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

AUGUSTO ANESIO

ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS CENTRAIS
NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO

ARARAQUARA

2017

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

AUGUSTO ANESIO

ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS CENTRAIS
NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO

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

Orientador: José Vanderlei Menani

ARARAQUARA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato Augusto Anasio, realizada em 10/07/2017:

Prof. Dr. José Vanderlei Menari
UNESP

Prof. Dr. João Carlos Calero
UNESP

Prof. Dr. Laércio Antônio de Lucas Junior
UNESP

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que são privados das oportunidades, sem as quais os méritos e as potencialidades não passam de uma semente em um grande deserto.

Aos meus pais, Célia e Amarildo pela confiança nas transformações que o conhecimento opera nas pessoas e no mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao milagre da vida, que alguns podem entender como Deus, o qual permite nossa existência, nossa consciência e a realização desta contínua experimentação de nós mesmos na qual está contido o prazer de viver.

Aos meus pais Celia e Amarildo que sempre apoiaram incondicionalmente minhas escolhas, dando suporte à minha procura pela felicidade.

Ao meu irmão Lucas que sempre se mostrou um grande amigo e proporcionou inúmeros aprendizados.

Aos meus avós Maria, Guerino e Moacir pela demonstração de amor capaz de realizar grandes transformações.

Ao professor Dr. José Vanderlei Menani, pela orientação, confiança, dedicação e incansável disposição em transmitir seu conhecimento.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos.

À Silas Pereira Barbosa pela paciência, dedicação e participação direta no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara Silvana A. D. Malavolta, Carla Molina, Mikail D. dos Santos e Ana V. de Oliveira por todo o suporte.

À Fernanda Cardoso pelo companheirismo, aprendizado, carinho e paciência.

Aos colegas e amigos do laboratório e do Programa de Pós-graduação pelas boas conversas, conselhos, auxílios e por tornarem estes anos de muito trabalho mais fáceis.

Aos companheiros de república, pelos conselhos, amizade, parceria, tolerância e boas risadas.

À todos aqueles que cruzaram meu caminho e atuaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, sem os quais não seria possível sua realização, meu profundo respeito, agradecimento e esperança de que, cada vez menos, seja necessária sua utilização.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e suporte na realização deste trabalho.

*“De todas as coisas seguras, a
mais segura é a dúvida.”*

(Bertolt Brecht)

RESUMO

A ingestão de água e a ingestão de sódio são comportamentos fundamentais para a homeostase dos líquidos corporais. A manifestação destes comportamentos é controlada por um circuito neural constituído por mecanismos facilitatórios e inibitórios os quais são constantemente modulados por informações relativas aos líquidos corporais. Importantes mecanismos inibitórios para a ingestão de água e especialmente para a ingestão de sódio localizam-se no núcleo parabraquial lateral (NPBL), uma estrutura pontina. Sabe-se que os mecanismos inibitórios do NPBL são controlados por diversos neurotransmissores, alguns aumentando e outros diminuindo a ação deste núcleo sobre a ingestão de sódio. A ativação GABAérgica ou α -2 adrenérgica no NPBL reduz a inibição provocando aumentos da ingestão de sódio em ratos sem nenhum tratamento adicional ou naqueles com injeções i.p. de pilocarpina, respectivamente. Nos dois casos, a ingestão de sódio depende de mecanismos facilitatórios ativados por receptores muscarínicos centrais. Apesar de se conhecer a importância de mecanismos colinérgicos centrais na facilitação da ingestão de sódio quando os mecanismos inibitórios do NPBL encontram-se desativados, não se sabe quais são os tipos de receptores muscarínicos que participam desta facilitação. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi investigar o envolvimento dos receptores muscarínicos M_1 e M_2 na facilitação da ingestão de sódio em ratos tratados com moxonidina (agonista α -2 adrenérgico) no NPBL combinada com injeções i.p. de pilocarpina (agonista muscarínico não seletivo) bem como em ratos tratados com muscimol no NPBL. Ratos Holtzman (280-320 g) com cânulas-guia de aço inoxidável implantadas no ventrículo lateral (VL) e bilateralmente no NPBL foram usados. Injeções intraperitoneais de pilocarpina (0,1 mg/100 g de peso corporal) em ratos tratados com salina i.c.v. e veículo no NPBL não produziram ingestão significativa de NaCl 0,3 M ou água em comparação com o tratamento controle. No entanto, ratos tratados com injeções i.p. de pilocarpina combinadas com moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ L) no NPBL apresentaram ingestão

significativa de de NaCl 0,3 M ($12,0 \pm 4,8$ mL/2 h, vs. veículo no NPBL: $0,5 \pm 0,2$ mL/2 h) e água ($5,3 \pm 1,8$ mL/2 h, vs. veículo no NPBL: $1,8 \pm 0,6$ mL/2 h). Injeções i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M₁, 1 nmol/1 µL) reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M ($2,6 \pm 1,1$ mL/2 h) e água ($0,8 \pm 0,4$ mL/ 2 h) em ratos tratados com pilocarpina i.p. + moxonidina no NPBL. Injeções i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M₂, 50 nmol/1 µL) também foram capazes de reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M ($5,7 \pm 2,6$ mL/2 h), e água ($2,7 \pm 1,3$ mL/2 h), em ratos tratados com pilocarpina i.p. + moxonidina no NPBL. Ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol (0,5 ηmol/0,2 µL) no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina também apresentaram significativa ingestão de NaCl 0,3 M ($34,1 \pm 14,5$ mL/4 h, vs. salina no NPBL: $0,2 \pm 0,1$ ml/4 h) e água ($7,1 \pm 2,3$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,1 \pm 0,1$ ml/4 h). Pirenzepina (100 ηmol/1 µL) injetada i.c.v. reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M ($8,2 \pm 6,3$ ml/4 h) e água ($2,4 \pm 1,8$ ml/4 h) em ratos tratados com muscimol injetado no NPBL. Por outro lado, injeções i.c.v. de pirenzepina na dose de 1 ηmol/1 µL não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por muscimol no NPBL ($20,8 \pm 5,2$ mL/4 h). Porém, injeções de pirenzepina i.c.v. na dose de 1 ηmol/1 µL reduziram a ingestão de água induzida por muscimol injetado no NPBL ($7,5 \pm 1,8$ ml/ 4 h vs. salina i.c.v. + muscimol no NPBL: $14,2 \pm 4,6$ ml/4 h). Metoctramina (antagonista muscarínico M₂) na dose de 50 ηmol/1 µL injetada i.c.v. também reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M ($11,4 \pm 5,2$ ml/4 h; $p < 0,05$) e água ($1,4 \pm 0,6$ ml/4 h; $p < 0,05$) em ratos tratados com muscimol injetado no NPBL. A injeção i.c.v de pirenzepina (100 ηmol/1 µL) reduziu a ingestão de sacarose 0,06 M ($4,6 \pm 0,7$ mL/2 h, vs. salina: $12,9 \pm 1,1$ mL/2 h; $p < 0,05$) sem influenciar a ingestão de água ($0,07 \pm 0,04$ mL/2 h, vs. salina: $0,14 \pm 0,05$ mL/2 h; $p < 0,05$). Por outro lado, a injeção i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M₂, 50 ηmol/1 µL) não modificou a ingestão de sacarose 0,06 M ($9,2 \pm 2,9$ mL/2 h, vs. salina: $9,6 \pm 2,0$ mL/2 h, $p > 0,05$) tampouco sobre a ingestão de água ($0,15 \pm 0,06$ mL/2 h, vs. salina: $0,18 \pm 0,05$ mL/2 h; $p > 0,05$). Os resultados sugerem que a pilocarpina atua em receptores M₂ e

talvez M_1 centrais para facilitar a ingestão de NaCl 0,3 M e água, quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão desativados com moxonidina. Ao mesmo tempo, os resultados indicam que a ativação de receptores M_2 e talvez M_1 centrais também é importante para a ingestão de NaCl 0,3 M e água quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão desativados com muscimol. Porém, os efeitos das injeções i.c.v. de pirenzepina (100 η mol/1 μ L) na ingestão de NaCl 0,3 M e água podem ser inespecíficos, já que estas injeções também reduziram a ingestão de sacarose 0,06 M.

Palavras-chave: NPBL, apetite ao sódio, pilocarpina, muscimol, moxonidina, receptores muscarínicos.

ABSTRACT

Water and sodium intake are fundamental behaviors for body fluid homeostasis. These behaviors are controlled by a neural circuitry involving facilitatory and inhibitory mechanisms, which are modulated by signals activated by changes in body fluid volume and composition. Important inhibitory mechanisms for water intake and particularly for sodium intake are located in the lateral parabrachial nucleus (LPBN), a pontine structure. It is known that LPBN inhibitory mechanisms are controlled by several neurotransmitters, some increasing, others reducing the action of this nucleus on sodium intake. GABAergic or α -2 adrenergic activation in the LPBN reduces the inhibition increasing sodium intake in rats without additional treatment or those treated with cholinergic agonists, respectively. In both cases, sodium intake depends on facilitatory mechanisms activated by central muscarinic receptors. Despite the importance of the central cholinergic mechanisms for the facilitation of sodium intake when the inhibitory mechanisms of the LPBN are deactivated, it is unknown which are the muscarinic receptors types involved in this facilitation. Thus, the aim of the present study was to investigate the involvement of the M₁ and M₂ muscarinic receptors for the facilitation of sodium intake in rats treated with moxonidine (α -2 adrenergic agonist) into the LPBN combined with i.p. injections of pilocarpine (nonselective muscarinic agonist), as well as, in rats treated with bilateral injections of muscimol into the LPBN. Male Holtzman rats with stainless steel cannulas implanted bilaterally in the LPBN and unilaterally in the lateral ventricle were used. Injections of pilocarpine (0.1 mg/100 g of body weight) i.p. in rats treated with saline i.c.v. and vehicle into LPBN produced no significant 0.3 M NaCl or water intake. However, rats treated with i.p. pilocarpine combined with moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ L) into LPBN ingested significant amount of 0.3 M NaCl (12.0 ± 4.8 mL/2 h, vs. vehicle into LPBN: 0.4 ± 0.2 mL/2 h) and water (5.3 ± 1.8 mL/2 h, vs. vehicle into LPBN: 1.8 ± 0.6 mL/2 h). Pirenzepine (M₁ muscarinic

antagonist, 1 nmol/1 μ L) injected i.c.v. reduced 0.3 M NaCl (2.6 ± 1.1 mL/2 h) and water (0.8 ± 0.4 mL/ 2 h) intake in rats treated with pilocarpine i.p. + moxonidine into LPBN. Injections of metoctramine (M_2 muscarinic antagonist, 50 nmol/1 μ L) i.c.v. also reduced 0.3 M NaCl (5.7 ± 2.6 mL/2 h) and water (2.7 ± 1.3 mL/2 h) intake in rats treated with i.p. pilocarpine + moxonidine into LPBN. Rats treated with bilateral injections of muscimol (0.5 η mol/0.2 μ L) into LPBN combined with saline i.c.v. also ingested significant amount of 0.3 M NaCl (34.1 ± 14.5 mL/4 h, vs. saline into LPBN: 0.2 ± 0.1 ml/4 h) and water 7.1 ± 2.3 ml/4 h. vs. saline into LPBN: 0.1 ± 0.1 ml/4 h). Pirenzepine (100 η mol/1 μ L) i.c.v. reduced 0.3 M NaCl (8.2 ± 6.3 ml/4 h) and water (2.4 ± 1.8 ml/4 h) intake in rats treated with muscimol injected into LPBN. On the other hand, pirenzepine at the dose of 1 η mol/1 μ L injected i.c.v. did not modify 0.3 M NaCl intake induced by muscimol into LPBN (20.8 ± 5.2 mL/4 h). Nevertheless, i.c.v. pirenzepine injections at the dose of 1 η mol/1 μ L reduced water intake induced by muscimol injected into LPBN (7.5 ± 1.8 ml/ 4 h, vs. saline i.c.v. + muscimol into LPBN: 14.2 ± 4.6 ml/4 h). Methoctramine (50 η mol/1 μ L) injected i.c.v. reduced 0.3 M NaCl (11.4 ± 5.2 ml/4 h) and water (1.4 ± 0.6 ml/4 h) intake induced by muscimol into the LPBN. Pirenzepine injected i.c.v. at the dose of 100 η mol/1 μ L reduced 0.06 M sucrose intake (4.6 ± 0.7 mL/2 h, vs. saline: 12.9 ± 1.1 mL/2 h) without affecting water intake (0.07 ± 0.04 mL/2 h, vs. saline: 0.14 ± 0.05 mL/2 h). On the other hand, i.c.v. methoctramine injections at dose 50 η mol/1 μ L did not affect 0.06 M sucrose intake (9.2 ± 2.9 mL/2 h. vs. saline: 9.6 ± 2.0 mL/2 h), neither water intake (0.15 ± 0.06 mL/2 h, vs. saline: 0.18 ± 0.05 mL/2 h). The results suggest that pilocarpine acts on central M_2 and perhaps M_1 receptors to facilitate 0.3 M NaCl and water intake when the inhibitory mechanisms of the LPBN are deactivated with moxonidine. The results also indicate that the activation of central M_2 and perhaps M_1 receptors are also important for 0.3 M NaCl and water intake when the LPBN inhibitory mechanisms are deactivated with muscimol injected into the

LPBN. However, the effects of i.c.v. injections of pirenzepine (100 η mol/1 μ L) on 0.3 M NaCl and water intake might be non especific, because this treatment also reduced 0.06 M sucrose intake.

Keywords: LPBN, sodium appetite, pilocarpine, muscimol, moxonidine, muscarinic receptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no VL (indicado pela seta). Barra preta = 1000 μm38
- Figura 2.** Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no NPBL (indicado pelas setas). Barra preta = 1000 μm39
- Figura 3.** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/ 0,2 μL) ou veículo no NPBL combinadas com pirenzepina (1 $\eta\text{mol}/1\mu\text{L}$) ou salina no VL + pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) ou salina i.p. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.41
- Figura 4.** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/ 0,2 μL) ou veículo no NPBL combinadas com metoctramina (50 $\eta\text{mol}/1\mu\text{L}$) ou salina no VL + pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) ou salina i.p. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.43
- Figura 5.** Ingestão cumulativa de água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções de pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) ou salina i.p. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.....45
- Figura 6.** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/ 0,2 μL) ou salina no NPBL combinadas com pirenzepina (100 $\eta\text{mol}/1\mu\text{L}$) ou salina no VL. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.....47
-
-

Figura 7. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/ 0,2µL) ou salina no NPBL combinadas com pirenzepina (1 ηmol/1µL) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.....48

Figura 8. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/ 0,2µL) ou salina no NPBL combinadas com metoctramina (50 ηmol/1µL) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.....50

Figura 9. Ingestão cumulativa de sacarose 0,06 M (A) e água (B) em ratos que receberam injeções de pirenzepina (100 ηmol/1µL) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.....52

Figura 10. Ingestão cumulativa de sacarose 0,06 M (A) e água (B) em ratos que receberam injeções de metoctramina (50 ηmol/1µL) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.	56
Tabela 2. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metocramina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.....	58
Tabela 3. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina.	60
Tabela 4. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina.	61
Tabela 5. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metocramina ou salina.	63
Tabela 6. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.	65
Tabela 7. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metocramina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.....	67

Tabela 8. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina.....69

Tabela 9. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metoctramina ou salina. 71

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVO	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Cirurgia	30
3.3. Drogas.....	31
3.4. Injeções centrais.....	32
3.5. Testes de ingestão de NaCl 0,3 M e água.....	32
3.6. Testes de ingestão de sacarose 0,06 M e água	32
3.7. Análise histológica.....	33
3.8. Análise estatística.....	33
3.9. Protocolos experimentais.....	33
3.9.1. Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela combinação de pilocarpina i.p. e moxonidina bilateralmente no NPBL em ratos tratados com injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos.....	33
3.9.2. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos.....	34
3.9.3. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos com injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos	35
3.9.4. Ingestão de água induzida por sucessivas injeções i.p. de pilocarpina.....	36

4. RESULTADOS.....	37
4.1. Análise histológica.....	37
4.2. Ingestão de NaCl 0,3 M e água e induzida por pilocarpina i.p. combinada com moxonidina bilateralmente no NPBL em ratos tratados com pirenzepina i.c.v.....	40
4.3. Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por pilocarpina i.p. combinada com moxonidina bilateralmente no NPBL em ratos tratados com metoctramina i.c.v.....	42
4.4. Ingestão de água induzida por sucessivas injeções i.p. de pilocarpina.....	44
4.5. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e injeções i.c.v. de pirenzepina.....	46
4.6. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e injeções i.c.v. de metoctramina.....	49
4.7. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos tratados com pirenzepina i.c.v.....	51
4.8. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos tratados com metoctramina i.c.v.....	53
4.9. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de pirenzepina i.c.v.....	55
4.10. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de metoctramina i.c.v.....	57
4.11. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções de pirenzepina i.c.v.....	599
4.12. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções de metoctramina i.c.v.....	62

4.13. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de pirenzepina i.c.v.....	64
4.14. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de metoctramina i.c.v.....	66
4.15. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL e injeções i.c.v. de pirenzepina.	68
4.16. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL e injeções i.c.v. de metoctramina.....	70
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÃO	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. INTRODUÇÃO

Dentre os constituintes mais abundantes do organismo humano a água se destaca, contribuindo com cerca de 60% da massa corporal, podendo este valor ser variável de acordo com sexo, idade e quantidade de gordura corporal. De um ponto de vista conceitual, todo o volume de água do corpo humano se distribui entre os compartimentos de líquido intracelular (LIC), correspondente ao volume do interior de todas as células, e de líquido extracelular (LEC), correspondente ao volume intravascular mais o volume intersticial. Enquanto o LIC comporta 2/3 do volume de água corporal, o LEC acomoda o 1/3 restante (VERBALIS, 2003).

A separação entre LIC e LEC é feita pela membrana plasmática, a qual, por sua característica semipermeável e pela atividade de seus transportadores, mantém estes dois compartimentos com constituições distintas do ponto de vista dos solutos. Uma das diferenças mais marcantes entre LIC e LEC é relativa à concentração dos íons Na^+ e K^+ . Enquanto o LEC apresenta altas concentrações de Na^+ e baixas concentrações de K^+ observa-se o oposto no LIC (BOURQUE, 2008; VERBALIS, 2003).

A quantidade de água e eletrólitos em cada um dos compartimentos corporais determina a osmolaridade e conseqüentemente a pressão osmótica destes compartimentos. Apesar de apresentarem constituições diferentes, em situações normais, a pressão osmótica no LIC é equivalente ou muito próxima àquela no LEC, permitindo a distribuição de água entre LIC e LEC na configuração de 2/3 e 1/3, respectivamente. Dada a característica semipermeável da membrana celular, desequilíbrios entre as pressões osmóticas causam fluxos de água para o compartimento com maior osmolaridade até que o equilíbrio seja reestabelecido. Fluxos de água através da membrana celular provocados pelas alterações anormais das pressões osmóticas do LIC e LEC podem ser bastante prejudiciais, levando a perturbações metabólicas e

cardiovasculares além de problemas neurológicos que incluem confusão, paralisia, crises convulsivas e coma (BOURQUE, 2008; BOURQUE AND; OLIET, 1997; VERBALIS, 2003)

Vários são os eletrólitos com influência sobre a pressão osmótica. No entanto, o sódio, principal determinante da osmolaridade do LEC, é de fundamental importância, pois pequenas variações em sua concentração podem promover significativos deslocamentos de água entre LIC e LEC. Dessa maneira, as concentrações deste íon são ativamente mantidas dentro de uma estreita faixa de variação. As concentrações de sódio e de outros eletrólitos nos fluídos corporais são determinadas pela diferença entre os ganhos e as perdas destes solutos, bem como pelos ganhos e perdas de água, constituindo o balanço hidroeletrólítico (MCKINLEY; JOHNSON, 2004; RONCARI et al., 2014).

Para que não ocorram perturbações das condições dos líquidos corporais os ganhos e perdas que constituem o balanço hidroeletrólítico devem ser equivalentes. Entretanto, constantemente este equilíbrio é perturbado seja pela falta de reposição ou excesso de consumo de líquidos e eletrólitos ou por perdas, as quais podem ser naturais ou decorrentes de diarreias, hemorragias ou sudorese excessiva. Frente a estas perturbações, diferentes mecanismos são ativados para promover ajustes de ingestão e excreção de água e sódio, o que normalmente permite restabelecer o balanço hidroeletrólítico do organismo (JOHNSON; EDWARDS, 1990; MCKINLEY; JOHNSON, 2004; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; RONCARI et al., 2014).

Os rins, por meio da regulação da reabsorção de água e sódio contribuem de maneira muito importante para o reestabelecimento do balanço hidroeletrólítico. Entretanto, somente esta resposta, muitas vezes não é suficiente, tornando necessária a manifestação de comportamentos capazes de repor a água e o sódio quando estão em falta no organismo.

A obtenção de água se dá pelo mecanismo da sede, uma sensação subjetiva que produz um impulso de busca por água. Por outro lado, a aquisição de sódio pode acontecer por meio do apetite ao sódio, caracterizado como uma preferência específica por substâncias salgadas. Em animais, o apetite ao sódio pode ser testado pela ingestão preferencial de solução hipertônica de NaCl, normalmente aversiva, frente a diferentes soluções.

A manifestação da sede e do apetite ao sódio é controlada por um circuito neural e depende da ação de mecanismos facilitatórios e inibitórios os quais recebem informações relativas aos líquidos corporais. Contribuindo para a maior atividade dos mecanismos facilitatórios pode-se citar o peptídeo angiotensina II (ANG-II) que atua tanto periféricamente controlando a secreção de aldosterona, como centralmente em algumas áreas como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) e o órgão subfornical (OSF) (MANGIAPANE; SIMPSON, 1980; SIMPSON; ROUTTENBERG, 1973; BRODY, 1980). Outra substância importante que atua centralmente para estimular a ingestão de sódio é a aldosterona que pode atuar tanto em áreas prosencefálicas como a amígdala ou no tronco cerebral (FORMENTI et al., 2013; SAKAI et al., 2000; KONERU et al., 2013). Por outro lado, a inibição da ingestão de sódio pode ocorrer pela ação central da ocitocina e do peptídeo atrial natriurético (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

Além das informações de caráter humoral, a ingestão de sódio também sofre influência de informações relativas à volemia e osmolaridade, produzidas a partir de baro e osmorreceptores, respectivamente. Sabe-se que aumentos da pressão arterial constituem um importante estímulo inibitório para a ingestão de sódio. Por outro lado, a estimulação de osmorreceptores, bem conhecidos como parte dos mecanismos que estimulam a ingestão de água e secreção de vasopressina, de acordo com estudos recentes, também pode atuar facilitando a ingestão de sódio (DE LUCA; BARBOSA; MENANI, 2003; RONCARI et al.,

2014). Somando-se às informações de osmo e barorreceptores, as informações de receptores gustatórios também influenciam o controle da ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2011; GASPARINI, 2013).

Uma vez integradas, as informações acima descritas influem sobre a atividade de mecanismos neurais facilitatórios e inibitórios que controlam a ingestão de água e sódio. Um importante mecanismo inibitório para o controle sobre a ingestão de água e especialmente da ingestão de sódio localiza-se no núcleo parabraquial lateral (NPBL), uma estrutura pontina, localizada dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior (PCS). O NPBL recebe projeções do núcleo do trato solitário (NTS) e da área postrema (AP), importantes sítios de integração de informações da periferia (HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; JOHNSON; THUNHORST, 1997; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014). Adicionalmente, envia projeções para áreas prosencefálicas essenciais para o controle do balanço hidroeletrolítico como o núcleo préóptico mediano, os núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo e o núcleo central da amígdala (CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984; FULWILER; SAPER, 1984; JHAMANDAS et al., 1996; JOHNSON; THUNHORST, 1997; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

Diversos estudos demonstraram que os mecanismos inibitórios do NPBL são controlados por diferentes neurotransmissores (JOHNSON; THUNHORST, 1997; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014). Sabe-se que serotonina, colecistocinina, fator liberador de corticotrofina e glutamato ativam os mecanismos inibitórios do NPBL, resultando em uma maior inibição da ingestão de sódio. Por outro lado, agonistas GABA_A, GABA_B, opióides, purinérgicos P₂ e α 2-adrenérgicos desativam tais mecanismos, reduzindo a inibição sobre a ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2001, 2009; DE OLIVEIRA; DE LUCA;

MENANI, 2008; GASPARINI et al., 2009; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; MENEZES et al., 2011).

Um importante fato acerca dos neurotransmissores que controlam os mecanismos inibitórios do NPBL é que o bloqueio de receptores serotoninérgicos, receptores de CCK e CRF e a ativação de receptores α 2-adrenérgicos e purinérgicos P_2 , manipulações que são conhecidas por reduzir a atividade inibitória do NPBL, não têm a capacidade de aumentar a ingestão de NaCl hipertônico e água em ratos saciados e normovolêmicos, não submetidos a tratamentos dipsogênicos e/ou natriorexigênicos. Entretanto, estas mesmas manipulações farmacológicas aumentam a ingestão de NaCl hipertônico e ocasionalmente a ingestão de água induzidas por depleção de sódio e pelo tratamento com injeção s.c. de furosemida e baixas doses de captopril (FURO+CAP), tratamento este que resulta em depleção de líquidos (pela ação do furosemide) com aumento de ANGII centralmente. Estes achados indicam que apenas a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL, sem a presença de algum fator facilitatório não é suficiente para induzir a ingestão de água ou NaCl hipertônico, o que sugere a interação entre mecanismos inibitórios do NPBL e mecanismos facilitatórios no controle da ingestão de água e sódio (ANDRADE et al., 2004; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2001, 2009; GASPARINI et al., 2009; MENANI; JOHNSON, 1998; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996; MENEZES et al., 2011).

De maneira oposta aos achados anteriormente descritos, CALLERA et al. (2005) demonstrou que que ratos saciados e normovolêmicos não submetidos a nenhum tratamento dipsogênico e/ou natriorexigênico que recebem injeções bilaterais de muscimol, um agonista GABA_A, no NPBL ingerem grandes quantidades de NaCl hipertônico e água. Estes resultados levantaram a possibilidade de que apenas a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL

com muscimol, sem nenhum tipo de facilitação, poderia ser suficiente para produzir ingestão de água e NaCl hipertônico. No entanto, estudos posteriores de RONCARI et al. (2010, 2011, 2014) e ASNAR et al. (2013) demonstraram que o antagonismo de receptores angiotensinérgicos AT₁ e muscarínicos, localizados no prosencéfalo e pontualmente no órgão subfornical reduz drasticamente a ingestão de água e NaCl hipertônico induzida por muscimol no NPBL, indicando o envolvimento de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos facilitatórios na ingestão de água e NaCl hipertônico quando os mecanismos inibitórios do NPBL são bloqueados com muscimol.

Somando-se aos resultados de ASNAR et al. (2013) e RONCARI et al. (2014). GASPARINI (2013) demonstrou que a injeção intraperitoneal de pilocarpina, um agonista muscarínico com ação central (BORELLA et al., 2008) combinada com injeções bilaterais de moxonidina, um agonista α 2-adrenérgico, no NPBL, induz significativa ingestão de NaCl hipertônico em ratos, o que não ocorre se os tratamentos com pilocarpina ou moxonidina forem feitos separadamente. Esses resultados indicam que em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL, a injeção i.p. de pilocarpina atua como um fator facilitatório da mesma maneira que a depleção de sódio e o tratamento com FURO + CAP. Assim, mais uma vez, sugere-se que mecanismos colinérgicos geram sinais facilitatórios que levam à ingestão de sódio quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão desativados.

A primeira evidência de que mecanismos colinérgicos poderiam facilitar a ingestão de sódio foi sugerida por MENANI et al. (2002). Tal estudo demonstrou que injeções i.c.v. de carbacol, um agonista colinérgico que tipicamente produz apenas ingestão de água, combinadas com injeções bilaterais do antagonista serotoninérgico metisergida no NPBL também estimulam a ingestão de sódio. A sugestão de que mecanismos colinérgicos estão entre aqueles que facilitam a ingestão de sódio quando os mecanismos inibitórios do NPBL estão desativados

representa uma significativa mudança na ideia clássica de que a ativação colinérgica central estimula apenas a ingestão de água e inibe a ingestão de sódio (FITTS; THUNHORST; SIMPSON, 1985, 2000). Compreendendo a ação dos mecanismos inibitórios do NPBL é possível entender por que um mecanismo facilitatório em algumas situações induz apenas ingestão de água e em outras (quando os mecanismos do NPBL estão desativados) o mesmo mecanismo também facilita a ingestão de sódio. Além disso, é particularmente importante que em algumas situações os mecanismos colinérgicos estimulem apenas ingestão de água enquanto inibem a ingestão de sódio e em outras situações também estimulem a ingestão de sódio. Por exemplo, em uma situação de hiperosmolaridade apenas a ingestão de água é interessante, por outro lado, em situações de hipovolemia é adequada uma combinação entre ingestão de água e sódio.

Como demonstrado por ASNAR et al. (2013) e RONCARI et al. (2014), os mecanismos colinérgicos que facilitam a ingestão de sódio operam por receptores muscarínicos. Em mamíferos, já foram descritos cinco tipos destes receptores (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5), sendo cada um deles expresso por um gene (LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008; VAN KOPPEN; KAISER, 2003). A ação dos receptores muscarínicos se dá pelo acoplamento com proteínas G. De modo geral, observa-se um acoplamento preferencial dos tipos M_1 , M_3 e M_5 à proteína G_q . Quando ativados, estes três tipos de receptores, geralmente levam à ativação da fosfolipase C, resultando em uma mobilização de cálcio para o meio intracelular. Por outro lado, os receptores M_2 e M_4 acoplam-se preferencialmente às proteínas G_i e G_o e sua ativação, geralmente, leva a uma inibição da adenilil ciclase (CAULFIELD, 1993; CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008; VAN KOPPEN; KAISER, 2003).

Quatro tipos de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 e M_4) podem ser encontrados no cérebro de ratos, Destes, os tipos M_1 , M_2 e M_3 parecem estar envolvidos na facilitação da ingestão de água (BORELLA et al., 2008; MESSER et al., 1989; TICE et al., 1996; ZUBIETA;

FREY, 1993). Entretanto, ainda se desconhece quais são os tipos de receptores muscarínicos envolvidos na facilitação da ingestão de sódio.

2. OBJETIVO

Investigar o envolvimento de receptores muscarínicos centrais dos tipos M₁ e M₂ na facilitação da ingestão de sódio em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL ou tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções i.p. de pilocarpina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 280 a 320 g provenientes do biotério do campus de Araraquara da UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas de aço individuais sob condições laboratoriais padrão com temperatura ambiente de 23 ± 2 °C, umidade de $55 \pm 10\%$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 h). Os ratos tiveram livre acesso a água, NaCl 0,3 M e ração (Socil, Paulínia, SP). Todos os experimentos foram aprovados pela comissão de ética em uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo número 15/2016) e esforços foram feitos para reduzir o desconforto e o número de animais usados.

3.2. Cirurgia

Os ratos foram anestesiados com uma combinação de cetamina e xilazina (80 mg/kg de peso corporal e 7 mg/kg de peso corporal, respectivamente; adquiridas da União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) administrada intraperitonealmente e posicionados em um instrumento estereotáxico (Kopf, Tujunga, CA, USA). A calota craniana dos animais foi exposta por uma incisura realizada com bisturi e o bregma e lâmbda foram utilizados como referência para o nivelamento da mesma. Foi realizada a trepanação da calota craniana dos animais, e cânulas de aço inoxidável com comprimento de 12 mm (calibre 23) foram implantadas bilateralmente em direção ao NPBL e unilateralmente em direção ao ventrículo lateral (VL). Para o NPBL foram usadas as seguintes coordenadas: 10,7 mm posteriormente à sutura coronal, 2,1 mm lateralmente à linha mediana e 3,3 mm abaixo da dura-máter e para o VL as coordenadas foram 0,6 mm posteriormente ao bregma, 1,6 mm lateralmente à linha mediana e 3,4 mm abaixo da calota craniana. Para o NPBL, as pontas das cânulas foram posicionadas 2 mm acima desta região. No caso do VL a ponta da cânula foi posicionada no interior do espaço ventricular. As cânulas foram fixadas aos crânios com o

auxílio de parafusos de joalheiro e resina acrílica. Obturadores de aço (calibre 30) foram usados para obstruir as cânulas após o implante e entre os experimentos. Ao fim da cirurgia, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicillina - 80.000 UI's + streptomomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário - Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 mL/animal; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil). Após a cirurgia, os ratos passaram por um período de recuperação de, pelo menos, 5 dias até o início dos experimentos.

3.3. Drogas

Hidrobrometo de muscimol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) agonista de receptores GABA_A, dissolvido em salina e administrado bilateralmente no NPBL na dose de 0,5 η mol/0,2 μ l;

Cloridrato de moxonidina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) agonista adrenérgico- α_2 /imidazólico, dissolvido em uma mistura de propilenoglicol e água (2:1) e administrado bilateralmente no NPBL na dose de 0,5 η mol/0,2 μ l;

Dicloridrato de pirenzepina (Tocris Bioscience, Bristol, UK) dissolvido em salina e administrado no VL nas doses de 1 η mol/1 μ l ou 100 η mol/1 μ l;

Tetracloridrato de metoctramina (Research Biochemicals Internationals – RBI, Natick, MA, USA) dissolvido em salina e administrado no VL na dose de 50 η mol/1 μ l;

Nitrato de pilocarpina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dissolvido em salina e administrado intraperitonealmente na dose de 0,1 mg/100 g de peso corporal.

As doses utilizadas no presente trabalho foram baseadas em trabalhos anteriores (BORELLA et al., 2008; GASPARINI, 2013).

3.4. Injeções Centrais

Injeções centrais foram feitas usando uma seringa Hamilton de 5 μ L para o NPBL e uma seringa Hamilton de 10 μ L para o VL (Hamilton, Reno, NV, USA). Tubos de polietileno (PE-10) foram utilizados para conectar seringas e cânulas de injeção (calibre 30). No momento do experimento os ratos foram removidos de suas gaiolas, imobilizados manualmente e tiveram os obturadores retirados. Em seguida, a cânula de injeção (2 mm maior que a cânula guia) foi inserida através da cânula guia e a injeção realizada. Os volumes das injeções no NPBL e VL foram de 0,2 μ L em cada lado e 1 μ L, respectivamente. Imediatamente após as injeções os obturadores foram recolocados e os ratos devolvidos às suas gaiolas.

3.5. Testes de ingestão de NaCl 0,3 M e água

A ingestão de NaCl 0,3 M e água foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas originais. No momento do experimento, água, NaCl 0,3 M e ração foram removidos. Após as injeções centrais (ver protocolos experimentais) duas buretas graduadas conectadas a bicos de metal, uma contendo água e outra NaCl 0,3 M, foram oferecidas aos animais e a ingestão destes fluídos foi medida em intervalos de 30 minutos durante 2 ou 4 horas de acordo com cada protocolo experimental. Um período de recuperação de, no mínimo, 72 horas foi respeitado entre os experimentos.

3.6. Testes de ingestão de sacarose 0,06 M e água

Para a realização do teste de ingestão de sacarose 0,06 M e água, os animais foram previamente treinados a ingerir sacarose 0,06 M diariamente, em horário pré-determinado (início às 16:00 h \pm 15 min), durante um período de duas horas. A ingestão de sacarose 0,06 M e água foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas originais. No momento do experimento, água, NaCl 0,3 M e ração foram removidos das gaiolas. Após as injeções centrais (ver protocolos experimentais) duas buretas graduadas conectadas a bicos de metal, uma contendo água e outra sacarose 0,06 M foram oferecidas aos animais e a ingestão destes fluídos foi

medida em intervalos de 30 minutos durante 2 horas. Um período de recuperação de, no mínimo, 48 horas foi respeitado entre os experimentos.

3.7. Análise histológica

Ao fim dos experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental de sódio (80 mg/kg de peso corporal, Cristália, Brasil) e receberam injeções de solução 2% de Azul de Evans em cada cânula guia no mesmo volume usado para as injeções de drogas. Em seguida passaram por perfusão transcardíaca com 20 mL de salina seguida por 20 mL de formalina 10%. Após isso os encéfalos foram removidos e fixados em formalina 10% por, pelo menos, 2 dias. Então, os encéfalos foram congelados, fatiados com espessura de 60 µm e corados por coloração de Giemsa. Para a confirmação dos sítios de injeção as fatias foram analisadas com auxílio de microscopia de luz.

3.8. Análise estatística

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

3.9. Protocolos experimentais

3.9.1. Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela combinação de pilocarpina i.p. e moxonidina bilateralmente no NPBL em ratos que receberam injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos

No momento do experimento, ratos saciados e normovolêmicos receberam injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos (pirenzepina ou metoctramina) ou salina e imediatamente em seguida injeções de moxonidina ou veículo no NPBL e injeções de pilocarpina ou salina i.p. Após 15 minutos os ratos tiveram acesso ao NaCl 0,3 M e a água. A ingestão destes fluídos foi registrada por 2 horas em intervalos de 30 minutos. O período de registro fundamentou-se em

trabalhos anteriores que demonstram que o tratamento com moxonidina no NPBL e pilocarpina i.p. não produz efeitos dipsogênicos e natriorexigênicos por períodos maiores que duas horas, tornando desnecessários registros com períodos de tempo superiores (GASPARINI, 2013).

A ingestão de NaCl 0,3 M e água foi testada em ratos submetidos aos seguintes tratamentos:

Salina i.c.v. + veículo no NPBL + salina i.p.;

Salina i.c.v. + veículo no NPBL + pilocarpina i.p.;

Antagonista muscarínico i.c.v. + veículo no NPBL + pilocarpina i.p.;

Salina i.c.v. + moxonidina no NPBL + pilocarpina i.p.;

Antagonista muscarínico i.c.v. + moxonidina no NPBL + pilocarpina i.p.

Em cada teste o grupo de ratos foi dividido em dois, metade do grupo recebeu uma das combinações de tratamento descritas acima e o restante dos animais recebeu outra combinação. Ao fim dos experimentos, cada rato recebeu todos os 5 tratamentos. Os testes com pirenzepina e metoctramina foram realizados em grupos experimentais diferentes.

3.9.2. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos

No momento do experimento, ratos saciados e normovolêmicos receberam injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos (pirenzepina ou metoctramina) ou salina 15 minutos antes de injeções de muscimol ou salina no NPBL. Imediatamente após as injeções no NPBL os ratos tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M e a ingestão foi registrada por 4 horas em intervalos de 30 minutos. O período de registro baseou-se em trabalhos anteriores que demonstram que a ativação gabaérgica do NPBL promove respostas dipsogênicas e natriorexigênicas que se estendem por até 4 horas (CALLERA et al., 2005).

A ingestão de NaCl 0,3 M e água foi testada em ratos submetidos aos seguintes tratamentos:

Salina i.c.v. + salina no NPBL;

Salina i.c.v + muscimol no NPBL;

Antagonista muscarínico i.c.v. + salina no NPBL;

Antagonista muscarínico i.c.v. + muscimol no NPBL.

Em cada teste o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu uma das combinações de tratamentos descritas acima e o restante dos animais recebeu outra combinação de tratamentos. A sequência de tratamentos em cada rato em diferentes testes foi randomizada e ao final dos experimentos cada rato recebeu todos os quatro tratamentos. Os testes com pirenzepina e metoctramina foram realizados em grupos experimentais diferentes.

3.9.3. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos com injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos

No momento do experimento, os animais receberam injeções i.c.v. dos antagonistas muscarínicos (pirenzepina ou metoctramina) ou salina. Após 15 minutos, os animais tiveram acesso a sacarose 0,06 M e água. Em todos os testes, o oferecimento de sacarose e água respeitou o horário de treinamento dos animais. A ingestão de sacarose 0,06 M e água foi registrada por 2 horas em intervalos de 30 minutos, em ratos submetidos aos seguintes tratamentos:

Salina i.c.v.;

Antagonista muscarínico i.c.v.

Os testes com pirenzepina e metoctramina foram realizados no mesmo grupo experimental.

3.9.4. Ingestão de água induzida por sucessivas injeções i.p. de pilocarpina

No momento do experimento cada animal recebeu uma injeção i.p. de pilocarpina ou salina e após 15 minutos teve acesso à água. A ingestão de água foi monitorada por 2 horas em intervalos de 30 minutos. Cada animal passou por 4 experimentos recebendo em cada experimento uma injeção i.p. de pilocarpina ou salina. Os testes com pilocarpina e salina não foram realizados nos mesmos animais. Houve um intervalo de 72 horas entre cada experimento.

4. RESULTADOS

4.1. Análise histológica

As injeções i.c.v. foram confirmadas em cortes histológicos do encéfalo mostrando o trajeto da cânula em direção ao espaço ventricular, bem como pelo espalhamento de corante neste espaço (Fig 1). Para o NPBL, as injeções foram consideradas corretamente posicionadas em cortes histológicos de encéfalo que mostravam injeções bilaterais nas porções laterais centrais e laterais dorsais do NPBL, em concordância com as definições de FULWILER E SAPER, 1984 (Fig 2). Injeções atingindo porções laterais ventrais e laterais externas, bem como o Kölliker-Fuse foram observadas em alguns animais e os resultados destes animais foram incluídos na análise como ratos que receberam injeções no NPBL. Os sítios de injeção no presente estudo são similares àqueles de estudos prévios que mostram o efeito do muscimol e da moxonidina no NPBL sobre a ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2004; RONCARI et al., 2011, 2014)

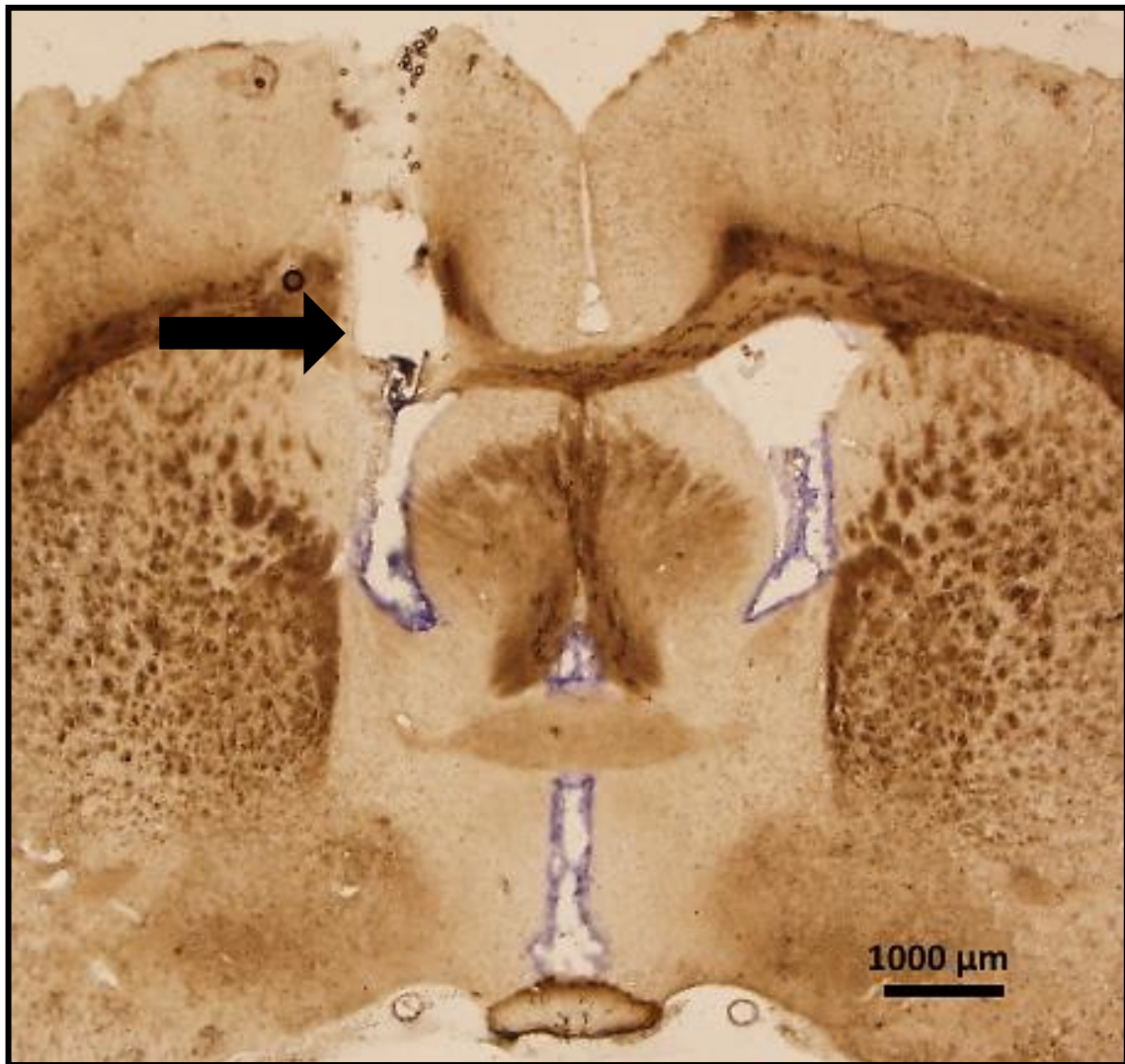


Figura 1. Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no VL (indicado pela seta). Barra preta = 1000 μm .

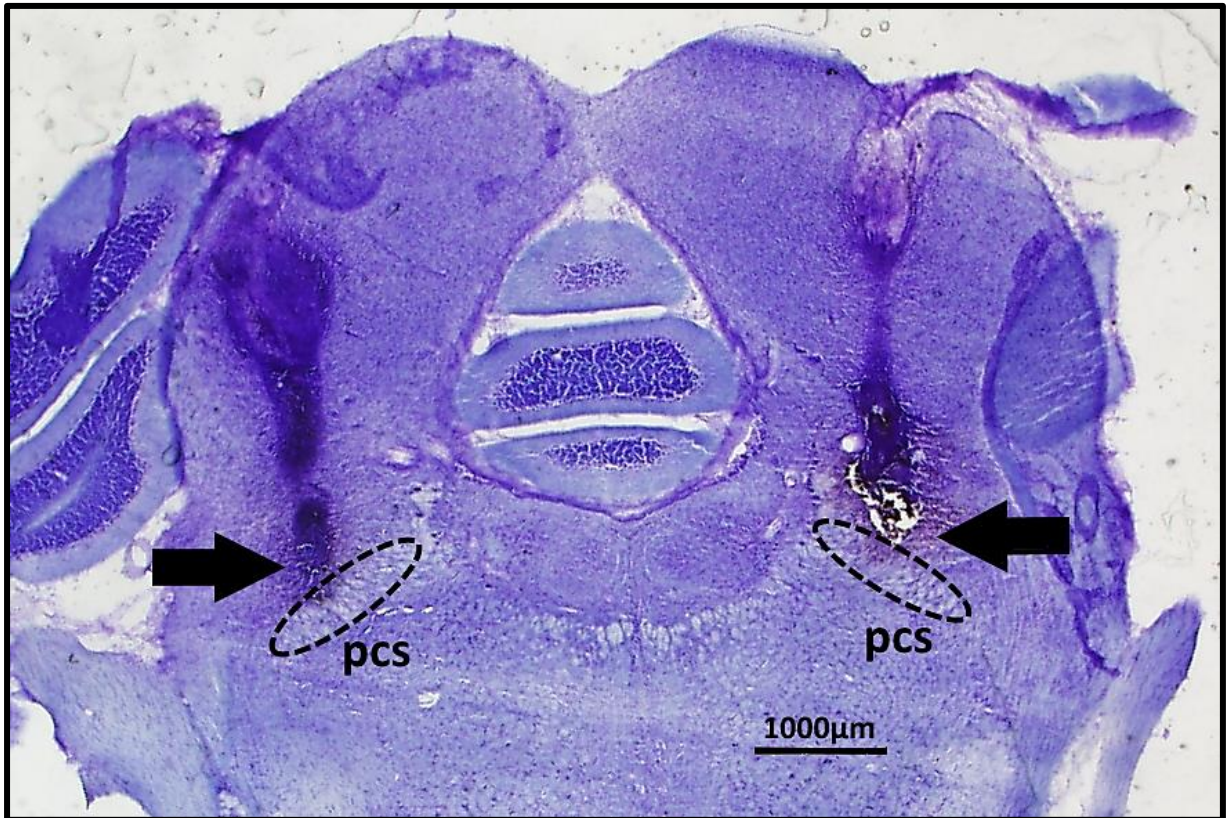


Figura 2. Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no NPBL (indicado pelas setas). Barra preta = 1000 μm . pcs, pedúnculo cerebelar superior (delimitado por linha pontilhada).

4.2. Ingestão de NaCl 0,3 M e água e induzida por pilocarpina i.p. combinada com moxonidina bilateralmente no NPBL em ratos tratados com pirenzepina i.c.v.

Injeções intraperitoneais de pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) em ratos tratados com salina i.c.v. e veículo no NPBL não produziram ingestão significativa de NaCl 0,3 M ou água em comparação com o tratamento controle (veículo no NPBL + salina i.c.v. + salina i.p.) (Figura 3). No entanto, injeções i.p. de pilocarpina em ratos tratados com moxonidina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($12,0 \pm 4,8$ mL/2 h, vs. veículo no NPBL $0,5 \pm 0,2$ mL/2 h) [$F(4,36) = 5,54$; $p < 0,05$] e água ($5,3 \pm 1,8$ mL/2 h, vs. veículo no NPBL $1,8 \pm 0,6$ mL/2 h) [$F(4,36) = 6,58$; $P < 0,05$] (Figura 3).

Injeções i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M₁, 1 nmol/1 µL) reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M ($2,6 \pm 1,1$ mL/2 h) e água ($0,8 \pm 0,4$ mL/ 2 h) em ratos tratados com pilocarpina i.p. + moxonidina no NPBL (Figura 3). A ingestão de NaCl 0,3 M e água dos ratos tratados com pirenzepina i.c.v. + moxonidina no NPBL + pilocarpina i.p. não foi diferente do controle (salina i.c.v. + veículo no NPBL + salina i.p.). O mesmo observou-se com os ratos tratados com pirenzepina i.c.v. + veículo no NPBL + pilocarpina i.p.

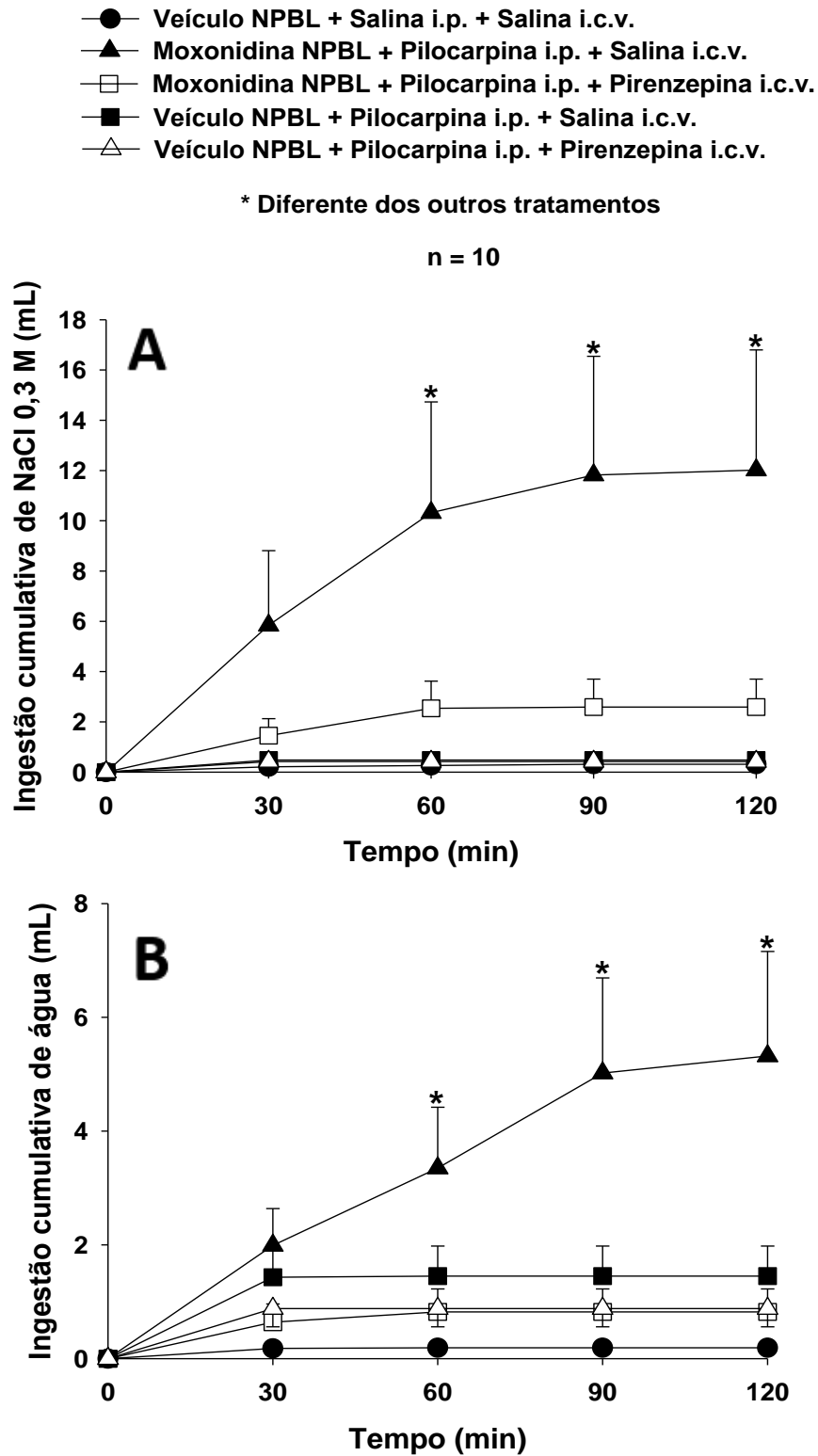


Figura 3. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/ 0,2µL) ou veículo no NPBL combinadas com pirenzepina (1 nmol/1µL) ou salina no VL + pilocarpina (0,1 mg/100g de de peso corporal) ou salina i.p. Os resultados são representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.3. Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por pilocarpina i.p. combinada com moxonidina bilateralmente no NPBL em ratos tratados com metoctramina i.c.v.

Injeções intraperitoneais de pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) em ratos tratados com salina i.c.v. e veículo no NPBL não produziram ingestão significativa de NaCl 0,3 M ou água em comparação com o tratamento controle (veículo no NPBL + salina i.c.v. + salina i.p.) (Figura 4). Por outro lado, injeções i.p. de pilocarpina em ratos tratados com moxonidina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($9,7 \pm 3,5$ mL/2 h, vs. veículo no NPBL $1,0 \pm 0,6$ mL/2 h) [$F(4,64) = 7,80$; $p < 0,05$] e água ($5,2 \pm 2,0$ mL/2 h, vs. veículo no NPBL $0,9 \pm 0,3$ mL/2 h) [$F(4,64) = 4,02$; $p < 0,05$] (Figura 4).

Injeções i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M₂, 50 nmol/1 µL) reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M ($5,7 \pm 2,6$ mL/2 h) e água ($2,7 \pm 1,3$ mL/2 h), em ratos tratados com pilocarpina i.p. + moxonidina no NPBL (figura 4). A ingestão de NaCl 0,3 M dos ratos tratados com metoctramina i.c.v. + moxonidina no NPBL + pilocarpina i.p. foi diferente daquela observada no controle ($5,7 \pm 2,6$ mL/2 h vs. controle $0,1 \pm 0,07$ mL/2 h). Já a ingestão de água não foi diferente do controle. A ingestão de NaCl 0,3 M e água dos ratos tratados com metoctramina i.c.v. + veículo no NPBL + pilocarpina i.p. não foi diferente do controle (salina i.c.v. + veículo no NPBL + salina i.p.).

- Veículo NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.
- ▲ Moxonidina NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.
- Moxonidina NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v.
- Veículo NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.
- △ Veículo NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v.

* Diferente de veículo NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.

Diferente de Moxonidina NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.

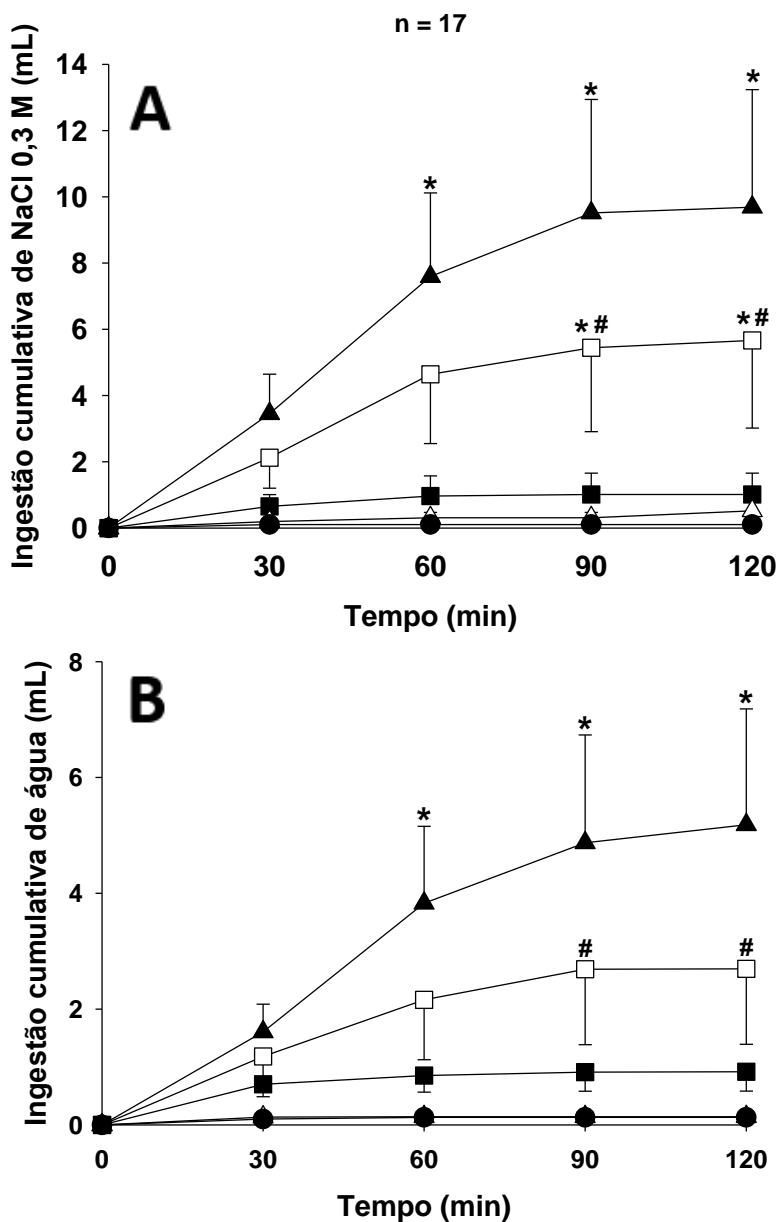


Figura 4. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/ 0,2 μ L) ou veículo no NPBL combinadas com metoclopramina (50 η mol/1 μ L) ou salina no VL + pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) ou salina i.p. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.4. Ingestão de água induzida por sucessivas injeções i.p. de pilocarpina.

Injeções i.p. de pilocarpina induziram ingestão de água em comparação com o grupo controle (salina i.p.) no 1º ($3,4 \pm 0,9$ mL/2 h, vs. salina i.p.: $0,8 \pm 0,8$ mL/2 h), 2º ($3,5 \pm 0,7$ mL/2 h, vs. salina i.p.: $0,6 \pm 0,3$ mL/2 h) e 4º ($3,4 \pm 0,9$ mL/2 h, vs. salina i.p.: $0,3 \pm 0,2$ mL/2 h) experimentos [F (1,32) = 17,94; $p < 0,05$]. No 3º experimento, a ingestão de água induzida por injeção i.p de pilocarpina não foi diferente daquela observada no grupo controle ($3,0 \pm 1,1$ mL/2 h, vs. salina i.p.: $1,2 \pm 0,5$ mL/2 h). Não houve diferença significativa na ingestão de água induzida pela injeção i.p. de pilocarpina comparando-se todos os experimentos [F (3,32) = 0,21; $p > 0,05$].

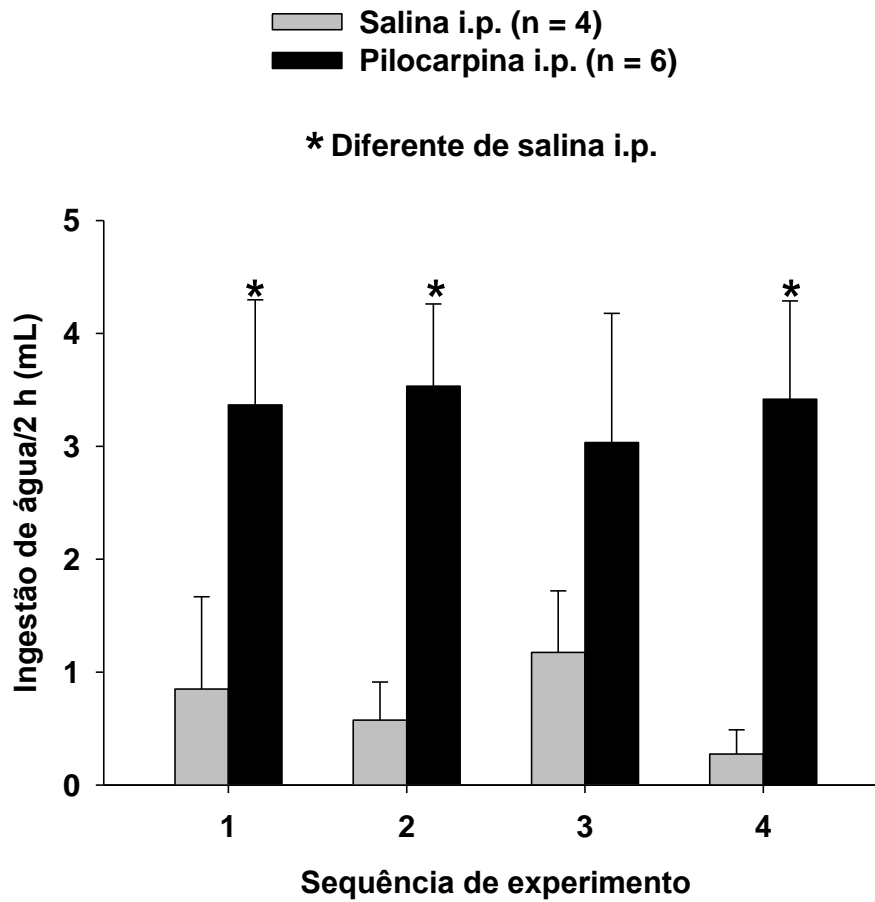


Figura 5. Ingestão cumulativa de água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções de pilocarpina (0,1 mg/100g de peso corporal) ou salina i.p. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.5. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e injeções i.c.v. de pirenzepina.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 η mol/0,2 μ L) no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($34,1 \pm 14,5$ mL/4 h, vs. salina no NPBL: $0,2 \pm 0,1$ ml/4 h) [$F(3,15) = 4,62$; $P < 0,05$] e água ($7,1 \pm 2,3$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,1 \pm 0,1$ ml/4 h) [$F(3,15) = 6,50$; $P < 0,05$] (Figura 5).

Pirenzepina (antagonista muscarínico M_1 , 100 η mol/1 μ L) injetada i.c.v. reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M ($8,2 \pm 6,3$ ml/4 h) e água ($2,4 \pm 1,8$ ml/4 h) induzidas por muscimol injetado no NPBL (Figura 5). A ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com pirenzepina (100 η mol/1 μ L) i.c.v. combinada com muscimol no NPBL não foi estatisticamente diferente do tratamento controle (salina i.c.v. + salina no NPBL). A ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções de pirenzepina i.c.v. combinada com salina no NPBL também foi similar ao controle.

A ingestão de NaCl 0,3 M induzida por injeções de muscimol no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina ($24,4 \pm 5,7$ mL/4 h, vs. salina no NPBL + salina i.c.v.: $0,2 \pm 0,09$) [$F(3,54) = 13,77$; $P < 0,05$] não foi modificada pelas injeções de pirenzepina i.c.v. na dose de 1 η mol/1 μ L ($20,8 \pm 5,2$ mL/4 h). Porém, injeções de pirenzepina i.c.v. na dose de 1 η mol/1 μ L reduziram a ingestão de água induzida por muscimol injetado no NPBL ($7,49 \pm 1,78$ ml/ 4 h vs. salina i.c.v. + muscimol no NPBL: $14,2 \pm 4,6$ ml/4 h), [$F(3,54) = 13,03$; $P < 0,05$] (Figura 6).

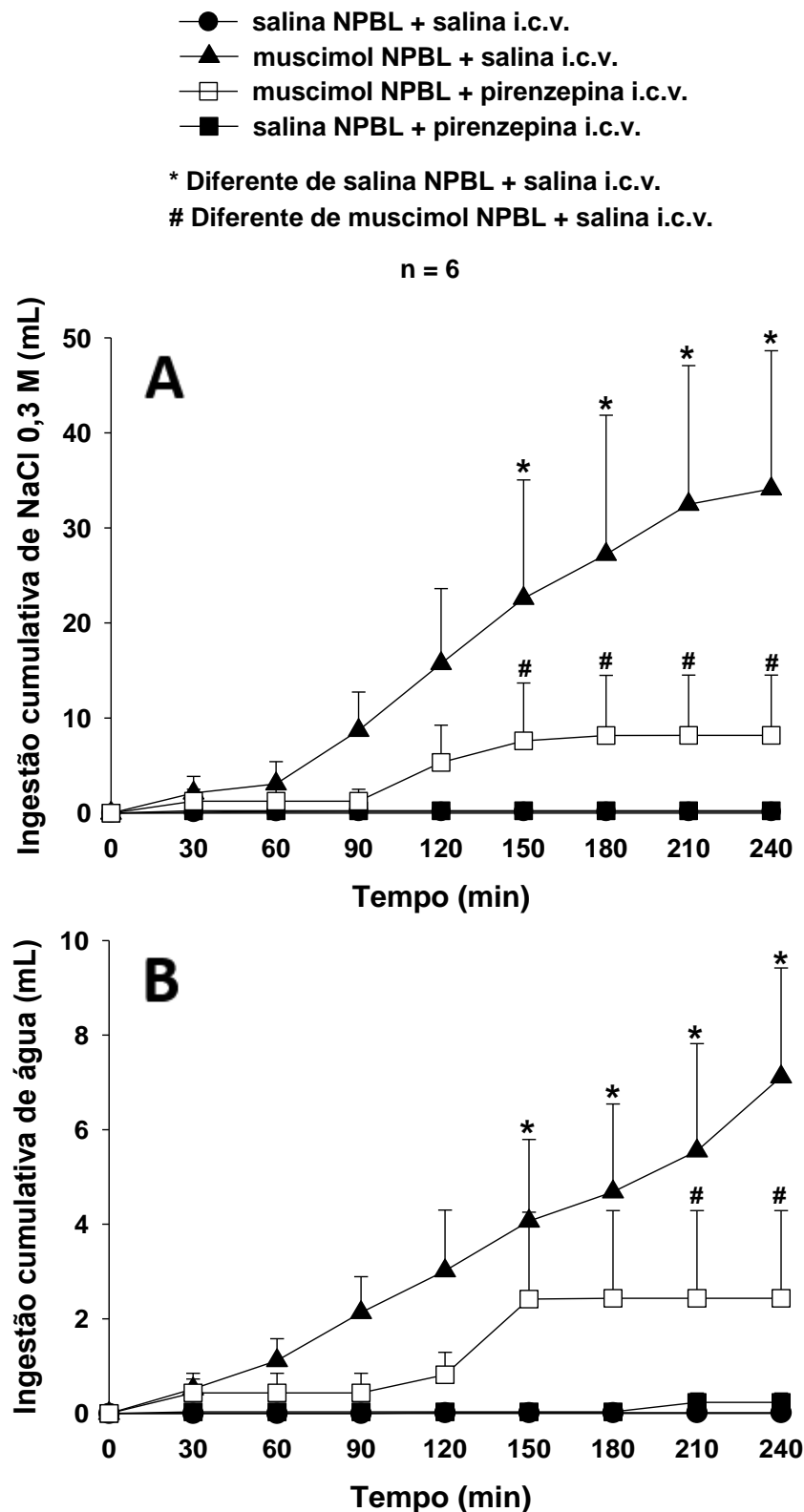


Figura 6. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/ 0,2 μ L) ou salina no NPBL combinadas com pirenzepina (100 η mol/1 μ L) ou salina no VL. Os resultados são representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

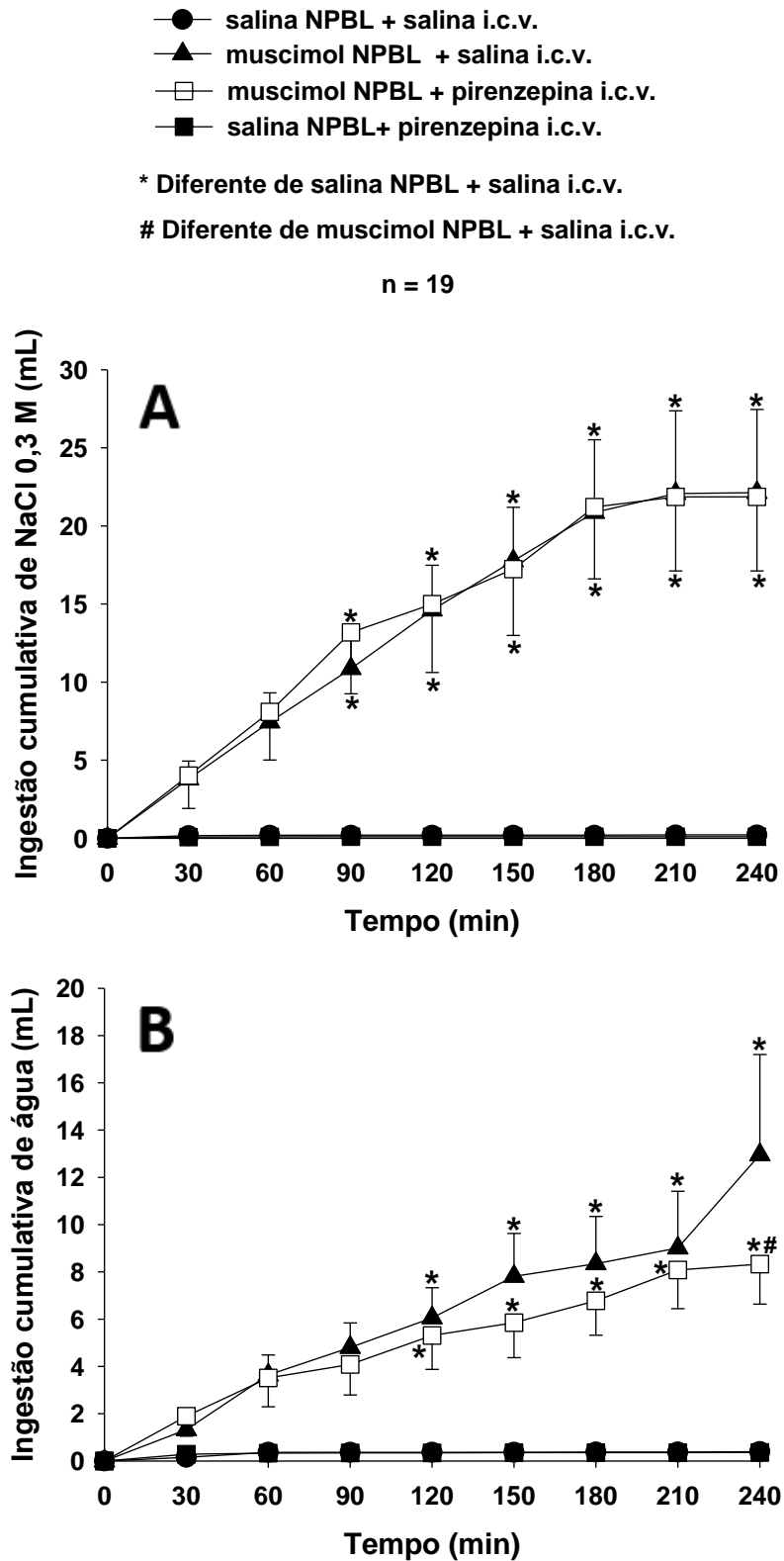


Figura 7. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/ 0,2µL) ou salina no NPBL combinadas com pirenzepina (1 ηmol/1µL) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média ± EPM, n = número de animais.

4.6. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e injeções i.c.v. de metoctramina

Injeções bilaterais de muscimol ($0,5 \text{ } \eta\text{mol}/0,2 \text{ } \mu\text{L}$) no NPBL combinadas com salina i.c.v. induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($23,8 \pm 5,7 \text{ ml}/4 \text{ h}$, vs. salina no NPBL: $0,7 \pm 0,4 \text{ ml}/4 \text{ h}$; $p < 0,05$) [$F(3,21) = 13,26$; $P < 0,05$] e água ($7,4 \pm 2,2 \text{ ml}/4 \text{ h}$, vs. salina no NPBL: $1,4 \pm 0,5 \text{ ml}/4 \text{ h}$; $p < 0,05$) [$F(3,21) = 7,20$; $P < 0,05$] (Figura 7).

Metoctramina (antagonista muscarínico M_2) na dose de $50 \text{ } \eta\text{mol}/1 \text{ } \mu\text{L}$ injetada i.c.v. reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M ($11,4 \pm 5,2 \text{ ml}/4 \text{ h}$; $p < 0,05$) e água ($1,4 \pm 0,6 \text{ ml}/4 \text{ h}$; $p < 0,05$) induzida por muscimol injetado no NPBL (Figura 7). A ingestão de NaCl 0,3 M, mas não a ingestão de água em ratos tratados com metoctramina i.c.v. combinada com muscimol no NPBL foi estatisticamente diferente do controle (salina i.c.v. + salina no NPBL). Metoctramina i.c.v. combinada com salina no NPBL também não modificou a ingestão de NaCl e água em comparação com o controle.

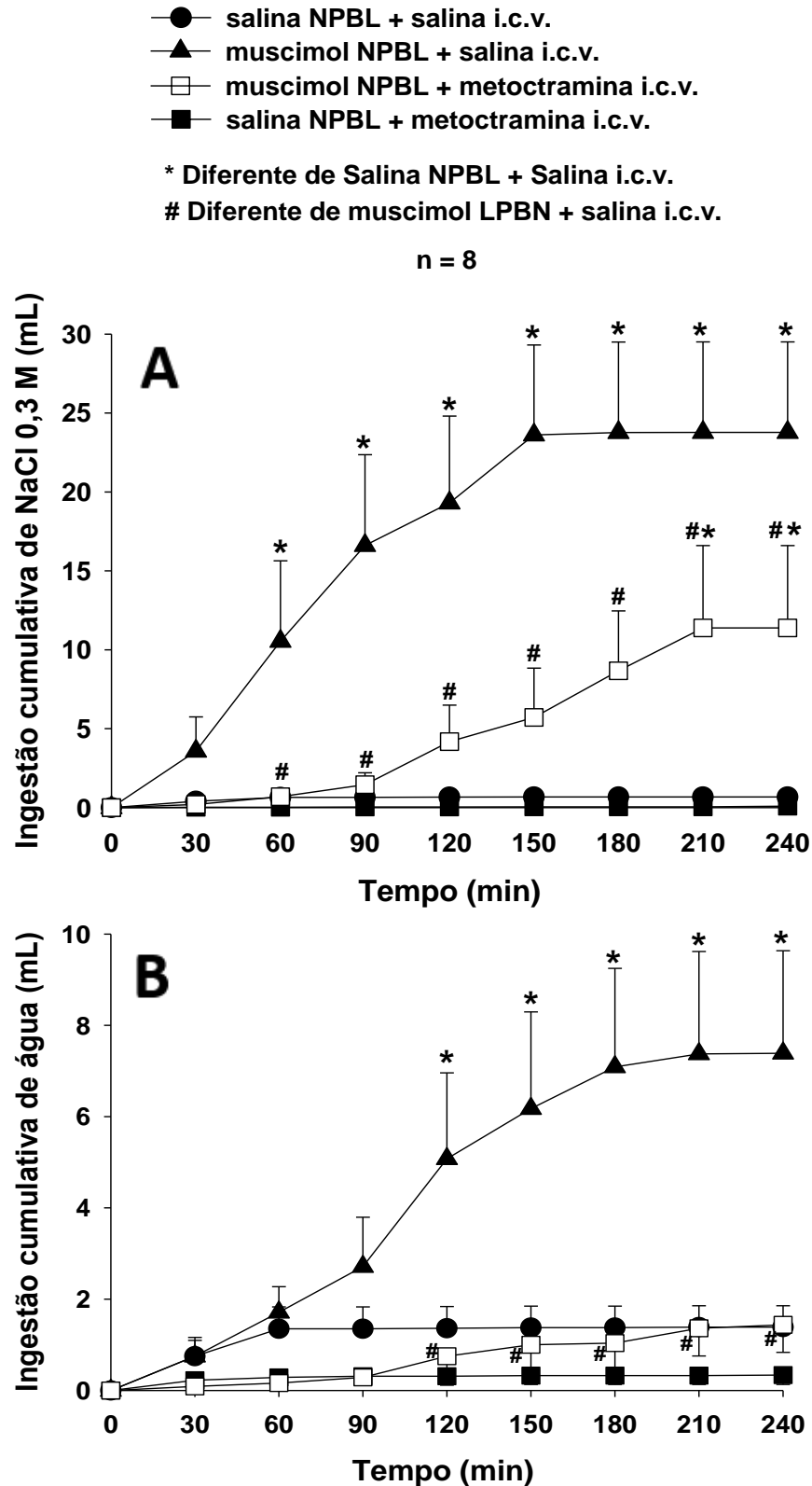


Figura 8. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/ 0,2 μ L) ou salina no NPBL combinadas com metoctramina (50 η mol/1 μ L) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.7. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos tratados com pirenzepina i.c.v.

Injeções i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M₁, 100 nmol/1 µL) reduziram a ingestão de sacarose 0,06 M ($4,6 \pm 0,7$ mL/2 h, vs. salina: $12,9 \pm 1,1$ mL/2 h; $p < 0,05$) [F (1,6) = 61,25; $p < 0,05$] sem influenciar a ingestão de água ($0,07 \pm 0,04$ mL/2 h, vs. salina: $0,14 \pm 0,05$ mL/2 h; $p < 0,05$) [F(1,6) = 3,10; $p > 0,05$] (Figura 8).

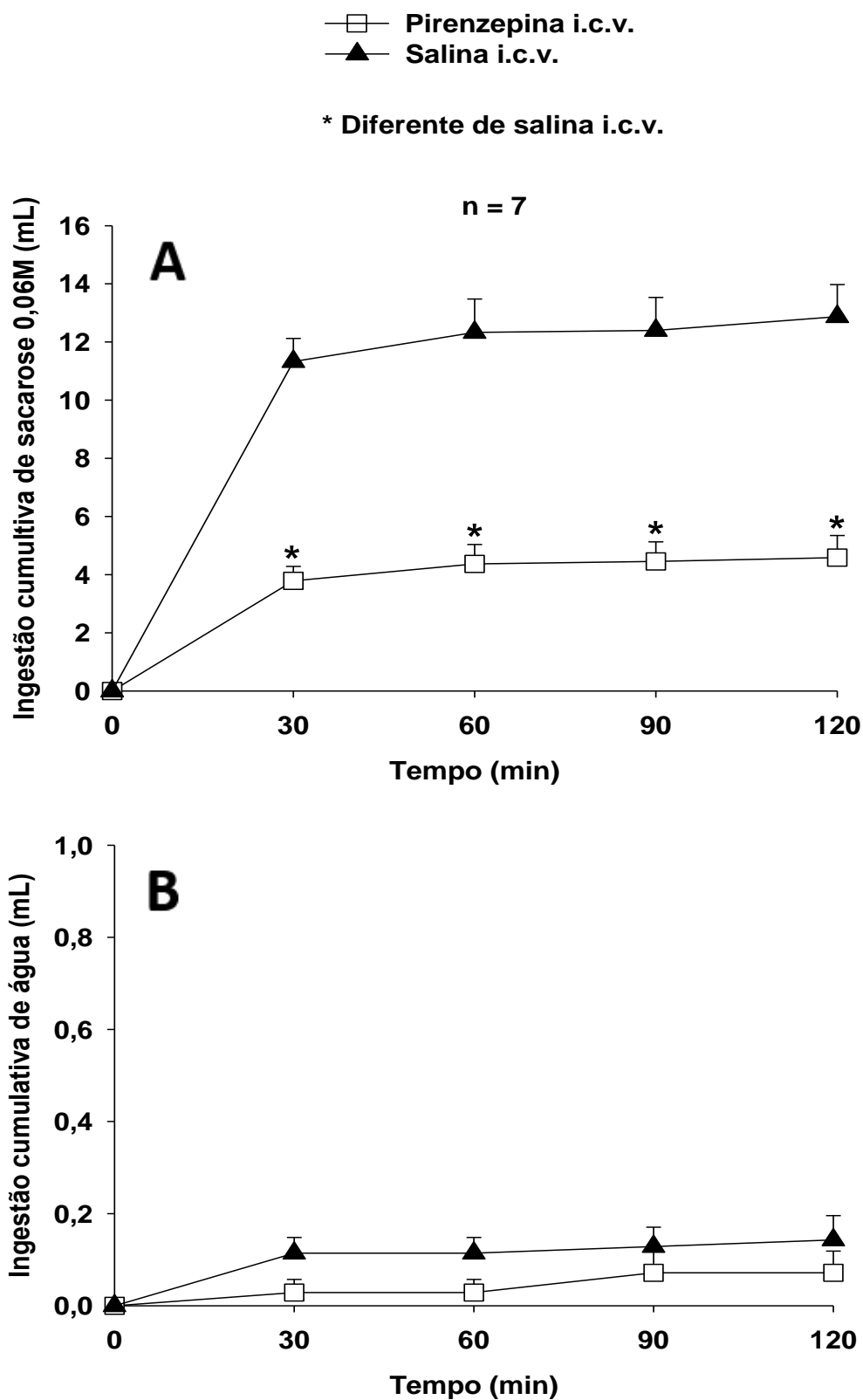


Figura 9. Ingestão cumulativa de sacarose 0,06 M (A) e água (B) em ratos que receberam injeções de pirenzepina (100 η mol/1 μ L) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.8. Ingestão de sacarose 0,06 M e água em ratos tratados com metoctramina i.c.v.

A Injeção i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M₂, 50 η mol/1 μ L) não produziu efeito sobre a ingestão de sacarose 0,06 M ($9,2 \pm 2,9$ mL/2 h, vs. salina: $9,6 \pm 2,0$ mL/2 h, $p > 0,05$) [F (1,6) = 0,56; $p > 0,05$] tampouco sobre a ingestão de água ($0,15 \pm 0,06$ mL/2 h, vs. salina: $0,18 \pm 0,05$ mL/2 h; $p > 0,05$) [F(1,6) = 0,79; $p > 0,05$] (Figura 9).

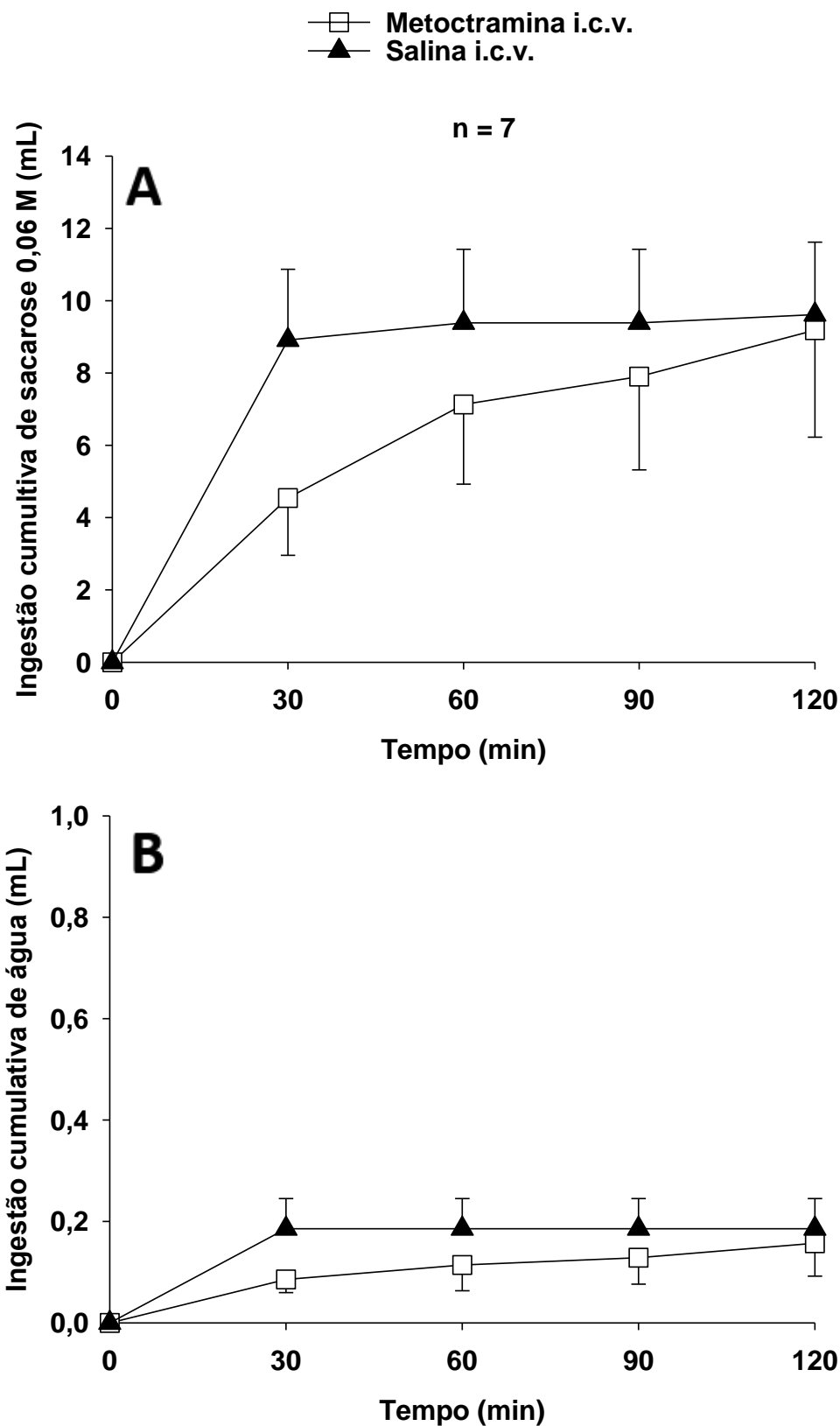


Figura 10. Ingestão cumulativa de sacarose 0,06 M (A) e água (B) em ratos que receberam injeções de metocramina (50 η mol/1 μ L) ou salina no VL. Os resultados estão representados pela média \pm EPM, n = número de animais.

4.9. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de pirenzepina i.c.v.

Injeções unilaterais de moxonidina no NPBL de ratos saciados e normovolêmicos tratados com pilocarpina i.p. e veículo i.c.v. não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(4,20) = 2,52$; $p > 0,05$] ou água [$F(4,20) = 1,48$; $p > 0,05$] em comparação com o tratamento com veículo unilateral no NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. (Tabela 1). Nesses animais, a injeção i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M_1 , 1 nmol/1 μ L) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M ou água quando moxonidina ou veículo foi injetado unilateralmente no NPBL combinada com pilocarpina i.p. (Tabela 1).

A ingestão de NaCl 0.3 M ou água dos ratos tratados com veículo unilateral no NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. ou veículo unilateral no NPBL + salina i.p. + pirenzepina i.c.v. não foi diferente do grupo controle (veículo unilateral no NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.) (Tabela 1).

Tabela 1. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.

Tratamento (n = 6)	Ingestão de NaCl 0,3 M/120 min (mL)
Veículo unilateral NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.	0,1 ± 0,1
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	1 ± 0,1
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v.	0,1 ± 0,1
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	6,3 ± 3,8
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v.	0,8 ± 0,7
	Ingestão de água/120 min (mL)
Veículo unilateral NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.	0,2 ± 0,2
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	0,6 ± 0,4
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v.	0,3 ± 0,1
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	1,8 ± 1,0
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v.	1,0 ± 0,7

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl), pirenzepina (1 nmol/1,0 µl), pilocarpina (0,1 mg/ 100g peso corporal), veículo (2 propilenoglicol: 1 água).

4.10. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de metoctramina i.c.v.

Injeções unilaterais de moxonidina no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos tratados com pilocarpina i.p. e veículo i.c.v. não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(4,16) = 2,33$; $p > 0,05$] ou água [$F(4,16) = 1,95$; $p > 0,05$] em comparação com o tratamento com veículo unilateral no NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. Nesses animais, a injeção i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M_2 , 50 nmol/1 μ L) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M ou água quando moxonidina ou veículo foi injetado unilateralmente no NPBL combinada com pilocarpina i.p. (Tabela 2).

A ingestão de NaCl 0,3 M ou água dos ratos tratados com veículo unilateral no NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. ou veículo unilateral no NPBL + salina i.p. + metoctramina i.c.v. não foi diferente do grupo controle (veículo unilateral no NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.) (Tabela 2).

Tabela 2. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metoctramina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.

Tratamento (n = 5)	Ingestão de NaCl 0,3 M/120 min (mL)
Veículo unilateral NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.	0,4 ± 0,3
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	0,3 ± 0,2
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v.	0,1 ± 0,1
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	11,3 ± 6,1
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v.	3,0 ± 2,9
	Ingestão de água/120 min (mL)
Veículo unilateral NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.	0,9 ± 0,5
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	3,2 ± 1,3
Veículo unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v.	1,5 ± 1,4
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.	5,8 ± 2,7
Moxonidina unilateral NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v.	1,0 ± 0,6

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl), metoctramina (50 nmol/1,0 µl), pilocarpina (0,1 mg/ 100 g peso corporal), veículo (2 propilenoglicol: 1 água).

4.11. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções de pirenzepina i.c.v.

No grupo experimental em que se avaliou os efeitos da dose de pirenzepina de 1 nmol/1 μ L, injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina aumentaram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,27) = 5,42$; $p < 0,05$] e água [$F(3,27) = 8,34$; $p < 0,05$] em comparação com o tratamento com injeções unilaterais de salina no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina (Tabela 3). Neste grupo, a injeção i.c.v. de pirenzepina 1 nmol/1 μ L não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M, mas reduziu a ingestão de água, de ratos tratados com injeções unilaterais de muscimol no NPBL. A ingestão de NaCl 0,3 M ou água nos animais tratados com salina fora do NPBL + pirenzepina i.c.v não foi diferente daquela de injeções unilaterais de salina no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina (Tabela 3).

No grupo experimental em que se avaliou os efeitos da dose de pirenzepina de 100 nmol/1 μ L, injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina não modificaram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,6) = 0,81$; $p > 0,05$] ou água [$F(3,6) = 0,96$; $p > 0,05$] (Tabela 4). A injeção i.c.v. de pirenzepina 100 nmol/1 μ L não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M e água de ratos tratados com injeções unilaterais de muscimol no NPBL. A ingestão de NaCl 0,3 M e água de ratos tratados com salina unilateral no NPBL + metocramina i.c.v. não foi diferente do controle (injeções unilaterais de salina no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina) (Tabela 4).

Tabela 3. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina.

Tratamento (n = 10)	Ingestão de NaCl 0,3 M/240 min (mL)
Salina unilateral NPBL + salina i.c.v.	0,1 ± 0,1
Salina unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	0,0 ± 0,0
Muscimol unilateral NPBL + salina i.c.v.	7,8 ± 2,6*
Muscimol unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	6,4 ± 2,5*
	Ingestão de água/240 min (mL)
Salina unilateral NPBL + salina i.c.v.	0,4 ± 0,2
Salina unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	0,1 ± 0,1
Muscimol unilateral NPBL + salina i.c.v.	7,7 ± 1,8#
Muscimol unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	3,4 ± 1,9

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), pirenzepina (1 nmol/1,0 µl) * Diferente de salina unilateral NPBL + salina i.c.v. e diferente de salina unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.; # diferente dos demais tratamentos

Tabela 4. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina.

Tratamento (n = 3)	Ingestão de NaCl 0,3 M/240 min (mL)
Salina unilateral NPBL + salina i.c.v.	0,8 ± 0,7
Salina unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	0,0 ± 0,0
Muscimol unilateral NPBL + salina i.c.v.	6,1 ± 6,1
Muscimol unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	3,8 ± 3,6
	Ingestão de água/240 min (mL)
Salina unilateral NPBL + salina i.c.v.	0,2 ± 0,2
Salina unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	0,0 ± 0,0
Muscimol unilateral NPBL + salina i.c.v.	3,2 ± 3,1
Muscimol unilateral NPBL + pirenzepina i.c.v.	2,3 ± 2,1

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), pirenzepina (100 ηmol/1,0 µl).

4.12. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções de metoctramina i.c.v.

Injeções unilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,12) = 2,28$; $p > 0,05$], mas foram responsáveis por uma pequena ingestão de água [$F(3,12) = 4,70$; $p < 0,05$] quando comparadas com o grupo controle (salina unilateral no NPBL + salina i.c.v.) (Tabela 5). A injeção i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M_2 , 50 nmol/1 μ L) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M e água nos animais tratados com salina ou muscimol unilateralmente no NPBL. A ingestão de NaCl 0,3 M e água de ratos tratados com salina unilateral no NPBL + metoctramina i.c.v. não foi diferente do controle (injeções unilaterais de salina no NPBL combinadas com injeções i.c.v. de salina) (Tabela 5).

Tabela 5. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções unilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metocramina ou salina.

Tratamento (n = 5)	Ingestão de NaCl 0,3 M/240 min (mL)
Salina unilateral NPBL + salina i.c.v.	0,2 ± 0,1
Salina unilateral NPBL + metocramina i.c.v.	0,1 ± 0,0
Muscimol unilateral NPBL + salina i.c.v.	15,2 ± 6,5
Muscimol unilateral NPBL + metocramina i.c.v.	10,1 ± 8,1
	Ingestão de água/240 min (mL)
Salina unilateral NPBL + salina i.c.v.	1,9 ± 0,8
Salina unilateral NPBL + metocramina i.c.v.	0,0 ± 0,0
Muscimol unilateral NPBL + salina i.c.v.	5,7 ± 2,1#
Muscimol unilateral NPBL + metocramina i.c.v.	1,9 ± 0,8

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), metocramina (50 ηmol/1,0 µl), # diferente de salina unilateral NPBL + metocramina i.c.v.

4.13. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de pirenzepina i.c.v.

Injeções bilaterais de moxonidina no tecido adjacente ao NPBL de ratos tratados com pilocarpina i.p. e veículo i.c.v. não modificaram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(4,32) = 2,24$; $p > 0,05$] em comparação com o tratamento com veículo injetado fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. Entretanto, produziram uma pequena, mas significativa, ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos ($2,7 \pm 0,8$ mL/2 h, vs. veículo fora do NPBL: $0,1 \pm 0,0$ mL/2 h; $p < 0,05$) [$F(4,32) = 4,78$; $p < 0,05$] (Tabela 6). A injeção i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M_1 , 1 nmol/1 μ L) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos tratados com moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. mas reduziu a pequena ingestão de água observada nestes animais, para valores iguais ao controle ($0,8 \pm 0,5$ mL/2 h) (Tabela 6). Animais tratados com veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. não apresentaram ingestão de NaCl 0,3 M ou água diferentes do controle (veículo fora do NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.). O mesmo foi observado em animais tratados com veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v.

Tabela 6. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.

Tratamento (n = 9)	Ingestão de NaCl 0,3 M/120 min (mL)
Veículo fora do NPBL + salina i.p. + salina i.c.v	0,2 ± 0,1
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	0,1 ± 0,0
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v	0,0 ± 0,0
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	1,8 ± 1,1
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v	0,0 ± 0,0
	Ingestão de água/120 min (mL)
Veículo fora do NPBL + salina i.p. + salina i.c.v	0,1 ± 0,0
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	1,4 ± 0,4
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v	0,8 ± 0,4
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	2,7 ± 0,8*
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina i.c.v	0,8 ± 0,5

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl), pirenzepina (1 nmol/1,0 µl), pilocarpina (0,1 mg/ 100g peso corporal), veículo (2 propilenoglicol: 1 água), *Diferente dos demais tratamentos.

4.14. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL combinadas com injeções de pilocarpina i.p. e injeções de metoctramina i.c.v.

Injeções bilaterais de moxonidina no tecido adjacente ao NPBL de ratos tratados com pilocarpina i.p. e veículo i.c.v. não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(4,24) = 2,71$; $p > 0,05$] ou água [$F(4,24) = 1,12$; $p > 0,05$] em comparação com o tratamento com veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. A injeção i.c.v. de metoctramina (antagonista muscarínico M₂, 50 nmol/1 µL) também não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M e água quando moxonidina ou veículo foi injetado fora do NPBL combinada com pilocarpina i.p. (Tabela 7).

Animais tratados com veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. não apresentaram ingestão de NaCl 0,3 M ou água diferentes do controle (veículo fora do NPBL + salina i.p. + salina i.c.v.). O mesmo foi observado em animais tratados com veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + metoctramina i.c.v (Tabela 7).

Tabela 7. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metocramina ou salina e injeção i.p. de pilocarpina ou salina.

Tratamento (n = 7)	Ingestão de NaCl 0,3 M/120 min (mL)
Veículo fora do NPBL + salina i.p. + salina i.c.v	0,8 ± 0,4
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	1,1 ± 0,7
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + metocramina i.c.v	0,5 ± 0,3
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	9,2 ± 5,4
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + metocramina i.c.v	16,9 ± 9,0
	Ingestão de água/120 min (mL)
Veículo fora do NPBL + salina i.p. + salina i.c.v	0,9 ± 0,6
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	1,5 ± 0,7
Veículo fora do NPBL + pilocarpina i.p. + metocramina i.c.v	0,6 ± 0,5
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v	2,6 ± 1,2
Moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + metocramina i.c.v	2,7 ± 1,7

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl), metocramina (50 ηmol/1,0 µl), pilocarpina (0,1 mg/ 100g peso corporal), veículo (2 propilenoglicol: 1 água).

4.15. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL e injeções i.c.v. de pirenzepina.

Injeções bilaterais de muscimol no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção i.c.v. de salina não modificaram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,18) = 3,59$; $p > 0,05$] ou água [$F(3,18) = 3,56$; $p < 0,05$] em comparação com o tratamento com salina fora do NPBL + salina i.c.v. (Tabela 8). A injeção i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M_1 , 1 nmol/1 μ L) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M, mas houve um aumento da ingestão de água em comparação com os ratos tratados com salina fora do NPBL + salina i.c.v. e salina fora do NPBL + pirenzepina i.c.v. (Tabela 8).

A ingestão de NaCl 0,3 M e água de ratos tratados com salina fora do NPBL + pirenzepina i.c.v. não foi diferente daquela observada no grupo controle (salina fora do NPBL + salina i.c.v.) (Tabela 8).

Tabela 8. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de pirenzepina ou salina.

Tratamento (n = 7)	Ingestão de NaCl 0,3 M/240 min (mL)
Salina fora do NPBL + salina i.c.v	0,0 ± 0,0
Salina fora do NPBL + pirenzepina i.c.v.	0,2 ± 0,2
Muscimol fora do NPBL + salina i.c.v.	5,2 ± 2,2
Muscimol fora do NPBL + pirenzepina i.c.v.	9,3 ± 4,0
	Ingestão de água/240 min (mL)
Salina fora do NPBL + salina i.c.v.	0,0 ± 0,0
Salina fora do NPBL + pirenzepina i.c.v.	0,6 ± 0,4
Muscimol fora do NPBL + salina i.c.v.	3,0 ± 1,0
Muscimol fora do NPBL + pirenzepina i.c.v.	6,5 ± 2,9*

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), pirenzepina (50 nmol/1,0 µl).

4.16. Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL e injeções i.c.v. de metocramina.

Injeções bilaterais de muscimol no tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção i.c.v. de salina não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,9) = 1,38$; $p > 0,05$] ou água [$F(3,9) = 0,76$; $p > 0,05$] (Tabela 9). A injeção i.c.v. de metocramina (antagonista muscarínico M_2 , 50 nmol/1 μ L) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M ou água em ratos tratados com muscimol em regiões adjacentes ao NPBL (Tabela 9).

A ingestão de NaCl 0,3 M e água de ratos tratados com salina fora do NPBL + metocramina i.c.v. não foi diferente daquela observada no grupo controle (salina fora do NPBL + salina i.c.v.) (Tabela 9).

Tabela 9. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de metocramina ou salina.

Tratamento (n = 4)	Ingestão de NaCl 0.3 M/240 min (mL)
Salina fora do NPBL + salina i.c.v	0,3 ± 0,2
Salina fora do NPBL + metocramina i.c.v.	0,0 ± 0,0
Muscimol fora do NPBL + salina i.c.v.	7,0 ± 6,3
Muscimol fora do NPBL + metocramina i.c.v.	10,9 ± 5,7
	Ingestão de água/240 min (mL)
Salina fora do NPBL + salina i.c.v.	0,4 ± 0,3
Salina fora do NPBL + metocramina i.c.v.	0,9 ± 0,8
Muscimol fora do NPBL + salina i.c.v.	4,7 ± 4,3
Muscimol fora do NPBL + metocramina i.c.v.	5,5 ± 3,4

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), metocramina (50 ηmol/1,0 µl).

5. DISCUSSÃO

Semelhante a trabalhos anteriores, o presente estudo demonstra a importante interação entre mecanismos facilitatórios colinérgicos prosencefálicos e mecanismos inibitórios do NPBL no controle da ingestão de NaCl 0,3 M e água (ASNAR et al., 2013; MENANI et al., 2002; RONCARI, 2010; RONCARI et al., 2014). Contribuindo para o melhor entendimento de tal interação, o presente trabalho, pela primeira vez, demonstra que receptores muscarínicos M_2 e talvez M_1 centrais são importantes para os mecanismos facilitatórios que promovem a ingestão de água e sódio quando os mecanismos inibitórios encontram-se desativados por injeções de muscimol ou moxonidina no NPBL.

Injeções i.c.v. de pirenzepina (antagonista muscarínico M_1) ou metoctramina (antagonista muscarínico M_2) reduziram de maneira significativa a ingestão de NaCl 0,3 M e água de ratos tratados com muscimol no NPBL bem como de ratos tratados com moxonidina no NPBL combinada com pilocarpina i.p. A partir destes achados tornou-se necessário responder se o antagonismo de receptores muscarínicos M_1 e M_2 reduz a ingestão de NaCl 0,3 M e água de maneira específica ou se tal redução é decorrente de uma inibição inespecífica de comportamentos ingestivos. Dessa maneira, optou-se pela realização do teste de ingestão de sacarose. Como apresentado, injeções i.c.v. de metoctramina não reduziram a ingestão de sacarose 0,06 M, indicando um papel específico de receptores M_2 na facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água. Por outro lado, injeções i.c.v. de pirenzepina foram responsáveis por reduzir a ingestão de sacarose 0,06 M, não permitindo descartar a ação inespecífica dos receptores muscarínicos M_1 na ingestão de NaCl 0,3 M e água. Apesar de tais resultados, é importante lembrar que duas doses diferentes de pirenzepina foram utilizadas no presente trabalho. Em um primeiro momento, no protocolo onde a ingestão de água e sódio foi induzida por pilocarpina i.p. combinada com moxonidina no NPBL, doses de pirenzepina de 1 η mol/1 μ L mostraram-se eficientes em reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M e água. Entretanto, no protocolo que utilizou

injeções de muscimol no NPBL para induzir a ingestão de NaCl 0,3 M e água, doses de pirenzepina de 1 η mol/1 μ L não produziram efeito. Por isso, aumentou-se a dose de pirenzepina para 100 η mol/1 μ L, que se mostrou efetiva na redução da ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por injeções de muscimol no NPBL. A partir destes resultados, o teste de ingestão de sacarose 0,06 M foi realizado com a dose de 100 η mol/1 μ L de pirenzepina. Dessa maneira, a ação inespecífica da pirenzepina pode ser uma consequência da dose utilizada no teste de ingestão de sacarose, não permitindo afirmar que o efeito da pirenzepina na dose de 1 η mol/1 μ L também seja inespecífico. Novos testes com concentrações intermediárias de pirenzepina são necessários a fim de se entender melhor o envolvimento dos receptores M_1 centrais na facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água.

Como pode ser observado, o presente trabalho utilizou dois protocolos experimentais distintos na investigação da interação entre mecanismos inibitórios do NPBL e mecanismos facilitatórios colinérgicos prosencefálicos atuantes na ingestão de sódio. No primeiro deles, os mecanismos facilitatórios centrais foram ativados com injeções i.p. de pilocarpina, um agonista colinérgico não-seletivo com ação central, enquanto os mecanismos inibitórios do NPBL foram bloqueados com injeções bilaterais de moxonidina, um agonista adrenérgico α -2. A ativação de receptores α -2 adrenérgicos no NPBL com moxonidina modifica sinais orosensoriais e pós-ingestivos relativos à ingestão de NaCl 0,3 M, alterando a experiência sensorial de ingestão de NaCl 0,3 M, tornando tal solução menos aversiva e, assim, permitindo uma maior ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2011 e GASPARINI, 2013). A desativação do NPBL com moxonidina por si só não induz ingestão de NaCl 0,3 M, mas apenas aumenta a ingestão promovida por estímulos facilitatórios, como a injeção i.p. de pilocarpina (ANDRADE et al., 2011; GASPARINI, 2013 e presentes resultados), indicando que a modificação dos estímulos orosensoriais apenas produz impactos sobre a ingestão de sódio a partir do momento em que estímulos facilitatórios estão presentes. Adicionalmente, como o presente trabalho demonstra,

injeções i.p. de pilocarpina, sem o bloqueio do NPBL, induzem ingestão de água, mas praticamente nenhuma ingestão de NaCl 0,3 M, demonstrando que os mecanismos facilitatórios colinérgicos de ingestão de sódio estão sujeitos à atividade inibitória do NPBL.

BORELLA et al., 2008 demonstrou que a ativação de receptores muscarínicos M_2 centrais com injeções de pilocarpina i.p. é capaz de promover ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos. Indo ao encontro desta informação, nossos dados demonstram que a ativação de receptores muscarínicos M_2 centrais também é capaz de induzir a ingestão de NaCl 0,3 M. Todavia, somente quando os mecanismos inibitórios do NPBL encontram-se desativados. Em outras palavras, quanto se antagoniza receptores muscarínicos M_2 centrais tanto a ingestão de água como de NaCl 0,3 M são comprometidas de maneira importante. O fato de receptores muscarínicos M_2 centrais estarem envolvidos tanto na facilitação da ingestão de água como de NaCl 0,3 M, mas somente a ingestão de NaCl 0,3 M ser totalmente suprimida pelos mecanismos inibitórios do NPBL, pode indicar que a facilitação da ingestão de água e de NaCl 0,3 M origina-se por um mesmo sinal, entretanto, cabe aos mecanismos inibitórios do NPBL determinar quando tal facilitação resulta somente em ingestão de água, ou ingestão de água e NaCl 0,3 M conjuntas. Dentro de tal linha de raciocínio, a observação do protocolo onde houve associação entre moxonidina no NPBL e pilocarpina i.p. permite afirmar que a pilocarpina, por meio de receptores M_2 centrais, promove uma busca por líquidos (água ou sódio) e, por conta da ação da moxonidina no NPBL, que modifica a palatabilidade ao NaCl, o animal passa a ingerir, além de água, o NaCl 0,3 M. Entretanto, quando a moxonidina não está presente no NPBL a inibição não permite que a ingestão de NaCl 0,3 M aconteça, levando somente à ingestão de água. Assim, o protocolo utilizado provê importantes informações sobre a interação entre a facilitação mediada por receptores muscarínicos M_2 e a modificação de sinais orosensoriais exercida pelo NPBL no controle da ingestão de NaCl 0,3 M.

Como exposto anteriormente, o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL deve sempre estar associado a um estímulo facilitatório para que a ingestão de NaCl 0,3 M aconteça. No presente estudo, e como demonstrado em estudos anteriores (ASNAR et al., 2013; CALLERA et al., 2005; RONCARI, 2010), ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL ingeriram grandes quantidades de NaCl 0,3 M sem nenhum tratamento dipsogênico ou natriorexigênico adicional como depleção de sódio, privação hídrica ou hipovolemia. Ou seja, sem a aparente presença de estímulos facilitatórios. Todavia, tal ingestão é significativamente reduzida por injeções i.c.v de metoctramina, antagonista muscarínico M₂ ou de atropina (ASNAR et al., 2013 e presentes resultados), sugerindo que uma atividade basal de mecanismos facilitatórios centrais, dependentes de receptores muscarínicos M₂, é necessária para a robusta ingestão de NaCl 0,3 M e água quando os mecanismos inibitórios estão desativados pela injeção de muscimol no NPBL. Apesar desta possível atividade basal de mecanismos facilitatórios, a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções bilaterais de moxonidina em ratos saciados e normovolêmicos não produz ingestão de NaCl 0,3 M sem a presença de estímulos dipsogênicos ou natriorexigênicos adicionais como o tratamento com furosemida + captopril, injeções intraperitoneais de pilocarpina ou depleção de sódio (ANDRADE et al., 2004, 2006). Tal necessidade de um estímulo adicional associado às injeções bilaterais de moxonidina no NPBL para promover a ingestão de NaCl 0,3 M e água é possivelmente devido ao fato da moxonidina só produzir uma desativação parcial dos mecanismos inibitórios do NPBL, enquanto o muscimol, provavelmente, produz uma desativação completa deste núcleo, dada a densidade bastante diferente de receptores GABA_A e adrenérgicos α -2 no NPBL (KING; GUNDLACH; LOUIS, 1995; Y. XIA AND G. HADDAD, 1992). Assim sendo, os mecanismos inibitórios remanescentes do NPBL não desativados pela moxonidina seriam suficientes para inibir a ingestão de sódio em ratos saciados. Porém, estes não são capazes de produzir uma inibição eficiente na presença de

tratamentos dipsogênicos ou natriorexigênicos, o que possibilita significativa ingestão de água e NaCl 0,3 M após as injeções de moxonidina no NPBL nestes casos. No presente trabalho, este estímulo facilitatório foi alcançado com as injeções i.p. de pilocarpina.

Além de apresentarem um robusto aumento na ingestão de NaCl 0,3 M, ratos tratados com moxonidina no NPBL associada com pilocarpina i.p. ou muscimol no NPBL também apresentaram um importante aumento na ingestão de água, o que, provavelmente, é uma consequência do aumento na osmolaridade produzido pela excessiva ingestão de NaCl hipertônico, já que em nossos experimentos água e NaCl 0,3 M estavam simultaneamente disponíveis. Embora os mecanismos do NPBL também possam inibir a ingestão de água (MENANI; JOHNSON, 1995), injeções bilaterais de muscimol no NPBL de ratos saciados e normovolêmicos induzem apenas uma pequena ingestão de água quando somente água está disponível (CALLERA et al., 2005), o que é um forte indicativo que a maior parte do aumento na ingestão de água é devida ao aumento na osmolaridade plasmática. Portanto, a principal razão para a redução da ingestão de água em ratos tratados com muscimol no NPBL combinado com injeções i.c.v. de pirenzepina ou metoctramina é, provavelmente, o decréscimo na ingestão de NaCl 0,3 M. No entanto, mecanismos colinérgicos centrais também são importantes para a ingestão de água em ratos com aumento da osmolaridade plasmática (induzida por privação hídrica ou sobrecarga intragástrica de NaCl) (BLOCK; FISHER, 1970; LEE et al., 1996). Consequentemente, não é possível excluir uma influência direta do bloqueio de receptores M_2 centrais na redução da ingestão de água em ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

A redução da ingestão de água pelo tratamento com metoctramina ou pirenzepina em ratos tratados com pilocarpina i.p. combinada com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL segue o mesmo princípio mas é um pouco mais complexa. Em concordância com a explanação acima, a ingestão de água neste tratamento também pode ser influenciada pelo aumento na

osmolaridade plasmática e a redução de ingestão de NaCl hipertônico em ratos tratados com metoctramina ou pirenzepina i.c.v. pode causar redução na ingestão de água. No entanto, estudos prévios demonstraram que a ingestão de água induzida por injeções intraperitoneais de pilocarpina depende da ativação de receptores M_1 , M_2 e M_3 centrais (BORELLA et al., 2008). Portanto, a redução na ingestão de água nesse caso pode depender também do antagonismo de receptores M_1 e M_2 não apenas da redução da ingestão de NaCl 0,3 M.

É importante lembrar que com injeções intraperitoneais de pilocarpina na dose usada no presente estudo, ratos saciados e normovolêmicos, ingerem pequenas e variáveis quantidades de água (BORELLA et al., 2008 e os resultados presentes). Este reduzido volume de água ingerido é, provavelmente, uma consequência da ação de mecanismos inibitórios ativados pelo robusto aumento na pressão arterial produzido pela injeção i.p. de pilocarpina (BORELLA et al., 2008; GASPARINI, 2013). O bloqueio da resposta pressora com injeções i.c.v. de antagonistas muscarínicos poderia facilitar as respostas dipsogênicas, no entanto, ao mesmo tempo os antagonistas muscarínicos também removem os mecanismos dipsogênicos ativados pela pilocarpina, por fim, reduzindo a ingestão de água (BORELLA et al., 2008). No presente estudo, em alguns grupos de animais, pilocarpina intraperitoneal combinada com veículo no NPBL induziu uma reduzida e bastante variável ingestão de água a qual não se mostrou significativa. Considerando que a ingestão de água induzida por pilocarpina i.p. é pequena, variações sutis desta ingestão podem comprometer a significância. Frente a isso, levantou-se a hipótese de que as repetidas injeções de pilocarpina poderiam estar provocando taquifilaxia e esta atenuação do efeito da mesma poderia ser suficiente para influenciar na perda de significância dos dados da ingestão de água. A partir desta hipótese e com o objetivo de minimizar uma possível influência da taquifilaxia nos principais resultados do presente estudo (o envolvimento de receptores muscarínicos centrais na ingestão de sódio) nós optamos por testar os efeitos da pirenzepina e metoctramina em ratos tratados com moxonidina combinada

com pilocarpina nos dois primeiros testes e não randomizamos a sequência de testes. Dessa maneira, nos dois primeiros testes, os animais receberam a combinação de moxonidina no NPBL + salina i.p. + pilocarpina i.p. ou moxonidina no NPBL+ pirenzepina i.p. + pilocarpina i.p., sendo que estes dois tratamentos foram administrados de maneira pareada. Como podemos visualizar em nossos resultados, esta conduta garantiu que a pilocarpina fosse capaz de induzir a ingestão de sódio. Entretanto, a fim de se confirmar o possível efeito da taquifilaxia um grupo de animais sem implantes foi submetido a uma sequência de 4 experimentos, na qual os animais receberam uma injeção i.p. de pilocarpina em cada experimento e tiveram a ingestão de água monitorada por duas horas. Neste protocolo, foi respeitado um intervalo de 72 horas entre os experimentos a fim de se mimetizar o protocolo anterior no qual a possibilidade de taquifilaxia foi levantada. Ao fim do protocolo, observou-se que a ingestão de água induzida por injeções i.p. de pilocarpina não foi atenuada pela sequência de experimentos (figura 5), permitindo descartar o efeito da taquifilaxia. Por outro lado, os dados obtidos no presente trabalho não permitem explicar a razão pela qual animais com implantes bilaterais no NPBL e unilaterais no VL não apresentam uma ingestão de água significativa quando tratados com injeções i.p. de pilocarpina + salina i.c.v + veículo no NPBL, tornando mais investigações necessárias.

Com base na discussão prévia ainda é importante salientar que apesar de não ter se demonstrado o melhor protocolo para o estudo dos receptores muscarínicos centrais envolvidos na ingestão de água, uma resposta já respondida por BORELLA et al. em 2008, este fato não trouxe problemas para a conclusão do trabalho, já que o principal objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento de receptores muscarínicos centrais na ingestão de sódio e o protocolo utilizado mostrou-se bastante eficiente para responder esta pergunta.

Pirenzepina e metoctramina produziram uma redução similar na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por muscimol no NPBL ou por moxonidina no NPBL combinada com pilocarpina i.p. Considerando a possibilidade de uma ação não inespecifica da pirenzepina caso

doses menores que 100 η mol/1 μ L sejam testadas, os presentes dados podem sugerir que receptores M_1 e M_2 centrais contribuem de maneira similar para a facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água nestes protocolos. As respostas mediadas pelos receptores muscarínicos M_1 , M_3 e M_5 se dão, preferencialmente, pelo acoplamento com proteínas da família G_q as quais levam a ativação de fosfolipase C. Por outro lado, receptores M_2 e M_4 , se acoplam preferencialmente às proteínas G_i e G_o levando a uma inibição da adenilil ciclase, bem como à abertura de canais de potássio. Dessa maneira, a ativação de receptores M_1 , M_3 e M_5 leva a respostas intracelulares diferentes daquelas produzidas pela ativação dos receptores M_2 e M_4 . Considerando a possibilidade de receptores M_1 e M_2 estarem co-localizados nos mesmos neurônios, tais resultados poderiam se mostrar contraditórios. No entanto, apesar da existência de vias de sinalização preferenciais ativadas pelos diferentes receptores muscarínicos, existem muitos casos de exceções, nos quais receptores muscarínicos podem dar origem a vias de sinalização intracelular por maneiras não convencionais (i.e: M_2 e M_4 ativando G_q e M_1 , M_3 e M_5 ativando G_i/o). No mais, a literatura descreve diversas respostas muscarínicas que não envolvem a ativação de fosfolipase C ou adenilil ciclase (CAULFIELD, 1993; CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; VAN KOPPEN; KAISER, 2003). Portanto, apesar de receptores M_1 e M_2 , classicamente, produzirem diferentes respostas celulares através de diferentes mecanismos de sinalização intracelular também é possível que estes receptores possam iniciar as mesmas vias de sinalização intracelular, produzindo as mesmas respostas neuronais e contribuindo da mesma maneira para a facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água, como nossos resultados demonstram.

Além da possibilidade de receptores M_1 e M_2 estarem localizados nos mesmos neurônios, também é possível a localização destes receptores em neurônios diferentes, dentro de um circuito pertencente a uma região, ou até em regiões diferentes, visto que injeções i.c.v. tem a capacidade de atingir diferentes áreas prosencefálicas. Todavia, apesar da possibilidade

dos receptores muscarínicos M_1 e M_2 estarem localizados em diferentes áreas, RONCARI et al., 2014 demonstrou que a injeção de atropina no OSF tem a capacidade de reduzir drasticamente a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por muscimol no NPBL, indicando que a atividade dos mecanismos colinérgicos do OSF é fundamental para a facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água neste caso. Portanto, existe grande possibilidade de que os receptores muscarínicos M_1 e M_2 envolvidos na facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água estejam localizados no OSF.

O estudo dos receptores muscarínicos baseado na seletividade de diferentes antagonistas deve sempre ser cauteloso visto que são poucos os antagonistas que apresentam alta afinidade para apenas um tipo de receptor (CAULFIELD, 1993; CAULFIELD; BIRDSALL, 1998). No presente trabalho, pirenzepina foi usada com o propósito de antagonizar receptores muscarínicos M_1 , e metoctramina de antagonizar receptores muscarínicos M_2 . Apesar de muitos trabalhos descreverem estes compostos como antagonistas específicos é necessária cautela na análise dos resultados. A pirenzepina possui maior afinidade para receptores muscarínicos M_1 e uma menor, mas considerável, afinidade por receptores muscarínicos M_4 . Metoctramina possui sua maior afinidade por receptores M_2 , seguida de perto por sua afinidade por receptores M_4 . No mais, a afinidade destes antagonistas pelos demais tipos de receptores muscarínicos não pode ser descartada, no entanto, é bastante reduzida (CAULFIELD, 1993; CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; EGLIN et al., 1999). Portanto, apesar da afinidade da pirenzepina e metoctramina indicar maior participação dos receptores M_1 e M_2 na ingestão de água e NaCl 0,3 M, testes com tropicamide, um antagonista com alta afinidade por receptores muscarínicos M_4 são necessários para confirmar o envolvimento de receptores M_1 e M_2 e excluir a participação de receptores M_4 na facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M e água. Um estudo prévio demonstrou que a ingestão de água induzida por pilocarpina não depende de receptores

M₄ (BORELLA et al., 2008) o que reduz a possibilidade do envolvimento deste receptor na facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M.

Outro fator que deve ser considerado quando se trabalha com antagonistas como ferramenta farmacológica é a dose utilizada, já que a medida que se aumenta a dose pode haver perda de seletividade. Com base em um estudo anterior de Borella et al. (2008), pode-se afirmar que as doses utilizadas em nosso trabalho foram seguras na manutenção da seletividade dos antagonistas. No trabalho citado, investigou-se o envolvimento dos diferentes tipos de receptores muscarínicos centrais na salivação induzida por pilocarpina i.p. e foi demonstrado que apenas os receptores muscarínicos M₃ estão envolvidos nesta resposta. No mesmo trabalho, a fim de se descartar o envolvimento dos demais receptores, doses de 500 nmol de pirenzepina e metoctramina foram utilizadas e não se mostraram efetivas na redução da salivação. Tal fato indica que mesmo em doses de 500 nmol pirenzepina e metoctramina não apresentaram uma perda de seletividade, ou seja, não antagonizaram a receptores M₃. Dessa maneira, as doses utilizadas em nosso estudo, 50 nmol para metoctramina e 1 e 100 nmol para pirenzepina podem ser consideradas seguras com relação a seletividade.

No presente trabalho, em parte dos animais, apenas uma das injeções cujo alvo era o NPBL atingiu este núcleo, enquanto a outra posicionou-se fora desta região, viabilizando apenas injeções unilaterais no NPBL associadas a injeções no VL. Estes animais (com injeções unilaterais no NPBL + injeções no VL) foram agrupados, independentemente do lado em que receberam injeções no NPBL, e seus dados de ingestão analisados. Como pode se notar, animais com injeção unilateral de moxonidina no NPBL associada a pilocarpina i.p. e salina i.c.v. não apresentaram aumento estatisticamente significativo da ingestão de NaCl 0,3 M e água. Entretanto, pode-se observar uma tendência de aumento na ingestão de NaCl 0,3 M e água nesses animais. Ao mesmo tempo, também é possível observar que apesar de não haver diferença estatística, a ingestão de NaCl 0,3 M e água de animais tratados com moxonidina

unilateralmente no NPBL + pilocarpina i.p. + pirenzepina ou metoctramina i.c.v. apresentou uma tendência de redução em relação aos animais que receberam moxonidina unilateralmente no NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v.

Animais com injeções unilaterais de muscimol no NPBL apresentaram uma tendência de aumento da ingestão de NaCl 0,3 M ou água, em poucos grupos significantes, mas sempre num volume menor do que dos ratos com injeções bilaterais no NPBL. Adicionalmente, nestes animais, injeções i.c.v. de pirenzepina na dose de 1 η mol/1,0 μ l também não foram eficientes em reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M, mas reduziram a ingestão de água, assim como observado no grupo com injeções bilaterais no NPBL.

Além de animais com injeções bilaterais ou unilaterais no NPBL, observou-se que em certo número de animais ambas as injeções que deveriam atingir este núcleo atingiram apenas regiões adjacentes, não permitindo injeções precisas em nenhum dos lados do NPBL. Estes animais foram agrupados e seus dados de ingestão avaliados. Ratos com injeções de moxonidina em regiões adjacentes ao NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. não apresentaram ingestão de NaCl 0,3 M significativa, evidenciando a importância e especificidade do NPBL nos mecanismos inibitórios de controle da ingestão de NaCl 0,3 M. Ademais, ratos tratados com injeções de moxonidina em regiões adjacentes ao NPBL em associação com pilocarpina i.p. e salina i.c.v. apresentaram uma pequena mas significativa ingestão de água a qual pode ser atribuída aos efeitos da pilocarpina i.p. como descrito por BORELLA et al., 2008. É importante observar que alguns ratos tratados com injeções de moxonidina fora do NPBL + pilocarpina i.p. + salina i.c.v. apresentam uma ingestão significativa de NaCl 0,3 M. A análise histológica dos encéfalos destes animais mostrou que as injeções localizaram-se acima do NPBL (verticalmente altas) ou abaixo do NPBL (verticalmente baixas). No caso das injeções verticalmente altas é possível que ocorra uma difusão das substâncias injetadas resultando em uma ação sobre o NPBL. Todavia, tal difusão foge do controle das condições experimentais,

não permitindo afirmar que em todas as injeções realizadas ocorreu uma desativação adequada do NPBL como aquela observada nos animais bilateralmente positivos, por esse motivo os animais foram considerados negativos. Adicionalmente, no caso das injeções verticalmente baixas, pode ocorrer uma ação da droga sobre o NPBL no momento em que a agulha injetora é retirada após a injeção. Além disso, injeções verticalmente baixas podem atingir o núcleo parabraquial medial (NPBM), que também está envolvido no controle da ingestão de NaCl 0,3 M (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014). Assim como nos grupos que receberam injeções bilaterais de moxonidina fora do NPBL, injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL também não produziram ingestão de NaCl 0,3 M estatisticamente significativa. Entretanto, observa-se a mesma tendência de ingestão, justamente pela presença de animais com injeções verticalmente altas ou baixas.

Em resumo, os presentes resultados sugerem que a pilocarpina injetada i.p. atua em receptores muscarínicos M_2 e talvez M_1 centrais para facilitar a ingestão de água e sódio quando os mecanismos inibitórios são desativados por injeções de moxonidina no NPBL. A ativação destes mesmos receptores muscarínicos centrais seria importante para a ingestão de água e sódio quando os mecanismos inibitórios são desativados por injeções de muscimol no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que receptores M_2 e possivelmente M_1 centrais estão envolvidos nos mecanismos facilitatórios que promovem a ingestão de NaCl 0,3 M e água quando os mecanismos inibitórios do NPBL encontram-se desativados com moxonidina ou muscimol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. A. F. et al. Activation of α 2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25–34, 2004.

ANDRADE, C. A. F. et al. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21–28, 2006.

ANDRADE, C. A. F. et al. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an α 2-adrenergic receptor agonist. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 5, p. 702–708, 2011.

ASNAR, D. S. et al. Involvement of central cholinergic mechanisms on sodium intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience Letters**, v. 534, n. 1, p. 188–192, 2013.

BLOCK, M. L.; FISHER, A. E. Anticholinergic central blockade of salt-aroused and deprivation-induced drinking. **Physiology and Behavior**, v. 5, n. 4, p. 525–527, 1970.

BORELLA, T. L. et al. Central muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced salivation, hypertension and water intake. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1256–1263, 2008.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 519–531, 2008.

BOURQUE AND, C. W.; OLIET, S. H. R. Osmoreceptors in the Central Nervous System. **Annual Review of Physiology**, v. 59, n. 1, p. 601–619, 1997.

CALLERA, J. C. et al. GABAA receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces

water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725–735, 2005.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic Receptors-Characterization, coupling and function. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 58, n. 3, p. 319–379, 1993.

CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 2, p. 279–290, 1998.

CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D.; PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Research**, v. 322, n. 2, p. 388–392, 1984.

DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 4, p. R1136–41, 2006.

DE GOBBI, J. I. F. et al. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 5 49-5, p. R1301–R1307, 2001.

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

DE LUCA, L. A.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 1055–1061, 2003.

DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 350–358, 2008.

EGLIN, R. et al. Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. **Current opinion in chemical ...**, v. 3, p. 426–432, 1999.

FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L.; SIMPSON, J. B. Modulation of Salt Appetite by Lateral Ventricular Infusions of Angiotensin II and Carbachol During Sodium Depletion. v. 346, p. 273–280, 1985.

FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L.; SIMPSON, J. B. Fluid Intake, Distribution, and Excretion During Lateral Ventricular Infusions of Carbachol in Rats. v. 332, n. 1985, p. 237–245, 2000.

FORMENTI, S. et al. Hindbrain mineralocorticoid mechanisms on sodium appetite. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 3, p. R252–R259, 2013.

FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Research Reviews**, v. 7, n. 3, p. 229–259, 1984.

GASPARINI, S. et al. Adrenergic mechanisms of the Kölliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 370–379, 2009.

GASPARINI, S. **Controle da ingestão de água e sódio pelos mecanismos adrenérgicos do núcleo parabraquial lateral Silvia**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos and Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 293, n. 4, p. 540–580, 1990.

JHAMANDAS, J. H. et al. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: Electrophysiological and anatomical observations. **Brain Research Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 115–126, 1996.

JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. Neuroendocrinology of thirst: afferent signalling and

mechanisms of central integration. v. 10, p. 149–190, 1990.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The Neuroendocrinology of Thirst and Salt Appetite: Visceral Sensory Signals and Mechanisms of Central Integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 18, p. 292–353, 1997.

KING, P. R.; GUNDLACH, A. L.; LOUIS, W. J. **Quantitative autoradiographic localization in rat brain of α 2-adrenergic and non-adrenergic I-receptor binding sites labelled by [3H]rilmenidine.pdf**, 1995.

LANGMEAD, C. J.; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 232–243, 2008.

LEE, W. J. et al. Effect of brain angiotensin II AT1, AT2, and cholinergic receptor antagonism on drinking in water-deprived rats. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1–2, p. 41–46, 1996.

MANGIAPANE, M. L.; SIMPSON, J. B. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 239, n. 5, p. R382 LP-R389, 1 nov. 1980.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2004.

MENANI, J. V. et al. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 282, n. 3, p. R837-41, 2002.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 275, n. 5, p. R1431-1437, 1998.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A.; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus

in the control of sodium appetite. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 306, n. 4, p. R201-10, 2014b.

MENANI, J. V; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **AJP: Regulatory, Integrative, & Comparative Physiology**, v. 269, n. 5 Pt 2, p. R1044-9, 1995.

MENANI, J. V; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Amer J Physiol-Regul Integr C**, v. 39, n. 1, p. R162–R168, 1996.

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

MESSER, W. S. et al. Autoradiographic analyses of agonist binding to muscarinic receptor subtypes. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 837–850, 1989.

RONCARI, C. F. **Mecanismos prosencefálicos envolvidos na ingestão de sódio e água induzida pela ativação gabaérgica do núcleo parabraquial lateral**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos; Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2010.

RONCARI, C. F. et al. Importance of central AT 1 receptors for sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 196, p. 147–152, 2011.

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

SAKAI, R. R. et al. The amygdala: Site of genomic and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. **Kidney International**, v. 57, n. 4, p. 1337–1345, 2000.

SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical Organ: Site of Drinking Elicitation by Angiotensin II. **Science**, v. 181, n. 4105, p. 1172 LP-1175, 21 set. 1973.

TICE, M. A et al. Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. **Brain research. Developmental brain research**, v. 92, n. 1, p. 70–76, 1996.

VAN KOPPEN, C. J.; KAISER, B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 98, n. 2, p. 197–220, 2003.

VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 471–503, 2003.

Y. XIA AND G. HADDAD. ONTOGENY And distribution of gaba , receptors in rat brainstem and rostral brain regions. **Neuroscience**, v. 49, n. 4, p. 973–989, 1992.

ZUBIETA, J. K.; FREY, K. A. Autoradiographic mapping of M3 muscarinic receptors in the rat brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 264, p. 415–422, 1993.
