e bradicardia (WOLF et al., 1981, MERAHI et al., 1992, SEVOZ et al., 1996). Em nosso trabalho utilizamos uma dose 100 vezes maior (2,5 µg/100 nl) que as doses em nmol e assim esperaríamos um aumento da PAM, porém, não verificamos hipertensão quando comparamos com a injeção de salina (142 ± 5,4, vs. salina: 130 ± 7,5 mmHg, figura 10 A). No entanto, a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M promoveu um aumento da PAM (128 ± 3,9, vs. basal antes da gavagem: 114 ± 3,2 mmHg, tabela 3) e esse aumento poderia estar mascarando o aumento de PAM promovido pelo DOI injetado no NTS. Desta forma, mais animais deverão ser incluídos no grupo de registro dos parâmetros cardiovasculares com injeção de DOI ou salina no NTS associados a desidratação intracelular para esclarecer se realmente as injeções bilaterais de DOI no NTS não promovem aumento da PAM em animais que receberam sobrecarga ig de NaCl 2 M, e assim confirmar que a inibição na ingestão de água induzida pela desidratação intracelular promovida pelas injeções bilaterais de DOI no NTS não é devido a alterações hemodinâmicas.

Nossos resultados também mostraram que injeções bilaterais de DOI ou metisergida no NTS não alteraram a ingestão de sódio hipertônico e água induzida por depleção de sódio (furosemida sc + 24 h com dieta deficiente em sódio, modelo de desidratação extracelular). Estudo de Ogihara e colaboradores (2009) mostraram que a lesão eletrolítica no NTS comissural potenciou a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio, sugerindo que o NTS comissural é uma região inibitória também para ingestão de sódio. No entanto, em nossos experimentos DOI e metisergida foram injetados tanto no NTS intermediário como comissural (devido ao espalhamento do fármaco injetado) e assim não verificamos alterações na ingestão de sódio hipertônico induzida por depleção de sódio, sugerindo que os receptores 5-HT₁ e 5-HT_{2A/2C} do NTS não estão envolvidos na modulação da ingestão de sódio induzida por depleção de sódio produzida pela furosemida. Estudos de Menani e colaboradores (1998) também mostraram que a injeção bilateral de metisergida no NPBL aumentou a ingestão de

sódio hipertônico induzida por depleção de sódio e também aumentou a ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica, sugerindo que os mecanismos serotoninérgicos do NPBL modulam a ingestão de água e sódio induzida por depleção de volume e perda de sódio.

Vários outros estudos da literatura (MENANI e JOHNSON, 1995, MENANI et al., 1996, MENANI et al., 1998b, DE GOBBI et al., 2000) mostraram que injeções do antagonista serotoninérgico 5-HT_{1/2}, metisergida, no NPBL, potencializam a ingestão de água e sódio hipertônicos em diferentes protocolos, como o tratamento FURO/CAP, privação hídrica, injeções icv de ANG II e o tratamento com DOCA, enquanto o agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C}, DOI, ou da própria serotonina no NPBL, apresentaram efeitos opostos na maioria dos tratamentos. Nossos resultados mostraram que injeções bilaterais de DOI, no NTS, reduziram a ingestão de água induzida por injeções icv de ANG II, mas injeções bilaterais do antagonista, metisergida, no NTS não produziu qualquer efeito na ingestão de água e sódio induzida por injeções icv de ANG II. Esses resultados novamente sugerem que a serotonina não possui um efeito tônico no controle da ingestão de água induzida por injeção icv de ANG II e que a ativação dos receptores 5-HT_{2A/2C} no NTS ativa o mecanismo inibitório para ingestão de água induzida por injeção icv de ANG II no NTS.

Estudos de Ohman e Johnson (1989) mostraram um aumento da ingestão de água induzida por injeções icv de ANG II após lesões eletrolíticas da AP/NTS e do NPBL, sugerindo que a AP/NTS e NPBL estão envolvidos na inibição da ingestão de água induzida por ANG II, porém, não se sabia qual o neurotransmissor envolvido nesta via. Nossos resultados sugerem que a serotonina pode ser um possível neurotransmissor envolvido nesta via NTS-NPBL.

5.3 Receptores adrenérgicos α_2 do NTS

Nossos resultados também mostraram que injeções bilaterais do agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, moxonidina, no NTS não produziu alteração na ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M (desidratação intracelular), sugerindo que os receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos do NTS não participam da ingestão de água durante a desidratação intracelular. Estudos imunohistoquímicos demonstraram que o NTS é uma região com muitos neurônios adrenérgicos e que 40 % destes neurônios se projetam para áreas envolvidas com o controle hidroeletrolítico na ponte (NPBL) e áreas prosencefálicas (OSF e hipotálamo) (MICELI et al., 1987, DAY e SIBBALD, 1988, HOCHSTENBACH e CIRIELLO, 1994, HERBERT e FLUGGE, 1995, CIRIELLO et al., 1996, GEERLING e

LOEWY, 2007, RINAMAN, 2010, 2011). Estudos de Andrade e colaboradores (2006) mostraram que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, com moxonidina, no NPBL aumenta a ingestão de sódio hipertônico, mas não a ingestão de água, induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M sugerindo a existência de um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de sódio no NPBL que é desativado pela moxonidina. No entanto, em nossos experimentos não avaliamos a ingestão de sódio, assim, não sabemos qual o envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos do NTS sobre esta ingestão. Desta forma, mais estudos deverão ser realizados para esclarecer esta questão. Ainda no trabalho de Andrade e colaboradores (2006) foi demonstrado que injeções bilaterais de moxonidina no NPBL de animais saciados e não tratados com sobrecarga ig de NaCl 2 M não apresentaram alterações na ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2006). Em nossos experimentos também não avaliamos o efeito da injeção bilateral de moxonidina no NTS de animais saciados e normovolêmicos.

Injeções bilaterais de moxonidina no NTS comissural de animais saciados e normovolêmicos promoveram hipotensão e bradicardia (TOTOLA et al., 2013), o que poderia facilitar a ingestão de água induzida por desidratação intracelular, no entanto, não verificamos aumento da ingestão de água após este tratamento em nossos animais. Observamos que os animais que receberam sobrecarga ig de NaCl 2 M tiveram um aumento da PAM sem alterações da FC, assim, pode ser que a resposta de queda da PAM e bradicardia da moxonidina no NTS tenha sido mascarada pelo aumento da PAM causado pela sobrecarga ig de NaCl 2 M e desta forma não verificamos alterações na ingestão de água e sódio induzido por depleção de sódio.

6 Conclusão

Os resultados demonstram que os receptores gabaérgicos $GABA_A$ e serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C}, mas não adrenérgicos α_2 /imidazólicos, do NTS podem modificar mecanismos inibitórios que participam do controle da ingestão de água induzida por desidratação intracelular (gavagem NaCl 2 M) e que os receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} do NTS participam do controle da ingestão de água induzida por injeção central de ANG II.

7 Referências

- ADACHI, A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. *JAutonNervSyst* 10:287-293, 1984.
- ANDRADE-FRANZE, G.M.; ANDRADE, C.A.; DE LUCA, L.A., JR.; DE PAULA, P.M.; COLOMBARI, D.S.; MENANI, J.V. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. *Brain research* 1332:57-64, 2010a.
- ANDRADE-FRANZE, G.M.; ANDRADE, C.A.; DE LUCA, L.A., JR.; DE PAULA, P.M.; MENANI, J.V. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. *Neuroscience* 165:633-641, 2010b.
- ANDRADE, C.A.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V. Activation of alpha₂-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neuroscience* 129:25-34, 2004.
- ANDRADE, C.A.; DE LUCA, L.A., JR.; COLOMBARI, D.S.; MENANI, J.V. Alpha₂-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. *Neuroscience* 142:21-28, 2006.
- ANDRADE, C.A.; MARGATHO, L.O.; ANDRADE-FRANZE, G.M.; DE LUCA, L.A., JR.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MENANI, J.V. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. *Neuroscience* 208:69-78, 2012.
- ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, L.B.; MARTINEZ, G.; SILVA, D.C.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V. Involvement of forebrain imidazoline and alpha(2)-adrenergic receptors in the antidipsogenic response to moxonidine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1009:262-264, 2003.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K.; CASTRO, M.; DE LUCA, L.A., JR.; VIVAS, L.M.; MENANI, J.V. Regulação do Balanço Hidroeletrólítico. In Guanabara Koogan (ed.) *Fisiologia 3ª Edição*, p.1119-1136, 2008.
- BATTEN, T.F.; GAMBOA-ESTEVEZ, F.O.; SAHA, S. Evidence for peptide co-transmission in retrograde- and anterograde-labelled central nucleus of amygdala neurones projecting to NTS. *Auton Neurosci* 98:28-32, 2002.
- BHUIYAN, M.E.; WAKI, H.; GOURAUD, S.S.; TAKAGISHI, M.; CUI, H.; YAMAZAKI, T.; KOHSAKA, A.; MAEDA, M. Complex cardiovascular actions of alpha-adrenergic receptors expressed in the nucleus tractus solitarii of rats. *Experimental physiology* 94:773-784, 2009.
- BLANCH, G.T.; FREIRIA-OLIVEIRA, A.H.; COLOMBARI, E.; MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S. Lesions of the commissural subnucleus of the nucleus of the solitary tract increase isoproterenol-induced water intake. *BrazJMedBiolRes* 40:1121-1127, 2007.
- BLANCH, G.T.; FREIRIA-OLIVEIRA, A.H.; MURPHY, D.; PAULIN, R.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; COLOMBARI, E.; MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 304:R531-R542, 2013.

- BOOTH, R.E.; JOHNSON, J.P.; STOCKAND, J.D. Aldosterone. *Advances in physiology education* 26:8-20, 2002.
- BOURQUE, C.W.; OLIET, S.H. Osmoreceptors in the central nervous system. *AnnuRevPhysiol* 59:601-619, 1997.
- BOWERY, N.G.; HUDSON, A.L.; PRICE, G.W. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20:365-383, 1987.
- CALLERA, J.C.; BONAGAMBA, L.G.; NOSJEAN, A.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B.H. Activation of GABAA but not GABAB receptors in the NTS blocked bradycardia of chemoreflex in awake rats. *The American journal of physiology* 276:H1902-1910, 1999.
- CALLERA, J.C.; BONAGAMBA, L.G.; NOSJEAN, A.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B.H. Activation of GABA receptors in the NTS of awake rats reduces the gain of baroreflex bradycardia. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 84:58-67, 2000.
- CALLERA, J.C.; COLOMBARI, E.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V. The bradycardic and hypotensive responses to serotonin are reduced by activation of GABAA receptors in the nucleus tractus solitarius of awake rats. *BrazJMedBiolRes* 38:1123-1131, 2005a.
- CALLERA, J.C.; OLIVEIRA, L.B.; BARBOSA, S.P.; COLOMBARI, D.S.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. *Neuroscience* 134:725-735, 2005b.
- CATELLI, J.M.; GIAKAS, W.J.; SVED, A.F. GABAergic mechanisms in nucleus tractus solitarius alter blood pressure and vasopressin release. *Brain research* 403:279-289, 1987.
- CIRIELLO, J.; ROSAS-ARELLANO, M.P.; SOLANO-FLORES, L.P. Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract. *Brain research* 726:227-232, 1996.
- COLOMBARI, D.S.; MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *AmJPhysiol* 271:R1470-R1476, 1996.
- COLOMBARI, E.; SATO, M.A.; CRAVO, S.L.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R., JR.; LOPES, O.U. Role of the medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* 38:549-554, 2001.
- COTTLE, M.K. Degeneration Studies of Primary Afferents of Ixth and Xth Cranial Nerves in the Cat. *The Journal of comparative neurology* 122:329-345, 1964.
- DAVID, R.B.; RONCARI, C.F.; LAUAR, M.R.; VENDRAMINI, R.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR. Sodium intake, brain c-Fos protein and gastric emptying in cell-dehydrated rats treated with methysergide into the lateral parabrachial nucleus. *Physiology & behavior* 151:111-120, 2015.
- DAY, T.A.; SIBBALD, JR. Solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells via adrenergic afferents. *The American journal of physiology* 254:R711-716, 1988.
- DE GOBBI, J.I.F.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Res* 880:131-138, 2000.

- DE LUCA, L.A., JR.; PEREIRA-DERDERIAN, D.T.; VENDRAMINI, R.C.; DAVID, R.B.; MENANI, J.V. Water deprivation-induced sodium appetite. *Physiology & behavior* 100:535-544, 2010.
- DE LUCA, L.A., JR.; BARBOSA, S.P.; MENANI, J.V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience* 121:1055-1061, 2003.
- DE OLIVEIRA, L.B.; CALLERA, J.C.; DE LUCA, L.A., JR.; COLOMBARI, D.S.; MENANI, J.V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain research bulletin* 73:238-247, 2007.
- DE OLIVEIRA, L.B.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V. Moxonidine and central alpha2 adrenergic receptors in sodium intake. *Brain research* 993:177-182, 2003.
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological reviews* 78:583-686, 1998.
- FREIRIA-OLIVEIRA, A.H.; BLANCH, G.T.; PEDRINO, G.R.; CRAVO, S.L.; MURPHY, D.; MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S. Catecholaminergic neurons in the commissural region of the nucleus of the solitary tract modulate hyperosmolality-induced responses. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 309:R1082-1091, 2015.
- GALAVARNA, O.; DE LUCA, L.A., JR.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain research bulletin* 28:89-98, 1992.
- GASPARINI, S.; GOMIDE, J.M.; ANDRADE-FRANZE, G.M.; TOTOLA, L.T.; DE LUCA, L.A., JR.; COLOMBARI, D.S.; DE PAULA, P.M.; MOREIRA, T.S.; MENANI, J.V. Facilitation of sodium intake by combining noradrenaline into the lateral parabrachial nucleus with prazosin peripherally. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 111:111-119, 2013.
- GAUDIN-CHAZAL, G.; PORTALIER, P.; BARRIT, M. C.; PUIZILLOUT, J. J. Serotonin-like immunoreactivity in paraffin-sections of the nodose ganglia of the cat. *Neurosci. Lett.* 33:169-172, 1982.
- 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. *The Journal of comparative neurology* 504:379-403, 2007.
- GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews Neuroscience* 7:335-346, 2006.
- HABER, E. George C. Griffith lecture. The role of renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. *Circulation* 54:849-861, 1976.
- HABERICH, F.J. Osmoreception in the portal circulation. *FedProc* 27:1137-1141, 1968.
- HALSELL, C.B.; TRAVERS, S.P.; TRAVERS, J.B.; Ascending and descending projections from the rostral nucleus of the solitary tract originate from separate neuronal populations. *Neuroscience* 72:185-197, 1996.
- HERBERT, H.; FLUGGE, G. Distribution of alpha 2-adrenergic binding sites in the parabrachial complex of the rat. *Anatomy and embryology* 192:507-516, 1995.
- 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. *JComp Neurol* 293:540-580, 1990.

- HOCHSTENBACH, S.L.; CIRIELLO, J. Effects of plasma hypernatremia on nucleus tractus solitarius neurons. *The American journal of physiology* 266:R1916-1921, 1994.
- HOSFORD, P.S.; MILLAR, J.; RAMAGE, A.G. Cardiovascular afferents cause the release of 5-HT in the nucleus tractus solitarii; this release is regulated by the low-(PMAT) not the high-affinity transporter (SERT). *J Physiol.* 593(7):1715-29, 2015.
- HOSOMI, H.; MORITA, H. Hepatorenal and hepatointestinal reflexes in sodium homeostasis. *News Physiological Science* 11:103-107, 1996.
- JALOWIEC, J.E. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. *Behavioral biology* 10:313-327, 1974.
- JOHNSON, A.K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Medicine and science in sports and exercise* 39:1388-1400, 2007.
- JOHNSON, A.K.; CUNNINGHAM, J.T.; THUNHORST; R.L. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 23:183-191, 1996.
- JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Frontiers in neuroendocrinology* 18:292-353, 1997.
- KIMURA, E.H.; OLIVEIRA, L.B.; COLOMBARI, D.S.; DE LUCA, L.A., JR.; MENANI, J.V.; CALLERA, J.C. Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA(A) receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus. *Brain research* 1190:86-93, 2008.
- KRALY, F.S.; KIM, Y.M.; TRIBUZIO, R.A. Renal nerve transection inhibits drinking elicited by eating and by intragastric osmotic loads in rats. *Physiol Behav* 58:1129-1136, 1995.
- KVETNANSKY, R.; SABBAN, E.L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89:535-606, 2009.
- LANCA, A.J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. *Neuroscience* 14:1117-1126, 1985.
- LASITER, P.S.; KACHELE, D.L. Organization of GABA and GABA-transaminase containing neurons in the gustatory zone of the nucleus of the solitary tract. *Brain Res Bull* 21:623-636, 1988
- LORENZ, W.; LOMASNEY, J.W.; COLLINS, S.; REGAN, J.W.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J.; Expression of three alpha 2-adrenergic receptor subtypes in rat tissues: implications for alpha 2 receptor classification. *Molecular pharmacology* 38:599-603, 1990.
- MACHADO, B.H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 940:179-196, 2001.
- MACHADO, B.H.; BONAGAMBA, L.G. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain research* 576:131-138, 1992.
- MALEY, B.E. Immunohistochemical localization of neuropeptides and neurotransmitters in the nucleus solitarius. *Chen Senses* 21:367-376, 1996.

- MEELEY, M.P.; RUGGIERO, D.A.; ISHITSUKA, T.; REIS, D.J. Intrinsic gamma-aminobutyric acid neurons in the nucleus of the solitary tract and the rostral ventrolateral medulla of the rat: an immunocytochemical and biochemical study. *Neuroscience letters* 58:83-89, 1985.
- MENANI, J.V.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA, L.A., JR.; DE GOBBI, J.I.; JOHNSON, A.K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 282:R837-841, 2002.
- MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S.; BELTZ, T.G.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Res* 801:29-35, 1998a.
- MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *AmJPhysiol* 274:R555-R560, 1998b.
- MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR.; JOHNSON, A.K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 306:R201-210, 2014.
- MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *AmJPhysiol* 269:R1044-R1049, 1995.
- MENANI, J.V.; SATO, M.A.; HAIKEL, L.; VIEIRA, A.A.; DE ANDRADE, C.A.; DA SILVA, D.C.; RENZI, A.; DE LUCA, L.A., JR. Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain research bulletin* 49:273-279, 1999.
- MENANI, J.V.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *AmJPhysiol* 270:R162-R168, 1996.
- MENEZES, M.F.; BARBOSA, S.P.; ANDRADE, C.A.; MENANI, J.V.; DE PAULA, P.M. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Res* 1372:49-58, 2011.
- MERAHI, N.; ORER, H.S.; LAPORTE, A.M.; GOZLAN, H.; HAMON, M.; LAGUZZI, R. Baroreceptor reflex inhibition induced by the stimulation of serotonin₃ receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience* 46:91-100, 1992.
- MICELI, M.O.; POST, C.A.; VAN DER KOOY, D. Catecholamine and serotonin colocalization in projection neurons of the area postrema. *Brain research* 412:381-385, 1987.
- NOZAKI, P.N.; PEREIRA, D.T.; MOURA, F.V.; MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A. Ingestion of hypertonic NaCl vs. palatable drinks by sodium-depleted rats. *Physiology & behavior* 75:443-448, 2002.
- NOSJEAN, A.; COMPOINT, C.; BUISSERET-DELMAS, C.; ORER, H. S.; MERAHI, N.; PUIZILLOUT, J. J.; LAGUZZI, R. Serotonergic projections from the nodose ganglia to the nucleus tractus solitarius: An immunohistochemical and double labeling study in the rat. *Neurosci. Lett.* 114:22-26, 1990
- OGIHARA, C.A.; SCHOORLEMMER, G.H.; COLOMBARI, E.; SATO, M.A. Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius. *BrazJMedBiolRes* 42:561-566, 2009.

- OHMAN, L.E.; JOHNSON, A.K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *AmJPhysiol* 256:R264-R269, 1989.
- PALKOVITS, M.; ZABORSZKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. *ProgBrain Res* 47:9-34, 1977.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*: Academic Press, Incorporated, 1998.
- PEREIRA, D.T.; VENDRAMINI, R.C.; DAVID, R.B.; NOZAKI, P.N.; MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav* 76:501-505, 2002.
- PICKEL, V.M.; CHAN, J.; MILNER, T.A. Cellular substrates for interactions between neurons containing phenylethanolamine N-methyltransferase and GABA in the nuclei of the solitary tracts. *The Journal of comparative neurology* 286:243-259, 1989.
- PICKEL, V.M.; VAN BOCKSTAELE, E.J.; CHAN, J.; CESTARI, D.M. Amygdala efferents form inhibitory-type synapses with a subpopulation of catecholaminergic neurons in the rat Nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol* 362:510-523, 1995.
- RICARDO, J.A.; KOH, E.T. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1-26, 1978.
- RINAMAN, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain research* 1350:18-34, 2010.
- RINAMAN, L. Hindbrain noradrenergic A2 neurons: diverse roles in autonomic, endocrine, cognitive, and behavioral functions. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 300:R222-235, 2011.
- ROWLAND, N.E.; FREGLY, M.J. Repletion of acute sodium deficit in rats drinking either low or high concentrations of sodium chloride solution. *The American journal of physiology* 262:R419-425, 1992.
- SAHA, S.; BATTEN, T.F.; HENDERSON, Z. A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. *Neuroscience* 99:613-26, 2000.
- SAKAI, R.R.; FINE, W.B.; EPSTEIN, A.N.; FRANKMANN, S.P. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behavioral neuroscience* 101:724-731, 1987.
- SAKAI, R.R.; FRANKMANN, S.P.; FINE, W.B.; EPSTEIN, A.N. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. *Behavioral neuroscience* 103:186-192, 1989.
- SAKAI, R.R.; MA, L.Y.; ZHANG, D.M.; MCEWEN, B.S.; FLUHARTY, S.J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. *Neuroendocrinology* 64:425-429, 1996.
- SAPER, C.B.; REIS, D.J.; JOH, T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *NeurosciLett* 42:285-291, 1983.

- SATO, M.A.; YADA, M.M.; RENZI, A.; CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A.; MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al] 29:1663-1666, 1996.
- SCHAFFAR, N.; KESSLER, J. P.; BOSLER, O.; JEAN, A. Central serotonergic projections to the nucleus tractus solitarii: Evidence from a double labelling study in the rat. *Neuroscience* 26:951–958, 1988.
- SCHREIHOFFER, A.M.; STRICKER, E.M.; SVED, A.F. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 279:R239-R247, 2000.
- STANTON, B.A.; KOEPPEN, B.M. Controle da osmolaridade e do volume dos fluidos corporais. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. *Fisiologia 6ª Edição*. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, (2009), p.597-620.
- SEVOZ, C.; HAMON, M.; LAGUZZI, R. Medullary pathways of cardiovascular responses to 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor stimulation in the rat nucleus tractus solitarius. *Neuroreport* 7:1965-1969, 1996.
- SPIELMAN, W.S.; DAVIS, J.O. The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat. *Circulation research* 35:615-624, 1974.
- STEINBUSCH, H.W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6:557-618, 1981.
- STRICKER, E.M.; CALLAHAN, J.B.; HUANG, W.; SVED, A.F. Early osmoregulatory stimulation of neurohypophyseal hormone secretion and thirst after gastric NaCl loads. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 282:R1710-R1717, 2002.
- STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *RegulPept* 66:83-85, 1996.
- TER HORST, G. J.; STREEFLAND, C. Ascending projections of the solitary tract nucleus. In: BARRACO, I. R. A. (Ed.). *Nucleus of the solitary tract*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994.p.93-103.
- THOR, K. B.; HELKE, C. J. Serotonin- and substance P-containing projections to the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Comp. Neurol.* 265:275–293, 1987.
- THOR, K. B., HILL, K. B., HARROD, C., AND HELKE, C. J. Immunohistochemical and biochemical analysis of serotonin and substance P colocalisation in the nucleus tractus solitarii and associated afferent ganglia of the rat. *Synapse* 2:225–231, 1988.
- TOTOLA, L.T.; ALVES, T.B.; TAKAKURA, A.C.; FERREIRA-NETO, H.C.; ANTUNES, V.R.; MENANI, J.V.; COLOMBARI, E.; MOREIRA, T.S. Commissural nucleus of the solitary tract regulates the antihypertensive effects elicited by moxonidine. *Neuroscience* 250:80-91, 2013.
- VAN DER KOOY, D.; KODA, L.Y. Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat. *JComp Neurol* 219:328-338, 1983.
- VENDRAMINI, R.C.; PEREIRA, D.T.; BORELLA, T.L.; MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR. Damage to the central amygdala produces differential encephalic c-fos expression in the water deprivation-partial rehydration protocol. *Brain research* 1304:80-89, 2009.

- VERBALIS, J.G. Disorders of body water homeostasis. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism 17:471-503, 2003.
- WOLF, W.A.; KUHN, D.M.; LOVENBERG, W. Blood pressure responses to local application of serotonergic agents in the nucleus tractus solitarii. European journal of pharmacology 69:291-299, 1981.
- YADA, M.M.; DE PAULA, P.M.; MENANI, J.V.; DE LUCA, L.A., JR. Central alpha-adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. PharmacolBiochemBehav 57:137-143, 1997a.
- YADA, M.M.; DE PAULA, P.M.; MENANI, J.V.; RENZI, A.; CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A.; DE LUCA, L.A., JR. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. Brain ResBull 42:205-209, 1997b.