

Universidade Federal de São Carlos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

PIPGCF UFSCar/UNESP

CAMILLA DIAS GUILLEN

**IMPORTÂNCIA DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO
CONTROLE DO EQUILÍBRIO HIDROMINERAL EM MODELO
ANIMAL DE HIPERTENSÃO ESSENCIAL**

ARARAQUARA – 2018

Universidade Federal de São Carlos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

PIPGCF UFSCar/UNESP

CAMILLA DIAS GUILLEN

**IMPORTÂNCIA DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO
CONTROLE DO EQUILÍBRIO HIDROMINERAL EM MODELO
ANIMAL DE HIPERTENSÃO ESSENCIAL**

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.

Orientadora: Carina A. Fabrício de Andrade

ARARAQUARA – 2018

GUILLEN, Camilla Dias. Importância do núcleo parabraquial lateral no controle do equilíbrio hidromineral em modelo animal de hipertensão essencial. São Carlos, SP, 2018. 77 p.

ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
06	01	À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2016/103176-0) e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e suporte na realização deste trabalho.	Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo: 2016/103176-0, de 01/06/2017 a 28/02/2018) e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - 01/03/2016 a 31/05/2017) sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.



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 de Dissertação de Mestrado da candidata Camilla Dias Guillen, realizada em 05/07/2018:

Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade
UNESP

Prof. Dr. João Carlos Calara
UNESP

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que ao longo desta jornada me apoiaram e me deram forças. Em especial à Deus que me permitiu estar realizando meus sonhos, e também meus pais, Sandra e Luis, por todo amor e compreensão imensuráveis.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de viver e realizar tudo aquilo que almejo para minha vida.

Aos meus pais Sandra e Luis Fernando que nunca deixaram de me apoiar e sempre deram suporte emocional e afetivo para que eu pudesse chegar onde eu estou. São fonte de amor incondicional.

Aos meus irmãos Caio e Caique, que sempre foram amigos, leais e amorosos, e em todas vezes possíveis me fizeram sorrir em meio a tempestade.

A minha vó Lucia, que é a luz da minha vida, e que me fez sorrir sempre de tanto amor verdadeiro.

Ao meu namorado Guilherme, por toda paciência nos momentos difíceis, por toda demonstração de amor e carinho sempre.

Ao Emilson, Gabriel e Karine por estarem presentes em todos momentos, desde a prova até o fim, sem eles não teria sido mais leve.

Aos amigos do laboratório, por todas conversas, risadas, conselhos e broncas, em especial Mariana Lauar e Marlusa Karlen, por todo apoio, aprendizado, carinho e paciência. Também a Jéssica de Sá e Aline, pela contribuição na finalização dos experimentos, minha eterna gratidão.

À professora Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade, 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 todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho que ao longo do tempo cruzaram meu caminho.

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, sem os quais não seria possível sua realização.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2016/103176-0) e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e suporte na realização deste trabalho.

***“A persistência é o menor
caminho do êxito. ”***

(Charles Chaplin)

RESUMO

O consumo excessivo de sal tem sido associado ao desenvolvimento ou agravamento de doenças crônicas, incluindo a hipertensão. Ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously hypertensive rats* – SHR), modelo animal para o estudo da hipertensão essencial, apresentam maior preferência ao sódio quando comparados às linhagens normotensas. Um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de sódio e regulação cardiovascular já foi descrito para o núcleo parabraquial lateral (NPBL). Contudo, a participação do NPBL sobre o controle cardiovascular e equilíbrio hidromineral ainda é desconhecida em animais SHR. O objetivo do presente projeto foi avaliar os parâmetros cardiovasculares e apetite ao sódio após ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL nesse modelo animal de hipertensão essencial. Injeções bilaterais de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M em animais SHR induzida pelo protocolo de privação hídrica seguido de reidratação parcial (PH-RP), sem alterar a ingestão água. Entretanto, a administração bilateral de moxonidina no NPBL não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M e de água induzida pelo protocolo de PH-RP em animais normotensos (Holtzman). Em SHR normoidratados, não foram observadas alterações na ingestão de NaCl 0,3 M e água, a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e o teste do barorreflexo após injeções bilaterais de moxonidina no NPBL. Ao final das 24 horas do período de privação hídrica e também após as duas horas de reidratação parcial não houve alteração dos valores basais de PAM e FC de SHR, e a administração de moxonidina no NPBL desses animais também não alterou a PAM e FC. A moxonidina injetada no NPBL de SHR também promoveu um balanço positivo de sódio, caracterizado pelo aumento da ingestão de NaCl 0,3 M durante o teste do apetite ao sódio, acompanhado de aumento da excreção renal de sódio e volume urinário ao final do experimento. Em suma, o presente estudo demonstrou que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos no NPBL aumenta o apetite ao sódio induzido por PH-RP em SHR, e essa alteração na ingestão de sódio não seria devido à queda da PAM. Desta forma, podemos concluir que os mecanismos inibitórios do NPBL contribuem para limitar a ingestão de sódio também em SHR.

Palavras-chave: hipertensão, sódio, desidratação, tronco encefálico, receptores adrenérgicos.

ABSTRACT

Excessive salt intake has been associated with the development or worsening of chronic diseases such as hypertension. Spontaneously hypertensive rats (SHR) have a typical increased sodium preference. The lateral parabrachial nucleus (LPBN) acts as an important inhibitory mechanism for sodium intake control, besides its involvement in cardiovascular control in normotensive rats. However, the involvement of LPBN in cardiovascular control and sodium appetite is still unknown in SHR. The aim for the present study was to evaluate cardiovascular responses and 0.3 M NaCl intake after α_2 -adrenergic receptors activation in LPBN in this model of essential hypertension. In SHR, bilateral injections of moxonidine (α_2 -adrenergic/imidazolinereceptors agonist) in LPBN increased 0.3 M NaCl intake induced by water deprivation – partial rehydration protocol (WD-PR), without changes in water intake. However, LPBN moxonidine injections did not significantly change 0.3 M NaCl or water intake induced by WD-PR in normotensive Holtzman rats. In normohydrated SHR moxonidine injections into the LPBN did not change 0.3 M NaCl and water intake, mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and baroreflex responses. The WD-PR protocol did not change baseline values of MAP and HR in SHR, neither after LPBN moxonidine injections. It was also observed that LPBN moxonidine injections in SHR resulted in a positive sodium balance, characterized by increased 0.3 M NaCl intake during the sodium appetite test followed by increased renal sodium excretion and urinary volume at the end of the experiment. Therefore, present results show that α_2 -adrenergic/imidazolinereceptors activation in the LPBN increases WD-PR-induced sodium appetite in SHR. This effect is not related to changes in arterial pressure. Therefore, we can conclude that LPBN inhibitory mechanisms contribute to limit sodium intake also in Spontaneously Hypertensive Rats.

Key words: hypertension, sodium, dehydration, brainstem, adrenergic receptors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em SHR durante condições basais (controle), após 24 h de privação hídrica (PH) após 2 h reidratação parcial (RP)	48
Tabela 2: Variação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em SHR após 2 h reidratação parcial (RP), após 5, 10 e 30 min de administração bilateral de moxonidina no NPBL	48
Tabela 3: Volume urinário (VU, ml) e excreção urinária de Na ⁺ e K ⁺ (μ Eq) em animais submetidos a ciclos de privação hídrica (PH) e reidratação parcial (PH-RP).....	52
Tabela 4: Concentrações séricas de sódio e potássio, proteínas totais no soro, atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma de animais controles (normoidratados) e animais submetidos ao protocolo de privação hídrica de 24 horas seguido de 2 horas de reidratação parcial (PH-RP)	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotomicrografias de cortes coronais de encéfalos de animais representativos dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas) em HTZ (A) e SHR (B) 39
- Figura 2:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M (ml) e B) água (ml) em ratos SHR normoidratados que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais 41
- Figura 3:** Ingestão diária de A) NaCl 0,3 M (ml/24h) e B) de água (ml/24h) em ratos normotensos (HTZ) e hipertensos (SHR). Valores são representados como média ± EPM; n = número de animais por grupo 43
- Figura 4:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M (ml) e B) água (ml) em ratos SHR e HTZ submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial (PH-RP) que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais 45
- Figura 5:** A) Variação de pressão arterial média (PAM, mmHg) e B) variação de frequência cardíaca (FC, bpm), em ratos SHR não anestesiados normoidratados que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = 10 47
- Figura 6:** A) Excreção cumulativa de Na⁺ (µEq), B) excreção cumulativa de K⁺ (µEq) e C) volume urinário cumulativo em ratos SHR e HTZ submetidos ao protocolo de PH-RP que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL 15 min antes do acesso ao NaCl 0,3 M e água para ingestão. A coleta de urina foi feita a cada 30 min, iniciando-se após o oferecimento dos bebedouros. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais 53
- Figura 7:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M (mEq) e B) água (ml) em ratos SHR e HTZ durante a fase do apetite ao sódio induzido pelo protocolo de PH-RP, que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais 54
- Figura 8:** Balanço de sódio em ratos SHR e HTZ em ratos SHR e HTZ durante a fase do apetite ao sódio induzido pelo protocolo de PH-RP, que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

± - mais ou menos;

ANG I – angiotensina I;

ANG II – angiotensina II;

ANOVA – análise de variância;

ANP – peptídeo natriurético atrial;

AP – área postrema;

AT₁ – receptor de angiotensina do subtipo AT₁;

AT₂ - receptor de angiotensina do subtipo AT₂;

AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo;

bpm – batimentos por minuto;

CAP – captopril;

CCK – colecistocinina;

CRF – fator liberador de corticotrofina;

DOCA – desoxicorticosterona;

ECA – enzima conversora de angiotensina

EPM – erro padrão da média;

FC – frequência cardíaca;

FURO – furosemida;

g – grama(s);

h – hora(s);

HCl – ácido clorídrico;

HTZ – Holtzman;

i.c.v. – intracerebroventricular;

K⁺ - íon potássio;

kg – quilograma(s);

l – litro(s);

LEC – líquido extracelular;

LIC – líquido intracelular;

M – molar (número de mols/litro);

mEq – miliequivalente(s);

mg – miligrama(s);

min– minutos;

ml – mililitro(s);
mm – milímetro(s);
mmHg – milímetros de mercúrio;
mmol – milimolar(es);
MnPO – núcleo pré-óptico mediano;
mOsm – miliosmol(es);
n - número de animais;
Na⁺ - íon sódio;
NaCl – cloreto de sódio;
ng – nanograma(s);
nmol – nanomol(es);
NPBL – núcleo parabraquial lateral;
NPV – núcleo paraventricular;
NSO – núcleo supra-óptico;
NTS – núcleo do trato solitário;
OCVs – órgãos circumventriculares;
OSF – órgão subfornical;
OT – ocitocina;
OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal;
P.C. – peso corporal;
PAM – pressão arterial média;
pcs – pedúnculo cerebelar superior;
pg – picograma(s);
PH – privação hídrica;
pré-LC – pré *Locus coeruleus*;
RP – reidratação parcial;
rpm – rotações por minuto;
RVLm – região rostro ventrolateral do bulbo;
s.c. – subcutâneo/subcutaneamente;
SHR – ratos espontaneamente hipertensos;
SNC – sistema nervoso central;
UI – unidades internacionais;
VEI – veículo;
VL – ventrículo lateral;

vs – versus;

VU – volume urinário;

WKY – Wistar Kyoto;

α_2 – alfa 2;

μEq – micro equivalente;

μg – micrograma(s);

μl – microlitro(s);

μm – micrometro (s).

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	177
2) OBJETIVO	29
3) MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Cirurgia para implante de cânulas em direção ao NPBL	30
3.3 Fármacos utilizados.....	31
3.4 Injeções no NPBL	31
3.5 Teste de ingestão de NaCl 0,3 M e água	32
3.5.1 Ingestão de água e NaCl 0,3 M após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL em animais SHR normoidratados.	32
3.5.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica e reidratação parcial após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL em HTZ e SHR	32
3.6 Canulação da artéria e veia femoral.....	34
3.7 Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e barorreflexo	34
3.7.1 Registro da PAM, FC e barorreflexo após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL de SHR.....	35
3.8 Determinação da excreção renal de sódio, potássio e volume urinário.....	35
3.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	36
3.10 Análise histológica	37
3.11 Análise estatística	37
4) RESULTADOS.....	38
4.1. Análise histológica	38
4.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em animais espontaneamente hipertensos (SHR) normoidratados após ativação adrenérgica α_2 no NPBL.	40
4.3. Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M em animais normotensos (HTZ e espontaneamente hipertensos (SHR)).	42
4.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica e reidratação parcial em animais hipertensos (SHR) e normotensos (HTZ) após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL.....	44
4.5. Pressão arterial media, frequência cardíaca e teste do barorreflexo em SHR após injeções bilaterais de moxonidina no NPBL.	46
4.6 Excreção renal em animais SHR e normotensos (HTZ) submetidos a PH-RP após a ativação adrenérgica α_2 no NPBL.....	49
4.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em animais espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos a privação hídrica, espontaneamente NÃO reidratados, após ativação adrenérgica α_2 no NPBL.	56
5) DISCUSSÃO	57
6) CONCLUSÃO.....	65
7) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	666

1) INTRODUÇÃO

Regulação neuroendócrina da ingestão de água e sódio

O comportamento de ingestão de água e substâncias contendo NaCl é fundamentalmente importante para um indivíduo restabelecer suas necessidades de água e NaCl. A água se destaca como sendo um dos constituintes mais abundantes do organismo humano, e contribui com cerca de 60% da massa corporal. O volume total de água do corpo humano se distribui entre dois compartimentos: intra e extracelular. O líquido intracelular (LIC), o volume do interior de todas as células, corresponde a 1/3 do volume de água corporal. Já o líquido extracelular (LEC), correspondente ao volume intravascular mais o volume intersticial, comporta 2/3 do volume de água corporal (GUYTON; HALL, 2000; VERBALIS, 2003). O LIC e o LEC são separados por uma membrana plasmática semipermeável, que possui diversos transportadores, mantendo estes dois compartimentos com distintas constituições de solutos. Dentre as diferenças entre o LIC e o LEC destaca-se as concentrações de íon sódio e íon potássio, em que observamos uma maior concentração de K^+ e menor concentração de Na^+ no LIC, e o oposto no LEC (GUYTON; HALL, 2000; VERBALIS, 2003; BOURQUE, 2008). O íon sódio é o principal determinante da osmolaridade e volume do LEC, e encontra-se em uma estreita faixa de variação (138 a 146 mmol/l).

Para que o equilíbrio hidroeletrólítico seja mantido é necessário que os ganhos e perdas de água e sódio do organismo sejam equivalentes. A desidratação ocorre em resposta à perda de água e/ou ao aumento na concentração de solutos osmoticamente ativos, principalmente do sódio. A diminuição de água no LEC ou LIC ocorre devido à excreção renal, fezes, transpiração e pelo ar expirado, e o excesso de solutos pode ocorrer, por exemplo, pelo consumo de sódio na alimentação (ANTUNES-RODRIGUES et al.,

2012). Perante a tais perturbações, mecanismos distintos são ativados para propiciar ajustes de ingestão e excreção de água e sódio, permitindo assim o restabelecimento do balanço hidroeletrólítico do organismo (JOHNSON; EDWARDS, 1990; MCKINLEY; JOHNSON, 2004; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

A redução do volume do líquido celular é característica da desidratação celular. Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento na pressão osmótica efetiva do compartimento extracelular, promovendo uma redução do volume de água das células, caracterizando assim a “desidratação intracelular”. Por outro lado, quando há perda de água e solutos apenas do compartimento extracelular, como nos casos de hemorragia, diarreia e vômito, a desidratação é dita extracelular (ou hipovolêmica). É importante ressaltar que nessa situação ocorre uma perda conjunta de água e sódio, sendo assim ela é geralmente acompanhada de um comportamento de apetite ao sódio. A desidratação pode ser dita absoluta quando há perda de água dos compartimentos intra e extracelular, como acontece em situação de privação hídrica, ou pode ser dita relativa se houver apenas uma perda de água no compartimento intracelular, que se difunde através membrana plasmática para o compartimento extracelular, como, por exemplo, na ingestão ou sobrecarga de solutos osmoticamente ativos. Embora os dois tipos de desidratação sejam experimentalmente e clinicamente separáveis, é comum que ambas ocorram simultaneamente, principalmente durante o período de privação hídrica (DE LUCA JR; VIVAS; MENANI, 2005; JOHNSON, 2007).

A ingestão de água e sódio associados à função renal de reabsorção destas substâncias permite que ocorra uma regulação do volume e da osmolaridade dos líquidos corporais. A função renal é de extrema importância para a regulação do balanço hidroeletrólítico, todavia somente esta resposta não é suficiente, o que torna necessário a manifestação de comportamentos motivados que sejam capazes de repor a água e sódio em

falta no organismo. Sede e apetite ao sódio são exemplos destes comportamentos motivados, que impulsionarão os animais à busca, aquisição e ingestão de água e sódio, respectivamente. Esses comportamentos são essenciais para o restabelecimento do equilíbrio hidroeletrolítico (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2012). A consumação do comportamento de apetite ao sódio é caracterizada por uma ingestão seletiva de sódio, assim como num aumento da palatabilidade e aceitação de soluções em concentrações que normalmente seriam evitadas (RICHTER, 1939; EPSTEIN; STELLAR, 1955; MORRISON; YOUNG, 1972).

Em situações de hipovolemia ocorre a ativação de um importante sistema hormonal, o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Inicialmente, a renina, uma enzima proteolítica sintetizada e armazenada pelas células justaglomerulares, age sobre o substrato plasmático, o angiotensinogênio (uma globulina produzida pelo fígado), produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I). A ANG I sob a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) localizada especialmente no endotélio dos pulmões, sendo também encontrada nos rins e nas células endoteliais do sistema vascular sistêmico, produz um octapeptídeo ativo, denominado angiotensina II (ANG II). Sabe-se que a fonte de renina é o aparelho justaglomerular renal, e que as células da mácula densa também exercem importante função no controle da secreção da renina. Fatores como redução da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores do subtipo β_1 adrenérgicos, catecolaminas ou prostaglandinas circulantes, ativam a secreção de renina (FITZSIMONS, 1998). Em contrapartida, ANG II e vasopressina inibem a secreção de renina.

Estudos anteriores de Fitzsimons et. al. [para revisão vide (FITZSIMONS, 1998)] foram os pioneiros em demonstrar que a ANG II era eficaz como estímulo dipsogênico. A ANG II, além de estimular a ingestão de água e sódio, apresenta outras funções fisiológicas como por exemplo, a regulação da pressão arterial, excreção de sódio, e a secreção de

vasopressina (FITZSIMONS, 1998). Receptores centrais para ações da ANG II já foram demonstrados em diversas áreas encefálicas como órgão subfornical (OSF), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), núcleo paraventricular (NPV), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), área postrema (AP) e núcleo do trato solitário (NTS) (LEWIS et al., 1986; MCKINLEY et al., 1987; ALLEN; MCKINLEY; MENDELSON, 1988). Os receptores de ANG II denominados de AT₁, dentre os vários que existem (são conhecidos ao menos quatro), são os mais importantes para seu efeito dipsogênico e estão presentes em órgãos circumventriculares prosencefálicos, tais como SFO e OVLT, podendo haver também alguma participação de receptores AT₂ (FITZSIMONS, 1998).

A aldosterona, um mineralocorticoide, também tem papel fundamental na conservação do sódio no organismo e é o sinal endócrino final do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A secreção de aldosterona pela zona fasciculada da adrenal é regulada pela ANG II e concentração extracelular de potássio. A aldosterona atua nos ductos coletores renais e cólon para regular a (re)absorção de sódio e secreção de potássio (BOOTH; JOHNSON; STOCKAND, 2002). Os hormônios peptídeo natriurético atrial (ANP) e a ocitocina (OT) são secretados na circulação sanguínea durante o aumento de volume, e ambos têm ação natriurética. Isto é, eles atuam reduzindo a volemia e a concentração de sódio, ações contrárias às da ANG II e aldosterona. O ANP, um peptídeo sintetizado pelos miócitos atriais, participa da manutenção do volume por produzir diurese e natriurese. Além de agir centralmente inibindo a sede e o apetite ao sódio. A OT é sintetizada no corpo celular de neurônios magnocelulares do NPV e do núcleo supra-óptico (NSO) e liberada para a corrente sanguínea em situações de hiperosmolaridade e possui ações semelhantes ao ANP (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2014).

O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. O animal foi

privado de água por 24 horas, e ao final desse período observa-se aumento da osmolaridade e sódio plasmáticos, hipovolemia e aumento da atividade de renina plasmática. O período de reidratação parcial (2 horas de acesso apenas à água) corrige totalmente o aumento da osmolaridade plasmática e parcialmente a hipovolemia, enquanto que o aumento da atividade de renina plasmática permanece elevado até o início do teste do apetite ao sódio (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010). Após o período de reidratação parcial o animal passa a ter também livre acesso ao NaCl 0,3 M por mais 2 horas (teste do apetite ao sódio). No momento em que o animal tem acesso a solução de sódio, estão presentes a hipovolemia e aumento de angiotensina II como sinais facilitadores para o apetite ao sódio, enquanto que o sinal inibitório da hipertonicidade para a ingestão de sódio já foi removido. A subsequente ingestão de sódio corrige totalmente o volume do líquido extracelular e a perda de sódio que ocorreu pela natriurese durante o período de privação hídrica (DE LUCA et al., 2002).

A ingestão de água e NaCl é regulada por mecanismos que são ativados em situações de alterações da osmolaridade plasmática ou hipovolemia e depende de receptores localizados em diferentes partes do corpo (barorreceptores e osmorreceptores, por exemplo) ou então depende de hormônios (angiotensina II e aldosterona) que ativam regiões específicas do sistema nervoso central (SNC), desencadeando as respostas comportamentais de busca pela água (sede) e NaCl (apetite ao sódio) (JOHNSON, A.; THUNHORST, R., 2007; HURLEY; JOHNSON, 2015). A manifestação destes comportamentos é regulada por um complexo circuito neural que é composto tanto de mecanismos facilitatórios como inibitórios, os quais recebem informações relativas aos líquidos corporais. Osmorreceptores presentes no trato gastrointestinal e encéfalo, e barorreceptores, que inervam a parede vascular, monitoram respectivamente osmolaridade e volume. Receptores de hormônios tais como angiotensina II e aldosterona sinalizam o encéfalo sobre hipovolemia a partir da ativação de algumas regiões encefálicas específicas (JOHNSON, 2007; HURLEY;

JOHNSON, 2015). Sabe-se que aumentos da pressão arterial (detectadas por barorreceptores) constituem um importante estímulo inibitório para a ingestão de sódio (ROBINSON; EVERED, 1987; JOHNSON, 2007). Já a ativação de osmorreceptores, por alterações de osmolaridade estimulam a ingestão de água e secreção de vasopressina (VERNEY, 1947; DE LUCA JR; BARBOSA; MENANI, 2003). Além disso, receptores gustatórios também influenciam o controle da ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2011; GASPARINI; MENANI; DANIELS, 2015).

Núcleo parabraquial lateral e inibição da ingestão de sódio

Vários estudos já mostraram um importante mecanismo inibitório para o controle sobre a ingestão de água e especialmente da ingestão de sódio, que se localiza no núcleo parabraquial lateral (NPBL) (ANDRADE et al., 2014; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014) 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 (NORGREN, 1981; CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984; FULWILER; SAPER, 1984; LANCA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; KRUKOFF; HARRIS; JHAMANDAS, 1993; JHAMANDAS et al., 1996) (JOHNSON; THUNHORST, 1997; JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L., 2007). O NPBL também envia projeções para áreas prosencefálicas essenciais para o controle do balanço hidroeletrólítico como o núcleo preóptico mediano, os núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo e o núcleo central da amígdala (NORGREN, 1981; CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984; FULWILER; SAPER, 1984; LANCA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; KRUKOFF; HARRIS; JHAMANDAS, 1993; JHAMANDAS et al., 1996). Esta inibição da ingestão de sódio ocasionado pelo mecanismo inibitório do NPBL provavelmente deve ser para prevenir a

ingestão excessiva de solutos (ANDRADE et al., 2014; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

Diferentes neurotransmissores e receptores no NPBL afetam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL. Serotonina, colecistocinina (CCK), fator liberador de corticotrofina (CRF) e glutamato atuam no NPBL ativando mecanismos inibitórios e reduzindo a ingestão de sódio e ocasionalmente de água (MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996; MENANI; JOHNSON, 1998; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2009). Por outro lado, ativação de receptores adrenérgicos α_2 , receptores opióides, GABAérgicos ou purinérgicos reduz a atividade dos mecanismos inibitórios aumentando a ingestão de sódio ou até mesmo desencadeando ingestão não estimulada de sódio (ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA; DE LUCA; MENANI, 2008; GASPARINI et al., 2009).

Injeções bilaterais no NPBL de metisergida, um antagonista de receptores serotoninérgicos, aumenta a ingestão de NaCl induzida tanto pela ANG II administrada intracerebroventricular (icv) e também no órgão subfornical (OSF) (MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996; MENANI; JOHNSON, 1998; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2009), quanto pelo tratamento FURO + CAP s.c. (MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996; MENANI; JOHNSON, 1998; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2009). Por outro lado, a injeção de DOI (agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) no NPBL reduziu a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento com FURO + CAP s.c. (MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996; MENANI; JOHNSON, 1998; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2009). Além disso, metisergida injetada no NPBL aumenta a ingestão de água e NaCl hipertônico induzida por 24 horas de privação hídrica, depleção de sódio (furosemida s.c. seguida de 24 horas de dieta deficiente de sódio) ou pelo

tratamento crônico com desoxicorticosterona (DOCA), um composto esteróide com propriedades semelhantes a aldosterona (MENANI et al., 1998; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 1998; DE GOBBI; DE LUCA; MENANI, 2000). Metisergida no NPBL combinada com o aumento da osmolaridade plasmática produzido por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M também induz uma paradoxal ingestão de NaCl hipertônico (DE LUCA JR; BARBOSA; MENANI, 2003).

A ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções bilaterais de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos) ou noradrenalina produz um potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzido pelo tratamento subcutâneo do diurético furosemida (FURO) combinado com o baixado do inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (CAP) (ANDRADE et al., 2004; GASPARINI et al., 2009; ANDRADE-FRANZE et al., 2010). O potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pela administração de moxonidina no NPBL (mais do que dez vezes a quantidade ingerida pelos controles tratados com FURO + CAP s.c. e veículo no NPBL) foi completamente abolido pelo RX 821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , indicando que a moxonidina produz um potente, seletivo e específico aumento da ingestão de NaCl hipertônico pela ação em receptores adrenérgicos α_2 , (ANDRADE et al., 2004). Em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 centrais podem reduzir os efeitos dos mecanismos inibitórios que limitam a ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2004; GASPARINI et al., 2009; ANDRADE-FRANZE et al., 2010). Como já demonstrado anteriormente, os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL sobre a ingestão de sódio não são devido a uma facilitação não específica de todos os comportamentos ingestivos, uma vez que a ingestão de solução de sacarose ou a ingestão de alimento não são alteradas pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2007).

Estudos recentes mostraram que injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não alteraram a excreção de sódio e volume urinário induzido por FURO+CAP em animais normotensos sem acesso a água e NaCl 0,3 M, entretanto quando estes animais tiveram livre acesso a buretas de água e NaCl 0,3 M, observou-se um aumento na excreção de sódio e volume urinário. Este aumento observado, provavelmente é uma expansão volumétrica induzida pela ingestão massiva de água e principalmente sódio, ocasionado pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL (CABRAL; ANDRADE, 2016). Neste mesmo estudo, foi observado uma diminuição da excreção renal de sódio e volume urinário, após injeções bilaterais de moxonidina no NPBL de animais que foram reidratados após desidratação extracelular (FURO+CAP), sugerindo assim que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL reduz a excreção renal de sódio e água durante a reidratação após desidratação extracelular (CABRAL; ANDRADE, 2016).

NPBL e a regulação cardiovascular

Muitos estudos já demonstraram o envolvimento do NPBL também com a regulação cardiovascular [para revisão vide (DAVERN, 2014)]. Estudos eletrofisiológicos demonstram que os neurônios do NPBL são ativados por estímulos cardiovasculares, (WARD, 1988; JHAMANDAS; AIPPERSBACH; HARRIS, 1991; JHAMANDAS; HARRIS, 1992). Tal fato foi confirmado por estudos imunohistoquímicos, na qual foi demonstrado que no NPBL ocorre um aumento da imunorreatividade para a proteína Fos, um marcador de ativação neuronal, após hemorragia (CHAN; SAWCHENKO, 1994) ou alterações farmacológicas da pressão arterial (ROCHA; HERBERT, 1996; POTTS et al., 1997; HORIUCHI et al., 1999; MILLER et al., 2012).

Outros estudos mostram que a injeção de glutamato no NPBL aumenta a pressão arterial e a atividade simpática, (HADE et al., 1988; WARD, 1988). A estimulação elétrica ou

glutamatérgica do NPBL também atenua a redução da pressão arterial e a inibição da atividade simpática renal produzida pela estimulação elétrica do nervo depressor aórtico, enquanto que a inativação do NPBL com ácido cálcico facilita a hipotensão sem mudar significativamente a inibição da atividade simpática renal produzida pela estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (HAYWARD; FELDER, 1998). Além disso, lesões do NPBL atenuam a hipertensão renal crônica e também a produzida por infusão crônica de angiotensina II (FINK et al., 1991; MORTENSEN; OHMAN; HAYWOOD, 1994), indicando assim que o NPBL está envolvido na fisiopatologia de certos modelos de hipertensão. Entretanto, várias evidências correlacionam o consumo excessivo de sal ao desenvolvimento ou agravamento de doenças crônicas, incluindo a hipertensão (WHO, 2006; HE; MACGREGOR, 2012; WHO, 2012). Estima-se que a quantidade diária de sódio consumida pela população brasileira é de 4,5 g por pessoa, independente da região ou classe de renda, excedendo assim em mais de duas vezes o limite recomendado de ingestão desse nutriente (SARNO et al., 2009; SARNO et al., 2013). O excesso de sódio ingerido na maioria das vezes está associado ao aumento da palatabilidade dos alimentos (KEAST; BRESLIN, 2003; LIEM; MIREMADI; KEAST, 2011).

Apesar do efeito anti-hipertensivo da ativação de receptores imidazólicos no RVLm (ERNSBERGER et al., 1993; HAXHIU et al., 1994; ERNSBERGER; HAXHIU, 1997), a moxonidina injetada bilateralmente no NPBL não alterou pressão arterial média e frequência cardíaca de animais normovolêmicos ou após uma hora do tratamento com FURO+CAP (ANDRADE et al., 2004).

Modelo animal de hipertensão essencial

Ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats – SHR*) têm sido usados como modelo para hipertensão arterial em humanos (OKAMOTO; AOKI, 1963).

Em animais SHR, a pressão arterial começa a aumentar poucas semanas após o nascimento e atinge os níveis hipertensivos após 12 a 14 semanas, principalmente devido a aumentos da atividade simpática e angiotensinérgica e ao envolvimento de mecanismos centrais (HAEUSLER; FINCH; THOENEN, 1972 ; MORI, 1973; JUDY et al., 1976; BRODY; O'NEILL; PORTER, 1984). Estes animais, além de apresentarem elevados níveis de pressão arterial, apresentam uma ingestão diária de NaCl maior do que as outras linhagens de ratos normotensos[vide Refs. (ELY; TURNER; MILSTED, 2000; DI NICOLANTONIO, 2004) para revisão]. A presença de mecanismos centrais para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão em animais SHR foi descrita para o tronco encefálico, particularmente no NTS comissural e AP, (MANGIAPANE et al., 1989; AKEMI SATO et al., 2001; SATO; COLOMBARI; MORRISON, 2002; SATO et al., 2003). Estudo de Moreira e cols. (2009) demonstrou que lesões simultâneas da região AV3V e NTS comissural produzem uma redução duradoura da pressão arterial (pelo menos 40 dias) em SHR adultos, sugerindo que mecanismos prosencefálicos e do tronco encefálico, particularmente os relacionados com a região AV3V e NTS comissural, agem para manter a hipertensão em animais SHR (MOREIRA et al., 2009).

O acentuado apetite ao sódio que é observado em SHR consiste mais em uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina central do que uma alteração do equilíbrio hidroeletrólítico (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; DI NICOLANTONIO, 2004), e o bloqueio da produção encefálica de angiotensina, com captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduz a ingestão de sódio em SHR,(DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; DI NICOLANTONIO, 2004). Além disso, os SHR também apresentam uma maior imunorreatividade à proteína c-Fos na lâmina terminal em resposta tanto a infusão central ou sistêmica de ANG II (ROWLAND et al., 1995; BLUME et al., 1997). Outros estudos

mostram que em resposta ao teste do apetite ao sódio induzido pelo protocolo de privação hídrica com reidratação parcial (PH-RP), os SHR ingeriram próximo de 10 vezes mais do que linhagens normotensas Wistar Kyoto (WKY) ou Holtzman (HTZ). Além disso, após a PH-RP todos os animais apresentaram um aumento no número de células com imunorreatividade da proteína Fos em áreas encefálicas que controlam o apetite ao sódio (OSF, OVLT, MnPO, NTSc), quando comparado em situação normovolêmica. Em contrapartida, os animais SHR apresentaram um maior aumento na imunorreatividade da proteína Fos em áreas como órgão subfornical (OSF), região comissural núcleo do trato solitário (NTSc) e pré *locus coeruleus* (pré-LC) em comparação as linhagens de ratos normotensos (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

Apesar da importância do NPBL sobre os parâmetros cardiovasculares e sobre o comportamento de ingestão de sódio em animais normotensos, ainda é desconhecida a participação dos mecanismos do NPBL para o controle da ingestão de sódio e regulação cardiovascular em animais SHR.

2) OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo verificar a importância do NPBL para o controle do equilíbrio hidromineral e controle dos parâmetros cardiovasculares em modelo animal de hipertensão essencial. Para tanto foi investigado se em ratos SHR:

- 1) O bloqueio do mecanismo inibitório do NPBL, por meio da ativação de receptores adrenérgicos α_2 nessa área, induz ingestão espontânea de NaCl 0,3 M;
- 2) O bloqueio do mecanismo inibitório do NPBL, por meio da ativação de receptores adrenérgicos α_2 nessa área, altera o apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial;
- 3) A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL altera pressão arterial e frequência cardíaca basais e após privação hídrica e reidratação parcial;
- 4) A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL altera a excreção renal e balanço de sódio durante a fase do apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman e ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHR – 6 a 8 meses), com peso em torno de 250 - 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável suspensas em estantes (gaioleiros), com livre acesso a ração comercial, água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 – 19:00 h). Os protocolos propostos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/ FOAR (protocolo número: 18/2015).

3.2 Cirurgia para implante de cânulas em direção ao NPBL

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e posicionados em um aparelho estereotáxico (Kopf, Tujunga, EUA) com o crânio nivelado entre o bregma e o lambda. Duas cânulas-guia de aço inoxidável foram implantadas bilateralmente logo acima do NPBL (coordenadas HTZ: 9,3 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à sutura central e 3,7 mm abaixo da dura máter; SHR: 9,3 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à sutura central e 4,1 mm abaixo da dura máter). As pontas das cânulas-guia foram posicionadas 2 mm acima do NPBL. Estas cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica dental e parafusos. Exceto durante as injeções, um mandril de metal foi utilizado para o preenchimento e fechamento da extremidade externa das cânulas-guia. Ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina – 80,000 UI + estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, Brazil)

e uma injeção subcutânea de um analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, Brasil). Diariamente os ratos foram manipulados e treinados com manobras utilizadas durante os procedimentos experimentais. Os experimentos foram realizados 5-7 dias após o implante das cânulas no NPBL.

3.3 Fármacos utilizados

Cloridrato de moxonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, (Sigma), foi dissolvido em veículo (propilenoglicol/água 2:1) e injetado do NPBL em doses de 0,5 nmol/0,2 μ l, (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2015; CABRAL; ANDRADE, 2016).

Fenilefrina, um vasoconstritor (Sigma), foi dissolvido em salina e administrado na dose de 5 μ g/kg/ml, via intravenosa (VIEIRA et al., 2004). **Nitroprussiato de sódio**, um vasodilatador (Sigma), foi dissolvido em salina e administrado na dose de 30 μ g/kg/ml, via intravenosa (VIEIRA et al., 2004).

3.4 Injeções no NPBL

A administração de drogas no NPBL foi feita utilizando-se seringa Hamilton de 5 μ l (Hamilton, Reno, EUA) conectada por um tubo de polietileno (PE – 10; Clay Adams, Parsippany, EUA) a uma agulha injetora. No momento dos testes, os animais foram retirados de suas gaiolas, o mandril de metal foi removido e a agulha injetora (2 mm mais longa que a cânula-guia) foi introduzida no encéfalo através da cânula-guia. O volume injetado foi de 0,2 μ l em cada lado no NPBL. Após as injeções o mandril de metal foi recolocado e os ratos realocados em suas gaiolas.

3.5 Teste de ingestão de NaCl 0,3 M e água

A ingestão de NaCl 0,3 M e água foi mensurada em ratos mantidos em suas gaiolas originais. Momentos antes do início do experimento, água, NaCl 0,3 M e ração foram removidos. Quinze minutos após as injeções no NPBL (ver protocolos experimentais) dois bebedouros graduados conectados a bicos de metal, um contendo água e outro NaCl 0,3 M, foram oferecidos aos animais e a ingestão foi medida em intervalos de 30 minutos durante 2 horas de acordo com os protocolos experimentais. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.5.1 Ingestão de água e NaCl 0,3 M após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL em animais SHR normoidratados.

Ratos SHR normoidratados receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (0,2 μ l) no NPBL. A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi mensurada nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, começando 15 após a injeção no NPBL. Os animais foram submetidos a dois testes. Em cada teste os animais foram divididos em 2 grupos que receberam diferentes tratamentos no NPBL (veículo ou moxonidina). A sequência de tratamentos foi aleatória e no final dos testes todos os ratos receberam todos os tratamentos. Os testes foram realizados com intervalo mínimo de 72 h entre eles.

3.5.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica e reidratação parcial após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL em HTZ e SHR.

Os animais foram submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial (PH-RP) [24 horas de privação hídrica (PH) e 2 horas de reidratação parcial (RP), (SATO; YADA; DE LUCA, 1996; DE LUCA et al., 2002)].

O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. O animal foi privado de água por 24 horas, e ao final desse período observa-se aumento da osmolaridade e sódio plasmáticos, hipovolemia e aumento da atividade de renina plasmática. O período de reidratação parcial (2 horas de acesso apenas à água) corrige totalmente o aumento da osmolaridade plasmática e parcialmente a hipovolemia, enquanto que a atividade de renina plasmática permanece elevada até o início do teste do apetite ao sódio (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010). Após o período de reidratação parcial o animal passa a ter também livre acesso ao NaCl 0,3 M por mais 2 horas (teste do apetite ao sódio). No momento em que o animal tem acesso a solução de sódio, estão presentes a hipovolemia e aumento de angiotensina II como sinais facilitadores para o apetite ao sódio, enquanto que o sinal inibitório da hipertonidade para a ingestão de sódio já foi removido. A subsequente ingestão de sódio corrige totalmente o volume do líquido extracelular e a perda de sódio que ocorreu pela natriurese durante o período de privação hídrica (DE LUCA et al., 2002).

Quinze minutos do término do período de reidratação parcial, ou seja, 15 min antes do acesso ao NaCl 0,3 M para o teste do apetite ao sódio, os animais receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo (0,2 µl) no NPBL. A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi avaliada nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, começando 15 após o acesso ao NaCl 0,3 M e água. Os animais foram submetidos a dois testes. Em cada teste os animais foram divididos em 2 grupos que receberam diferentes tratamentos no NPBL (veículo ou moxonidina). A sequência de tratamentos foi aleatória e no final dos testes todos os ratos receberam todos os tratamentos. Os testes foram realizados com

intervalo mínimo de 72 h entre eles. Os animais que não ingeriram água (0 ml) até o término o período de reidratação parcial, e, portanto, não tiveram a sede saciada previamente ao teste do apetite ao sódio, foram excluídos da análise dos dados.

3.6 Canulação da artéria e veia femoral

Um dia antes dos experimentos de registro de PAM e FC foi realizada a canulação da artéria e veia femorais. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Sob anestesia pela quetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal), a cânula arterial foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral e uma outra cânula foi introduzida na veia femoral. Uma vez implantadas, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente, com auxílio de um trocater, para a região escapular do rato, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial pulsátil e a cânula venosa utilizada para administração sistêmica de drogas.

3.7 Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e barorreflexo

Para o registro da pressão arterial pulsátil, PAM, FC e barorreflexo, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, EUA) que foi conectado a um sistema de aquisição de dados (modelo Powerlab 16SP; ADInstruments, Castle Hill, Australia) (ver protocolos experimentais abaixo).

3.7.1 Registro da PAM, FC e barorreflexo após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL de SHR.

- Testes em animais normoidratados

Após um período de registro basal (30 minutos), veículo foi injetado bilateralmente no NPBL e a PAM e FC continuaram a ser registradas por mais 15 minutos. Em seguida foi feito o teste do barorreflexo por indução de fenilefrina (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ml}$) e nitroprussiato de sódio (30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ml}$). Após 15 minutos, moxonidina (0,5 nmol/0,2 μl) foi injetada bilateralmente no NPBL e a PAM e FC continuaram a ser registradas por mais 30 minutos após este tratamento. Ao final dos 30 minutos de registro após injeções de moxonidina, o teste do barorreflexo foi repetido.

- Testes em animais com PH-RP

Antes do início do protocolo de PH-RP, os bebedouros contendo água e NaCl 0,3 M foram removidos e foi feito um registro basal da PAM E FC dos animais normoidratados por 30 minutos, em seguida foram removidos os bebedouros de água e NaCl 0,3 M destes animais para início do protocolo de privação. Após privação hídrica de 24 h, foi feito um registro basal da PAM e FC por 30 minutos. Logo em seguida, os animais passaram pelo período de reidratação parcial de 2 h, em que ao final foi feito o registro da PAM e FC (15 minutos). Então foi administrado veículo bilateralmente no NPBL e foi registrada a PAM e FC por 15 minutos. Após retorno dos valores de PAM e FC aos níveis basais, foi injetado moxonidina no NPBL e o registro continuou por mais 30 minutos.

3.8 Determinação da excreção renal de sódio, potássio e volume urinário.

Os ratos foram previamente ambientados para os experimentos em gaiolas metabólicas (permanência de 1 hora na gaiola metabólica durante 3 dias). Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas e foram submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial – PH-RP. As amostras de urina foram coletadas em tubos de polipropileno (graduados em 0,1 ml) para determinação do volume urinário. A concentração de sódio e potássio na urina foi feita por um analisador de sódio e potássio eletrodo sensitivo (Nova 1, Nova Biomedical), e a quantidade de sódio na urina foi determinada pelo produto do volume urinário vezes a concentração do íon na urina. (ANDRADE et al., 2012; CABRAL; ANDRADE, 2016).

3.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (concentração de sódio e potássio, proteínas plasmáticas totais, atividade de enzima conversora de angiotensina) os animais em condições controle ou submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial – PH-RP - foram decapitados ao final do período experimental e foi feita a coleta do sangue troncular em tubos contendo gel separador (SST, Becton Dickinson, San Jose, CA), que foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos à 4°C para a obtenção de soro. As análises da concentração sérica de sódio e potássio e de proteína total sérica foram realizadas em equipamento Vitros 250 (Johnson) por química seca (potenciometria e método bioreto e bromocresol, respectivamente).

A determinação da atividade de enzima conversora de angiotensina plasmática foi feita baseada no método da hidrólise do substrato Hipuril-His-Leu, (SANTOS; KRIEGER; GREENE, 1985; GOMEZ-ROSO et al., 2009). Resumidamente, as amostras de plasma foram misturadas com 1 mM de hipuril-L-histidil-L-leucina (Hipuril-His-Leu, Sigma), e a mistura foi incubada a 37°C durante 20 min. Depois a reação foi interrompida pela adição de NaOH

(0,5 M), o-ftalaldeído (Sigma) 1% em etanol foi adicionado, a mistura foi mantido à temperatura ambiente por 4 min e, em seguida, HCl (6 M) foi adicionado. Depois disso, a quantidade de His-Leu liberada foi determinada fluorimetricamente (365 nm excitação e 495 emissão) em fluorímetro (modelo Synergy™ H1, BioTek). A atividade da ECA foi expressa em nmol por min por ml de plasma.

3.10 Análise histológica.

Ao final dos experimentos, os ratos receberam injeções de solução de Azul de Evans 2% em cada lado do NPBL, no mesmo volume das injeções de fármacos. Eles foram então profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg; Cristália) e perfundidos transcardicamente com salina seguida por formalina 10%. Os encéfalos foram removidos, fixados em formalina 10%, congelados, cortados em seções de 60 µm, corados com corante de Giemsa, e analisados por microscopia de luz para confirmar os locais de injeções.

3.11 Análise estatística.

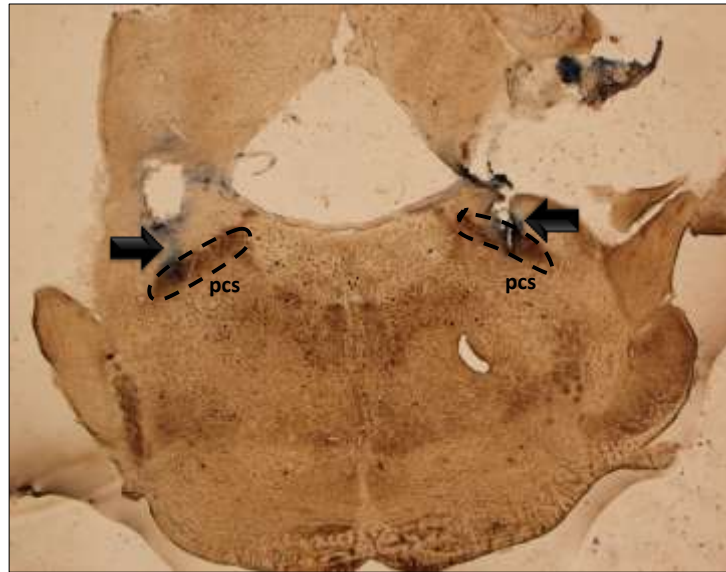
Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média estão representados nos gráficos mostrados posteriormente. Análise de variância (ANOVA) (um fator ou dois fatores) e o pós-teste de Newman Keuls foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos (significância para $p < 0,05$).

4) RESULTADOS

4.1. Análise histológica.

A figura 1 mostra injeções bilaterais típicas no NPBL. Os pontos de injeção foram localizados principalmente nas porções centro laterais e dorso lateral do NPBL [vide (FULWILER; SAPER, 1984) para definições dos sub-núcleos do NPBL]. Os pontos de injeção do presente estudo são similares àqueles em que estudos anteriores mostraram os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de água e sódio (ANDRADE et al., 2004; DE GOBBI et al., 2009; ANDRADE et al., 2011; MENEZES et al., 2011; ANDRADE et al., 2012). Injeções que atingiram as porções ventro lateral e lateral externa, assim como o núcleo Kölliker-Fuse, foram observadas apenas em alguns ratos e os resultados desses animais foram incluídos na análise.

A)



B)

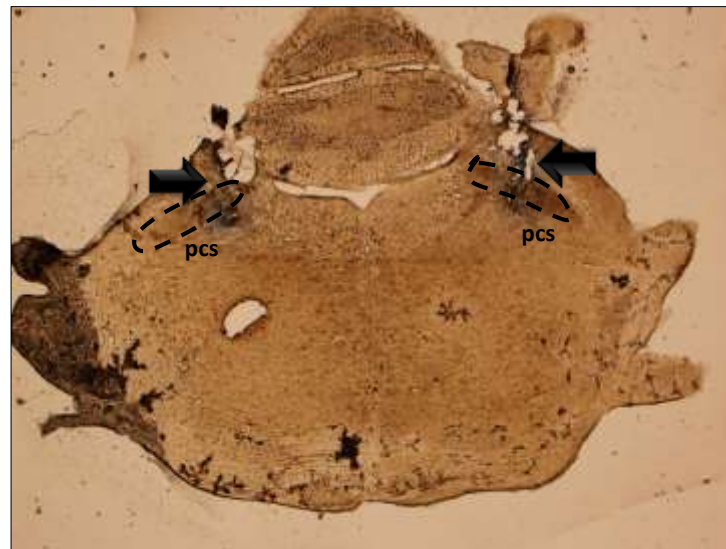


Figura 1: Fotomicrografias de cortes coronais de encéfalo de animais representativos dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas) em HTZ (A) e SHR (B). pcs, pedúnculo cerebelar superior.

4.2. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em animais espontaneamente hipertensos (SHR) normoidratados após ativação adrenérgica α_2 no NPBL.

Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($0,5 \pm 0,3$ vs. veículo: $0,6 \pm 0,3$ ml/120 min) [$F(1,7)=0,001$; $P>0,05$] em animais SHR normoidratados. Semelhantemente, não houve alterações na ingestão de água ($0,4 \pm 0,2$ vs. veículo: $0,7 \pm 0,5$ ml/120 min) [$F(1,7)= 0,2$; $P>0,05$] (figura 2).

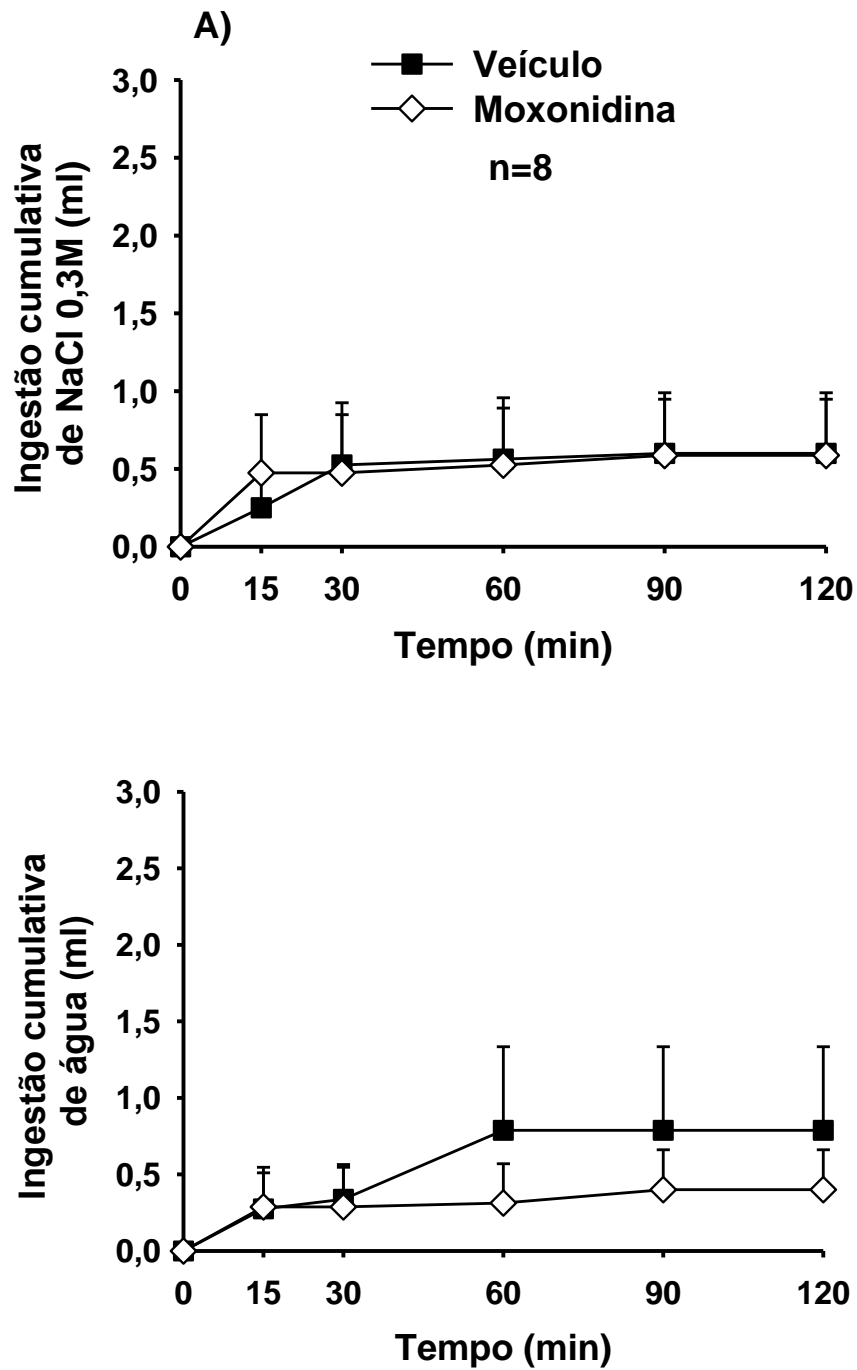


Figura 2: Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos SHR normoidratados que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.3. Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M em animais normotensos (HTZ e espontaneamente hipertensos (SHR)).

Em relação à ingestão diária de NaCl 0,3 M, os animais SHR apresentaram uma maior ingestão de NaCl 0,3 M ao longo de 24 h em comparação a linhagem Holtzman [$F(1,112) = 34,4; p < 0,001$] nos dias 1, 3 e 5 do período de 8 dias observados. Não foram observadas diferenças entre as linhagens para a ingestão diária de água, [$F(1,112) = 0,45; p > 0,05$] (Figura 3).

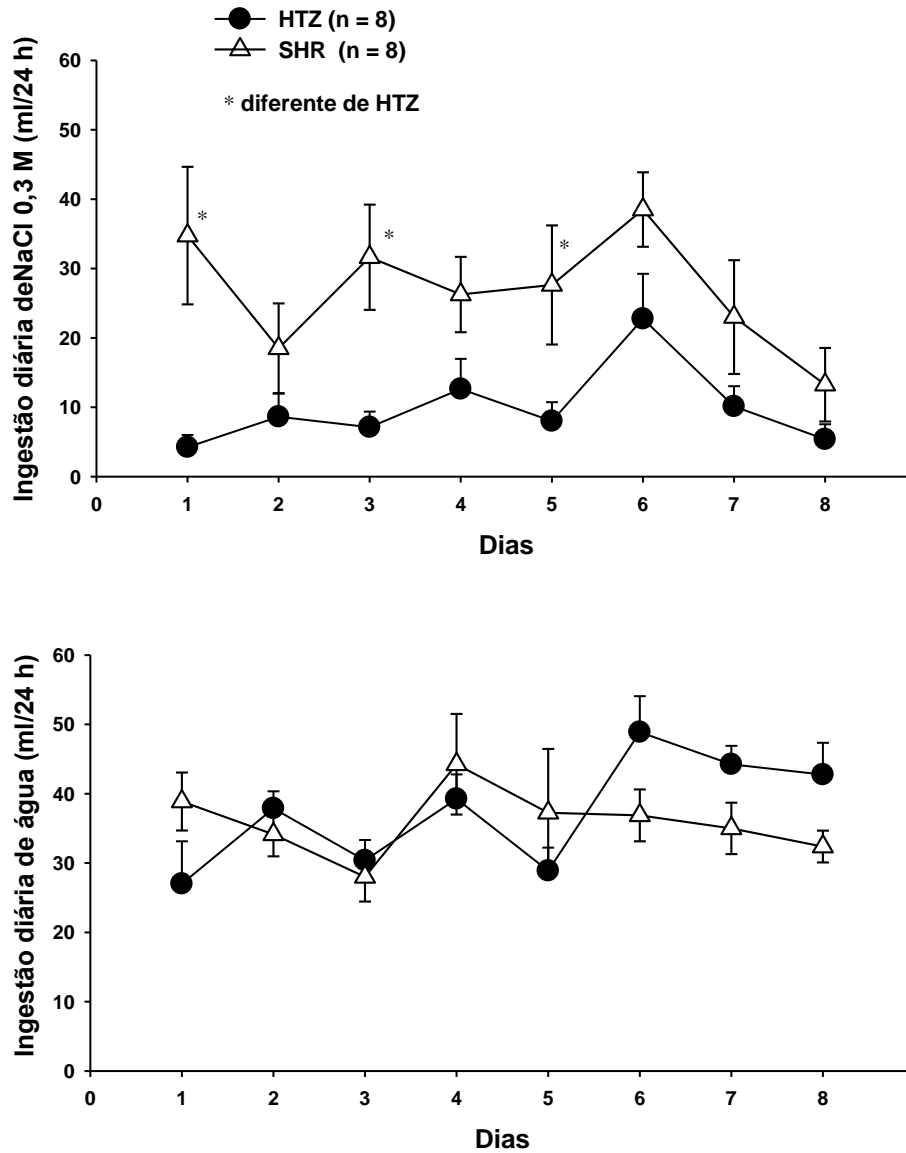


Figura 3: Ingestão diária de **A)** NaCl 0,3 M (ml/24h) e **B)** de água (ml/24h) em ratos normotensos (HTZ) e hipertensos (SHR). Valores são representados como média \pm EPM; N = número de animais por grupo.

4.4. Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica e reidratação parcial em animais hipertensos (SHR) e normotensos (HTZ) após ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL.

O volume de água ingerido no período de reidratação parcial foi semelhante entre os grupos de animais normotensos ($13,7 \pm 1,3$; vs. veículo $11,9 \pm 1,7$ ml/120 min) e hipertensos ($11,5 \pm 0,8$; vs. veículo $10,5 \pm 0,7$ /120 min), [F(3,48) = 0,56; $p > 0,05$].

De acordo com a figura 4, em SHR as injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M ($14,2 \pm 3,4$ vs. veículo: $4,6 \pm 1,3$ ml/120 min) induzida por PH-RP, [F(3,240)= 16,2; $p < 0,05$], sem alterações na ingestão de água ($5,6 \pm 1,4$, vs. veículo: $2,9 \pm 1,0$ ml/120 min) [F(3,240)= 1,6; $p > 0,05$]. Nos HTZ a moxonidina não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M ($4,9 \pm 2,4$, vs. veículo: $2,2 \pm 1,7$ ml/120 min) ou ingestão de água ($3,5 \pm 1,9$, vs. veículo: $3,0 \pm 1,4$ ml/120 min).

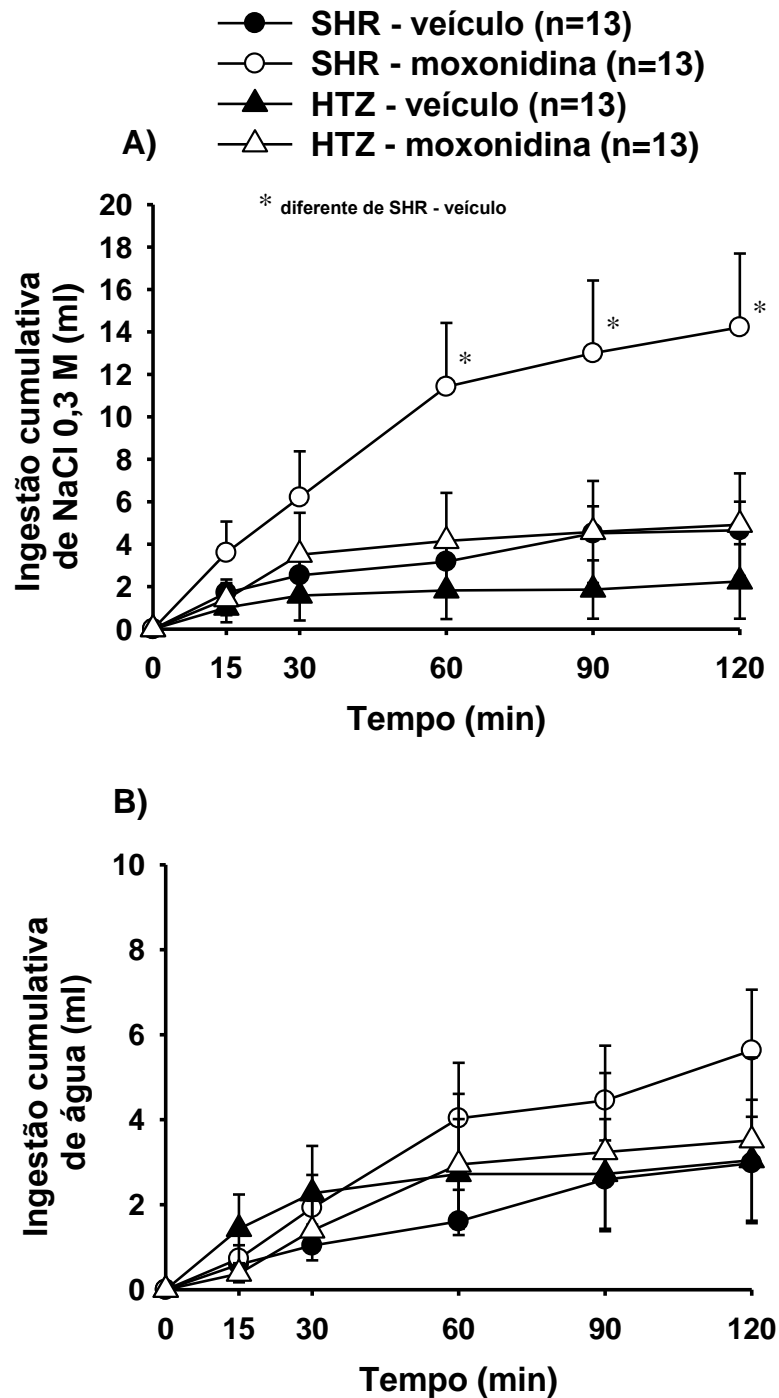


Figura 4: Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos SHR e HTZ submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial (PH-RP) que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.5. Pressão arterial média, frequência cardíaca e teste do barorreflexo em SHR após injeções bilaterais de moxonidina no NPBL.

Administração bilateral de moxonidina no NPBL de animais SHR normoidratados não promoveu alterações na PAM, [F(3,27) = 1,16; $p > 0,05$] e FC, [F(3,27) = 0,78; $p > 0,05$] (figura 5). Os valores basais de PAM e FC foram 179 ± 12 mmHg e 426 ± 13 bpm, respectivamente.

A administração bilateral de moxonidina no NPBL não modificou a queda de PAM promovida pelo NPS (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ($-49,9 \pm 7,2$ vs. veículo: $-46,8 \pm 6,7$ mmHg) [F(1,16) = 0,09; $p > 0,05$], nem a taquicardia reflexa ($52,4 \pm 8,2$ vs. veículo: $60,3 \pm 8,8$ mmHg) [F(1,16) = 0,41; $p > 0,05$]. De forma semelhante, a administração bilateral de moxonidina no NPBL não modificou o aumento da PAM promovido pela administração iv de fenilefrina (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ($28,6 \pm 3,7$ vs. veículo: $29,6 \pm 2,6$ mmHg), [F(1,16) = 0,05; $p > 0,05$] nem a bradicardia reflexa ($-51 \pm 16,8$ vs. veículo: $-29,3 \pm 10,8$ mmHg), [F(1,16) = 1,17; $p > 0,05$].

A tabela 1 mostra que após o período de 24 horas de privação hídrica e após o período de 2 horas de reidratação parcial não houve diferença significativa na PAM [F(2,3) = 2,0; $p > 0,05$] e FC [F(2,3) = 1,14; $p > 0,05$] de SHR. Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL ao final do período de reidratação parcial não alterou a PAM [F(2,3) = 0,56; $p > 0,05$] nem a FC [F(2,3) = 0,04; $p > 0,05$] de SHR (tabela 2).

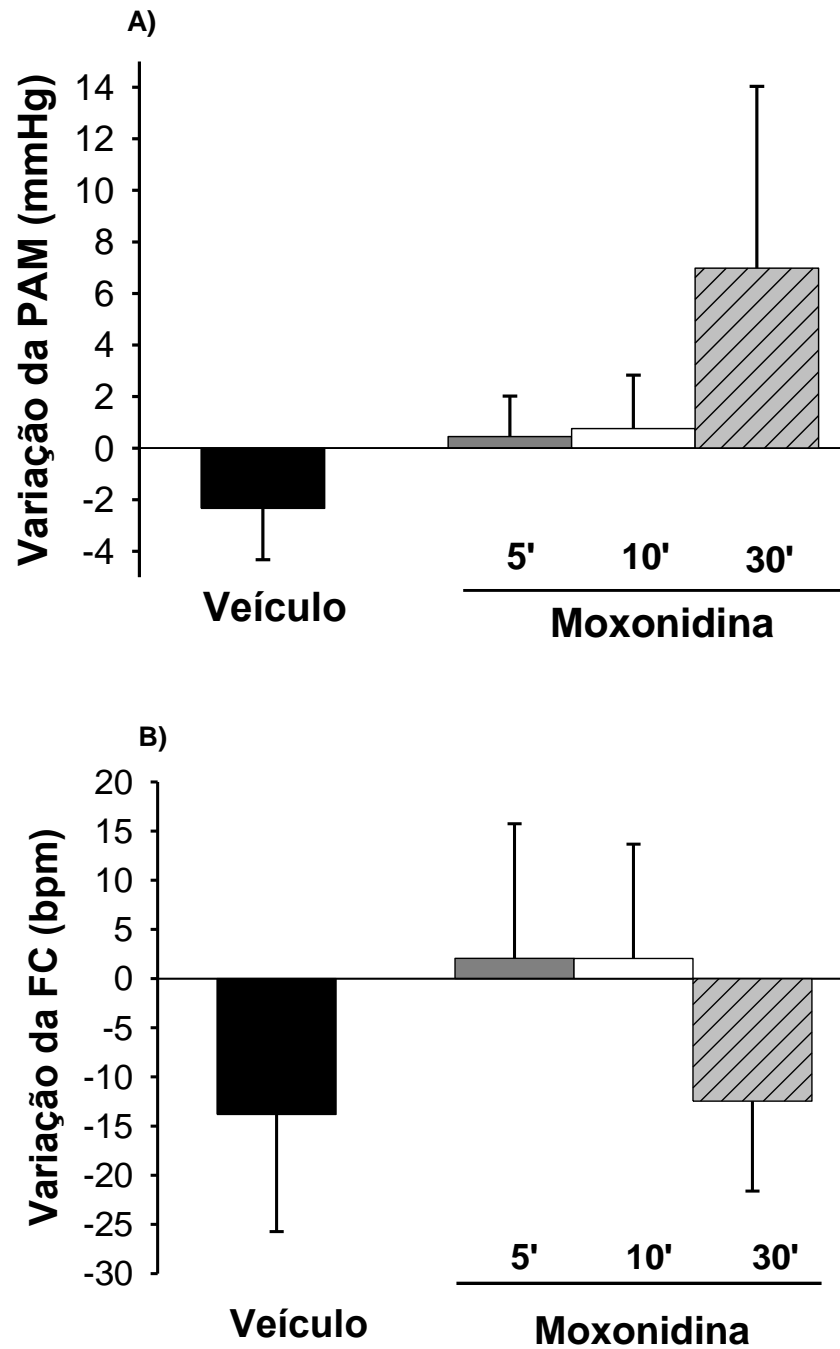


Figura 5: A) Variação de pressão arterial média (PAM, mmHg) e B) variação de frequência cardíaca (FC, bpm), em ratos SHR não anestesiados normoidratados que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 10.

Tabela 1: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em SHR durante condições basais (controle), após 24 h de privação hídrica (PH) após 2 h reidratação parcial (RP).

CONDIÇÃO	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Controle	185 ± 8,9	372 ± 28
Após 24 h PH	158 ± 2,2	306 ± 7,2
Após 2 h RP	176 ± 7,4	308 ± 31

Valores expressos como média ± EPM. n = 2.

Tabela 2: Variação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em SHR após 2 h reidratação parcial (RP), após 5, 10 e 30 min de administração bilateral de moxonidina no NPBL.

TEMPO	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
5 min	2,3±6,4	37,2±27
10 min	8,5±2,5	37,7±22,6
30 min	10,8±1,8	24,7±21,3

Valores expressos como média ± EPM. n = 2.

4.6 Excreção renal em animais SHR e normotensos (HTZ) submetidos a PH-RP após a ativação adrenérgica α_2 no NPBL.

A tabela 3 compara os resultados de volume urinário, excreção renal de Na^+ e K^+ (μEq) em animais HTZ e SHR após o período de 24 h de privação hídrica (PH) e após 2 h de reidratação parcial (RP) no 1º e 2º ciclos de PH-RP, previamente a administração de veículo ou moxonidina no NPBL.

Ao final do período de 24 h da privação hídrica não foram observadas diferenças entre o volume urinário [$F(1,12) = 0,80$; $p > 0,05$], carga excretada de Na^+ [$F(1,12) = 0,90$; $p > 0,05$], carga excretada de K^+ [$F(1,12) = 3,01$; $p > 0,05$] de SHR e HTZ quando comparados o 1º com o 2º experimentos, nem entre as linhagens, [$F(1,12) = 0,29$; $p > 0,05$], $F(1,12) = 0,65$; $p > 0,05$], e [$F(1,12) = 1,97$; $p > 0,05$], respectivamente.

Em relação ao final do período de reidratação parcial de 2 h, também não foram observadas diferenças entre o volume de água ingerido [$F(1,12) = 0,12$; $p > 0,05$], carga excretada de Na^+ [$F(1,12) = 0,05$; $p > 0,05$], carga excretada de K^+ [$F(1,12) = 0,002$; $p > 0,05$] e volume urinário [$F(1,12) = 1,87$; $p > 0,05$] de SHR e HTZ ao final do período de 24 h da privação hídrica quando comparados o 1º com o 2º experimentos, nem entre as linhagens, [$F(1,12) = 0,11$; $p > 0,05$], $F(1,12) = 1,93$; $p > 0,05$], [$F(1,12) = 0,02$; $p > 0,05$] e [$F(1,12) = 0,35$; $p > 0,05$], respectivamente.

A tabela 4 compara os parâmetros bioquímicos no soro de animais controles (normoidratados) e animais submetidos ao protocolo de privação hídrica de 24 horas seguido de 2 horas de reidratação parcial (PH-RP). As concentrações séricas de Na^+ [$F(1,6) = 5,6$; $p > 0,05$], K^+ [$F(1,6) = 0,13$; $p > 0,05$] e proteínas totais [$F(1,6) = 0,4$; $p > 0,05$] de SHR e HTZ que foram submetidos ao protocolo de PH-RP foram semelhantes às observadas na condição basal (ratos saciados e normoidratados).

Para a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), ANOVA mostrou diferença entre as linhagens [F(1,7) = 22,3; p < 0,05], sem diferença entre as condições [F(1,7) = 3,9; p > 0,05]. A atividade ECA aumentou em HTZ submetidos ao protocolo de PH-RP, enquanto que em SHR não foi observado este efeito.

Após o período de reidratação parcial foram feitas as administrações bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL, e após 15 min foram oferecidos bebedouros contendo NaCl 0,3 M e água para o estudo da excreção renal após ativação adrenérgica α_2 no NPBL durante a fase do apetite ao sódio.

Durante a fase do apetite ao sódio, injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumentaram a excreção cumulativa de Na^+ induzida por PH-RP em SHR ($528,2 \pm 192$ vs. veículo: $74,7 \pm 41,2 \mu\text{Eq}/2 \text{ h}$) [F(3,48) = 7,4; p < 0,05]. Nos HTZ a moxonidina não alterou a excreção de Na^+ ($25,3 \pm 15,4$ vs. veículo: $28,5 \pm 18,0 \mu\text{Eq}/2 \text{ h}$) (figura 6A). ANOVA também mostrou interação entre tempos e tratamentos na excreção cumulativa de Na^+ [F(9,48) = 3,2; p < 0,05].

Também houve aumento na excreção cumulativa de K^+ [F(3,48) = 6,4; p < 0,05] após injeções de bilaterais de moxonidina no NPBL de SHR ($344,8 \pm 91,9$ vs. veículo: $89,8 \pm 79,0 \mu\text{Eq}/2 \text{ h}$), mas não de HTZ ($28,7 \pm 27,1$ vs. veículo: $28,5 \pm 18,0 \mu\text{Eq}/2 \text{ h}$) (figura 6B).

A administração bilateral de moxonidina no NPBL também alterou o volume urinário induzido por PH-RP em SHR ($3,0 \pm 0,5$ vs. veículo: $0,8 \pm 0,3 \text{ ml}/2 \text{ h}$) [F(3,48) = 5,4; p < 0,05], sem alterar em HTZ ($0,7 \pm 0,5$ vs. veículo: $0,6 \pm 0,3 \text{ ml}/2 \text{ h}$) (figura 6C).

Em relação ao teste do apetite ao sódio, a administração bilateral de moxonidina no NPBL aumentou a ingestão cumulativa NaCl 0,3 M induzida por PH-RP em SHR [F(3,60) = 13,5; p < 0,05] ($5,7 \pm 2,4$ vs. veículo: $1,6 \pm 0,9 \text{ mEq}/2 \text{ h}$, ou seja, $19,0 \pm 8,0$ vs. veículo: $5,5 \pm 3,0 \text{ ml}/2 \text{ h}$). Nos HTZ a moxonidina não alterou a ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M ($0,08 \pm 0,3$ vs. veículo: $0 \pm 0 \text{ mEq}/2 \text{ h}$, ou seja, $0,2 \pm 0,1$ vs. veículo $0 \pm 0 \text{ ml}/2 \text{ h}$) (figura 7A).

Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não alteraram a ingestão de água que acompanha o apetite ao sódio tanto em SHR ($2,5 \pm 1,4$ vs. veículo: $2,3 \pm 1,4$ ml/2 h) quanto em HTZ ($0,02 \pm 0,02$ vs. veículo: $2,3 \pm 2,3$ ml/2 h) [$F(3,60) = 2,5$; $p > 0,05$] (figura 7B).

A figura 8 compara o balanço de sódio durante a fase de apetite ao sódio induzido pelo protocolo PH-RP. A administração de moxonidina no NPBL de SHR promoveu aumento no balanço de Na^+ [$F(3,48) = 13,1$; $p < 0,05$].

Tabela 3: Volume urinário (VU, ml) e excreção urinária de Na⁺ e K⁺(μ Eq) em animais submetidos a ciclos de privação hídrica (PH) e reidratação parcial (PH-RP).

Linhagem	Evento	PH (24 h)			PH-RP (2 h)			Ingestão de água (ml)
		VU (ml)	Na ⁺ (μ Eq)	K ⁺ (μ Eq)	VU (ml)	Na ⁺ (μ Eq)	K ⁺ (μ Eq)	
HTZ	1º ciclo	3,1 \pm 1,5	650,9 \pm 228,1	702,5 \pm 164,6	1,5 \pm 0,3	38,1 \pm 17,1	39,9 \pm 10,9	11,3 \pm 2,9
	2º ciclo	7,9 \pm 6,1	658,3 \pm 200,9	1200,8 \pm 540,7	0,8 \pm 0,4	131,5 \pm 89,8	100,7 \pm 33,2	9,3 \pm 3,1
SHR	1º ciclo	3,3 \pm 1,0	630,6 \pm 183,9	1051,2 \pm 516,5	1,1 \pm 0,6	93,4 \pm 67	106,0 \pm 72,6	11,0 \pm 1,5
	2º ciclo	4,2 \pm 0,6	989,4 \pm 147,3	2117,5 \pm 475,1	0,7 \pm 0,3	26,6 \pm 15,4	45,2 \pm 21,1	11,2 \pm 2,2

Valores expressos em média \pm EPM; SHR: n = 7; HTZ, n = 8.

Tabela 4:Concentrações séricas de sódio e potássio, proteínas totais no soro, atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma de animais controles (normoidratados) e animais submetidos ao protocolo de privação hídrica de 24 horas seguido de 2 horas de reidratação parcial (PH-RP).

Linhagem	Tratamento	[Na ⁺], mEq/l	[K ⁺], mEq/l	PT, g%	ECA, nmol/min/ml
HTZ	Controle	142 \pm 5,1	7,2 \pm 0,7	6,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1
	PH-RP	135,6 \pm 1,3	6,8 \pm 0,03	6,7 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4 *
SHR	Controle	141,1 \pm 1,3	7,3 \pm 0,7	6,6 \pm 0,1	0,74 \pm 0,03
	PH-RP	136,2 \pm 1,9	7,3 \pm 0,2	6,5 \pm 0,06	0,72 \pm 0,07 #

Valores expressos em média \pm EPM. N = 2-4 por grupo. * diferente de 1º ciclo com a respectiva linhagem; # diferente de HTZ.

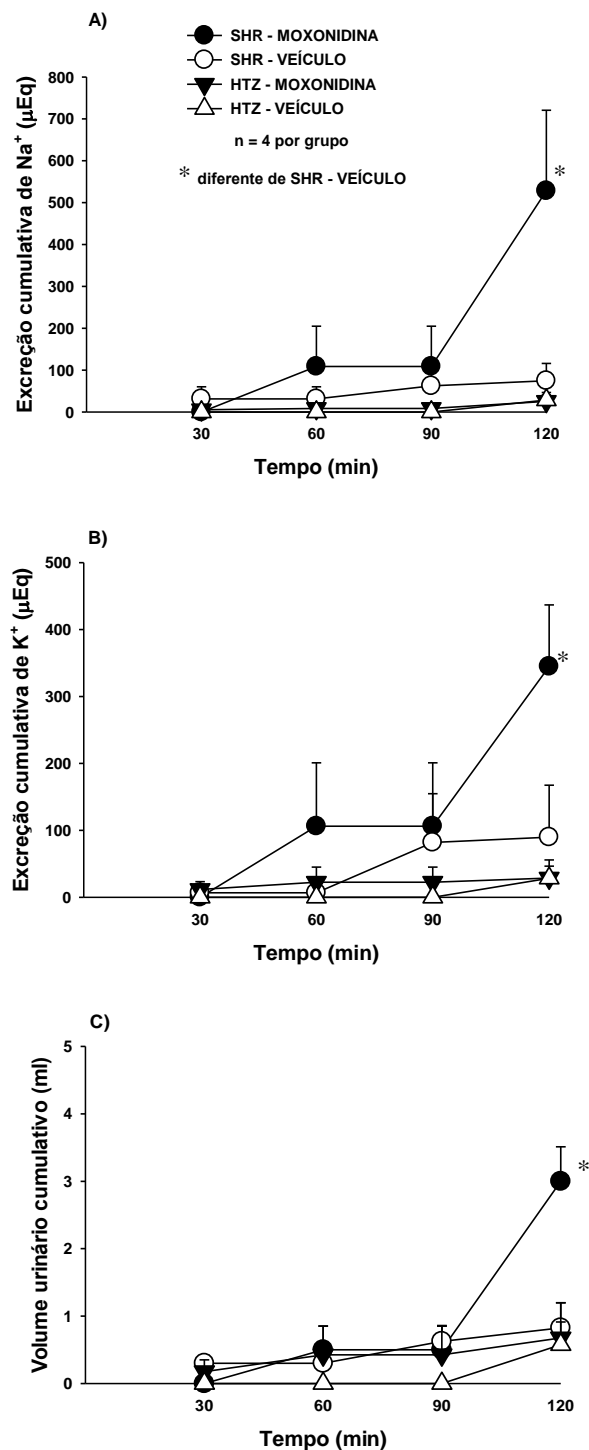


Figura 6: **A)** Excreção cumulativa de Na⁺ (μEq), **B)** excreção cumulativa de K⁺ (μEq) e **C)** volume urinário cumulativo em ratos SHR e HTZ submetidos ao protocolo de PH-RP que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μl) ou veículo no NPBL 15 min antes do acesso ao NaCl 0,3 M e água para ingestão. A coleta de urina foi feita a cada 30 min, iniciando-se após o oferecimento dos bebedouros. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.

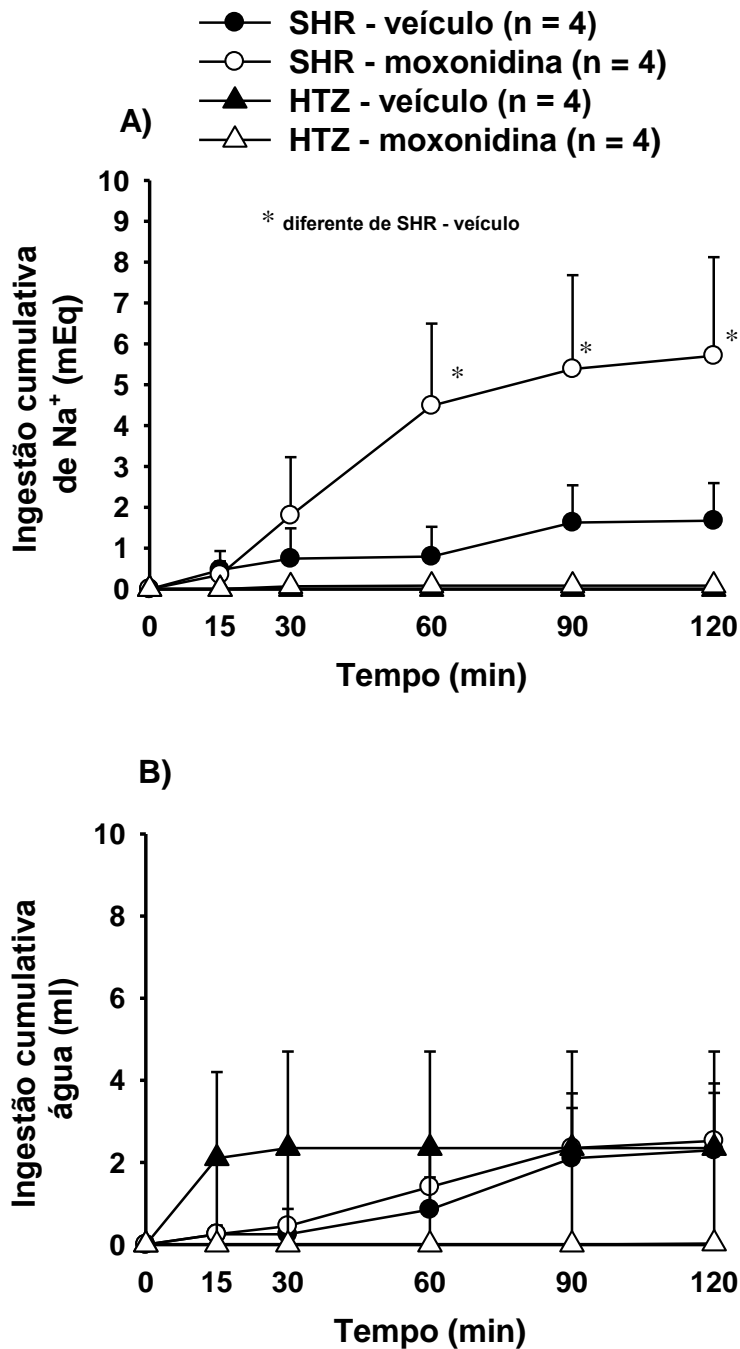


Figura 7: Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (mEq) e **B)** água (ml) em ratos SHR e HTZ durante a fase do apetite ao sódio induzido pelo protocolo de PH-RP, que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

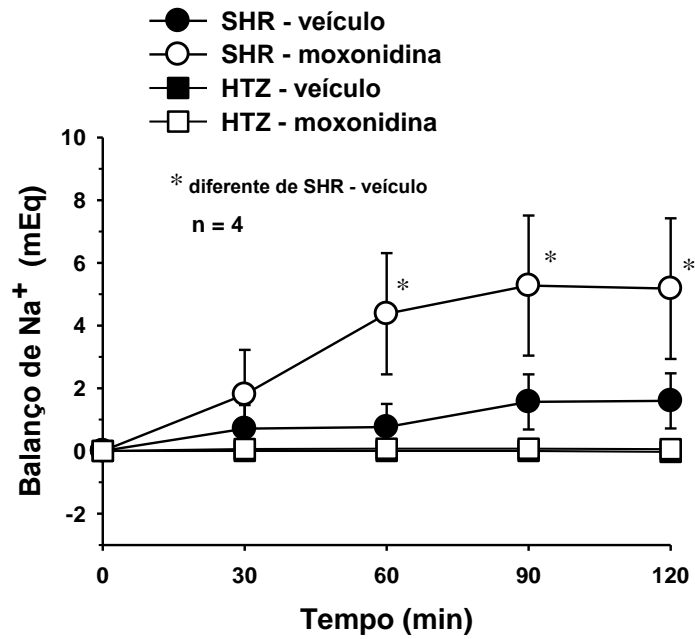


Figura 8: Balanço de sódio em ratos SHR e HTZ durante a fase do apetite ao sódio induzido pelo protocolo de PH-RP, que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.7. Ingestão de água e NaCl 0,3 M em animais espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos a privação hídrica, espontaneamente NÃO reidratados, após ativação adrenérgica α_2 no NPBL.

Alguns animais com histologia bilateral confirmada para injeções de moxonidina e veículo passaram pelo protocolo de PH-RP, mas no período de 2 horas de reidratação parcial espontaneamente não ingeriram água (0 ml) até o final do 1º e/ou do 2º experimento. Assim sendo, como esses animais receberam as injeções no NPBL sem terem se reidratado de acordo com o protocolo, as condições iniciais para avaliação dos efeitos da moxonidina ou veículo no teste do apetite ao sódio seriam diferentes. Dessa forma, esses animais foram excluídos da análise geral e seus resultados estão descritos a seguir.

Não houve diferença na ingestão de água ao final do período de reidratação parcial de 2 h quando comparados o 1º com o 2º experimentos, nem entre as linhagens, [F(1,14) = 0,48; p > 0,05] e [F(1,14) = 0,6; p > 0,05], respectivamente, (HTZ, n = 4, 1º ciclo: 0,1 ± 0,1; HTZ 2º ciclo: 5,3 ± 2,8; SHR, n = 5, 1º ciclo: 2,3 ± 2,1; SHR 2º ciclo: 4,3 ± 2,6 ml/120 min).

Durante o teste de apetite ao sódio, a administração de moxonidina no NPBL de SHR e HTZ, que não se reidrataram espontaneamente no teste da sede, não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M [HTZ – veículo (n = 4): 0,5 ± 0,5; HTZ – moxonidina (n = 4): 2,8 ± 2,6; SHR – veículo (n = 5): 1,9 ± 3,4; SHR – moxonidina (n = 5): 7,6 ± 5,3 ml/120 min)], [F(3,14) = 0,8; p > 0,05]. A ingestão de água durante a fase de apetite ao sódio também não foi modificada em nenhum dos tratamentos [HTZ – veículo (n = 4): 13,3 ± 11,4; HTZ – moxonidina (n = 4): 2,0 ± 1,7; SHR – veículo (n = 5): 0,8 ± 0,7; SHR – moxonidina (n = 5): 1,8 ± 1,4 ml/120 min)], [F(3,14) = 1,2; p > 0,05].

5) DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que injeções bilaterais de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M em animais SHR induzida pelo protocolo de privação seguido de reidratação parcial (PH-RP), sem alterar a ingestão água. Por outro lado, a ativação desses receptores não alterou significativamente a ingestão de sódio nem de água de animais normotensos que passaram pelo mesmo protocolo de PH-RP. Também foi observado que injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não alteraram a ingestão de sódio e água, a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e respostas barorreflexas de animais SHR normoidratados. Ao final das 24 horas do período de privação hídrica e também após as duas horas de reidratação parcial não houve alteração dos valores basais de PAM e FC de SHR, e a administração de moxonidina no NPBL desses animais também não alterou a PAM e FC. A moxonidina injetada no NPBL de SHR também promoveu um balanço positivo de sódio, caracterizado pelo aumento da ingestão de NaCl 0,3 M durante o teste do apetite ao sódio, acompanhado de aumento da excreção renal de sódio e volume urinário ao final do experimento.

Apesar do intenso apetite ao sódio observado nos animais SHR ser atribuído a uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina central (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; DI NICOLANTONIO, 2004), nossos resultados mostram que em SHR saciados não houve alteração da ingestão de sódio após a administração de moxonidina no NPBL, de forma semelhante ao observado em animais normotensos saciados (ANDRADE et al., 2004).

O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. O animal foi privado de água por 24 horas, e ao final desse período observa-se aumento da osmolaridade e

sódio plasmáticos, hipovolemia e aumento da atividade de renina plasmática. O período de reidratação parcial (2 horas de acesso apenas à água) corrige totalmente o aumento da osmolaridade plasmática e parcialmente a hipovolemia, enquanto que a atividade de renina plasmática permanece elevada até o início do teste do apetite ao sódio (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010). Após o período de reidratação parcial o animal passa a ter também livre acesso ao NaCl 0,3 M por mais 2 horas (teste do apetite ao sódio). No momento em que o animal tem acesso a solução de sódio, estão presentes a hipovolemia e aumento de angiotensina II como sinais facilitadores para o apetite ao sódio, enquanto que o sinal inibitório da hipertonidade para a ingestão de sódio já foi removido. A subsequente ingestão de sódio corrige totalmente o volume do líquido extracelular e a perda de sódio que ocorreu pela natriurese durante o período de privação hídrica (DE LUCA et al., 2002).

Nossos resultados mostraram que não houve diferença no volume urinário, excreção de sódio e potássio no período de 24 h de privação hídrica entre o 1º e 2º experimentos (ciclos de PH-RP) nem entre as linhagens. Também não houve diferenças na ingestão de água, volume urinário, excreção de sódio e potássio no período de reidratação parcial. Estudos prévios (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2016) também verificaram que esses parâmetros não se alteram com repetições de ciclos de PH-RP, bem como não diferem entre as linhagens normotensas (Wistar Kyoto e Holtzman) e hipertensas (SHR). Os parâmetros bioquímicos em animais normotensos também não se alteram após repetições de ciclos de PH-RP.

Em nosso estudo avaliamos a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), em animais SHR e HTZ na condição controle (normoidratados) e após a PH-RP, no momento inicial da fase do apetite ao sódio. Após PH-RP, HTZ apresentaram um aumento na atividade da ECA em relação a condição controle. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, que mostraram que em resposta a privação hídrica ocorre aumento de atividade de

renina plasmática e aumento nos níveis circulantes de ANG II (DI NICOLANTONIO; MENDELSON, 1986; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). Por outro lado, o esperado aumento na atividade de ECA em resposta a privação hídrica e reidratação parcial em animais SHR não foi observado em nosso estudo, sendo que a atividade de ECA em SHR foi menor do que nos HTZ. Esses resultados são controversos, uma vez que estudos anteriores observaram que animais SHR apresentam maior atividade de ECA plasmática em comparação com linhagem normotensa WKY, e que a atividade de renina plasmática após o protocolo de privação hídrica e reidratação parcial permanece elevada em animais SHR em comparação a sua própria condição basal (saciado) (GOMEZ-ROSO et al., 2009; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

Em relação ao apetite ao sódio, após a administração bilateral de moxonidina no NPBL, verificamos um aumento da ingestão de NaCl 0,3 M em comparação ao tratamento controle nos animais hipertensos, sem alteração da ingestão de água. Contudo, a moxonidina no NPBL de animais normotensos não promoveu alteração da ingestão de sódio induzida por PH-RP. Não houve diferença na ingestão de NaCl 0,3 M entre os animais SHR e HTZ tratados com veículo no NPBL, enquanto que estudo de Pereira-Derderian e colaboradores (2010) mostrou que animais SHR apresentaram um maior apetite ao sódio induzido por PH-RP do que outras linhagens normotensas (Wistar Kyoto -WKY e HTZ), (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

O estudo de Pereira-Derderian e colaboradores (2010) também verificou que após PH-RP a atividade de renina plasmática permanece elevada de modo semelhante entre os animais HTZ e SHR, enquanto que a imunorreatividade a proteína c-Fos permaneceu elevada na lâmina terminal de todas as linhagens (WKY, HTZ e SHR), sendo este aumento mais pronunciado no órgão subfornical (SFO) de SHR. Ademais, a PH-RP induziu um aumento da imunorreatividade à proteína c-Fos no NPBL de todas as linhagens quando comparado com a

privação hídrica e condição controle de cada linhagem, (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). Assim sendo, a maior imunorreatividade a proteína c-Fos do SFO após PH-RP em SHR pode ser uma hipótese para explicar o fato do bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL com a administração de moxonidina ter produzido aumento da ingestão de sódio induzida por PH-RP apenas em animais hipertensos.

Por outro lado, é curioso o fato de que a moxonidina no NPBL de HTZ não tenha alterado a ingestão de sódio induzida por PH-RP. Estudos anteriores já mostraram que ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções bilaterais de moxonidina produz um potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzido desidratação extracelular (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE-FRANZE et al., 2010; CABRAL; ANDRADE, 2016), desidratação intracelular (ANDRADE et al., 2006; ANDRADE et al., 2012), e induzida por privação alimentar (ANDRADE et al., 2007), sendo que esses efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL sobre a ingestão de sódio são devido a uma facilitação não específica de todos os comportamentos ingestivos, uma vez que a ingestão de solução de sacarose ou a ingestão de alimento não são alteradas pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2007).

O efeito anti-hipertensivo dos agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, como a clonidina e moxonidina, é atribuído a uma redução da atividade simpática produzida pela ação central em receptores imidazólicos do bulbo ventrolateral rostral (ERNSBERGER et al., 1993; HAXHIU et al., 1994; ERNSBERGER; HAXHIU, 1997). Além da inibição da atividade simpática, esses agonistas apresentam efeitos diurético e natriurético, (PENNER, S B; SMYTH, D D, 1994; PENNER, S. B.; SMYTH, D. D., 1994; PENNER; SMYTH, 1995). Embora a moxonidina quando injetada no VL induz a diurese e natriurese e inibe a ingestão de água e de sódio, ela não altera a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), (PENNER, S B; SMYTH, D D, 1994; PENNER, S. B.; SMYTH,

D. D., 1994; PENNER; SMYTH, 1995; NURMINEN et al., 1998; MENANI et al., 1999; SUGAWARA et al., 1999; ANDRADE et al., 2003; DE OLIVEIRA; DE LUCA; MENANI, 2003; MOREIRA et al., 2004). Mas quando injetada em áreas posteriores, como no 4º ventrículo ou NTS comissural, o único efeito conhecido da moxonidina é a redução da PAM e FC, (NURMINEN et al., 1998; MOREIRA et al., 2007; TOTOLA et al., 2013).

Administração bilateral de moxonidina no NPBL aumentou os parâmetros de excreção renal aos 120 min da fase do apetite ao sódio induzido por PH-RP apenas em SHR. Como citado anteriormente, a ativação adrenérgica α_2 no NPBL de SHR promoveu um aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzido por PH-RP, observado a partir dos 60 min do início do teste do apetite ao sódio, resultando num balanço positivo de sódio até o final do experimento. Assim sendo, os efeitos da excreção renal observados após a administração de moxonidina no NPBL de SHR provavelmente são secundários a ingestão de NaCl 0,3 M e água durante a fase de apetite ao sódio. Estudos prévios já demonstraram que moxonidina administrada no NPBL de animais normotensos aumenta o balanço de sódio, tanto em situações de desidratação intra como extracelular (ANDRADE et al., 2012; CABRAL; ANDRADE, 2016). Esses mesmos trabalhos mostraram que moxonidina no NPBL de animais normotensos diminuiu a diurese e natriurese, bem como os níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina induzidos por aumento de osmolaridade plasmática (ANDRADE et al., 2012), e também diminuiu a natriurese e diurese em ratos normotensos com desidratação extracelular associado a reidratação (CABRAL; ANDRADE, 2016). Esses estudos prévios sugerem que a ativação adrenérgica α_2 no NPBL de animais normotensos promove a ingestão de sódio e diminui as respostas renais, facilitando assim a retenção de sódio e água a expansão de volume circulante (ANDRADE et al., 2012; CABRAL; ANDRADE, 2016). Contudo, ainda não podemos afirmar o mesmo sobre os efeitos da moxonidina no NPBL em SHR, uma vez

que não avaliamos os parâmetros renais na ausência de bebedouros para ingestão de NaCl 0,3 M e água.

Nossos resultados também mostram que a administração bilateral de moxonidina no NPBL de animais SHR não altera a PAM e FC basais, nem as respostas ao teste do barorreflexo. Também verificamos que assim como em estudo prévio (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010), o protocolo de PH-RP não alterou os valores de PAM e FC em SHR, e que a moxonidina injetada bilateralmente no NPBL nesse período também não promoveu alterações da PAM e FC. Em animais normotensos, a administração de moxonidina agudamente também não altera a PAM e FC basais em animais saciados nem em animais com desidratação extracelular (ANDRADE et al., 2004). Por outro lado, em animais normotensos com desidratação extracelular com ou sem acesso a solução de NaCl 0,3 M e água para ingestão, a moxonidina promoveu um discreto aumento da PAM após 30 min de sua administração no NPBL em comparação a administração de veículo (CABRAL; ANDRADE, 2016). Sendo assim, o aumento da ingestão de NaCl hipertônico induzido por PH-RP após as injeções de moxonidina no NPBL de animais SHR também não é devido as mudanças na pressão arterial.

Os receptores adrenérgicos α_2 são encontrados no sistema nervoso central e periférico, e têm localização tanto pré- quanto pós-sináptica, (FRENCH, 1995). Os receptores adrenérgicos α_2 estão acoplados a proteína G e suas funções são mediadas pelas proteínas G_i/G_o . Os receptores adrenérgicos α_2 estão negativamente acoplados a adenilato ciclase e o efeito inibitório é mediado por meio da inibição da produção de AMP cíclico, (BYLUND, 1995). O núcleo parabraquial exibe uma distinta distribuição de sítios de ligação adrenérgicos α_2 , sendo que a porção externa do NPBL é uma das áreas que apresenta o maior número de sítios de ligação (HERBERT; FLUGGE, 1995). Outro estudo também verificou densos depósitos de produtos de imunorreatividade para o subtipo A do receptor adrenérgico α_2 em

diversas áreas do SNC de ratos, dentre elas vários núcleos da amígdala, locus coeruleus e NPBL, (TALLEY et al., 1996). Os receptores α_2 também apresentam uma distribuição e densidade diferentes no NTS de SHR e no estágio pré hipertensivo dos mesmos, sugerindo uma insuficiência precoce dos receptores α_2 , que pode estar relacionado ao desenvolvimento da hipertensão arterial (CARRETTIERO; FERRARI; FIOR-CHADI, 2012). Além disso, os níveis de dopamina são maiores no NPBL e núcleo motor dorsal em SHR quando comparado com linhagens normotensas (WKY e Wistar). Isso sugere que a dopamina possa agir como um neurotransmissor e não apenas como um precursor da noradrenalina, no complexo dorso vagal (FELTEN; WEYHENMEYER; FELTEN, 1984).

Inúmeros estudos já mostraram que o NPBL possui conexões recíprocas com áreas prosencefálicas, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo central da amígdala e núcleo pré-óptico mediano, e também com áreas bulbares, como a área postrema (AP) e a porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm), (NORGREN, 1981; CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984; FULWILER; SAPER, 1984; LANCA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; KRUKOFF; HARRIS; JHAMANDAS, 1993; JHAMANDAS et al., 1996). Além disso, outros estudos já demonstraram que ocorre uma ativação neuronal do NPBL após a ingestão de soluções salgadas em animais desidratados ou em ratos que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico, (KOBASHI et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1993; FRANCHINI; VIVAS, 1999), sugerindo que as células deste núcleo possam receber sinais inibitórios viscerais e de sabor. Sendo assim, o NPBL pode receber e integrar sinais viscerais e de sabor que ascendem da AP/NTSm em direção às áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

No NPBL, diferentes neurotransmissores e receptores afetam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL. A serotonina, colecistocinina (CCK), fator liberador de corticotrofina (CRF) e glutamato atuam no NPBL ativando mecanismos inibitórios e

reduzindo a ingestão de sódio e ocasionalmente de água (MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996; MENANI; JOHNSON, 1998; DE CASTRO E SILVA; FREGONEZE; JOHNSON, 2006; DE GOBBI et al., 2009). Por outro lado, ativação de receptores adrenérgicos α_2 , receptores opióides, GABAérgicos, ou purinérgicos reduz a atividade dos mecanismos inibitórios aumentando a ingestão de sódio ou até mesmo desencadeando ingestão não estimulada de sódio(ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA; DE LUCA; MENANI, 2008; GASPARINI et al., 2009).

No presente estudo foi demonstrado que a redução da atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL pela ativação dos receptores adrenérgicos α_2 nessa área não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M em SHR normoidratados. Por outro lado, a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL aumenta o apetite ao sódio induzido por privação hídrica seguida de reidratação parcial em animais SHR, sem alterações dos parâmetros cardiovasculares. Assim sendo, podemos sugerir que os mecanismos inibitórios do NPBL não estão atenuados em animais SHR, ou seja, os mecanismos inibitórios do NPBL contribuem para limitar a ingestão de sódio induzida por desidratação também em animais espontaneamente hipertensos.

5) CONCLUSÃO

Em suma, o presente estudo demonstrou que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL aumenta o apetite ao sódio induzido por privação hídrica seguida de reidratação parcial em animais SHR. Essa alteração na ingestão de sódio não seria devido à queda de PAM, pois não houve alteração dos parâmetros cardiovasculares destes animais normoidratados ou após privação hídrica. Portanto, podemos concluir que os mecanismos inibitórios do NPBL contribuem para limitar a ingestão de sódio também em animais espontaneamente hipertensos em modelo de desidratação dupla.

7) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEMI SATO, M. et al. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 560-4, Sep 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566931>>.

ALLEN, A. M.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. O. Comparative neuroanatomy of angiotensin receptor localization in the mammalian hypothalamus. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, v. 15, p. 137-145, 1988 1988.

ANDRADE-FRANZE, G. M. et al. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633-41, Feb 3 2010. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909794>>.

ANDRADE, C. A. et al. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha2-adrenergic receptor agonist. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 702-8, Oct 24 2011. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803064>
http://ac.els-cdn.com/S0031938411003726/1-s2.0-S0031938411003726-main.pdf?_tid=4b1c24c8-1f98-11e3-9ac0-0000aacb35d&acdnat=1379422650_0f545d577f0275496f8f8ed532a7f802>.

ANDRADE, C. A. et al. Role of alpha2-adrenoceptors in the lateral parabrachial nucleus in the control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 1, p. 11-8, Jan 2014. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519089>>.

ANDRADE, C. A. et al. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25-34, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489025>
http://ac.els-cdn.com/S0306452204006918/1-s2.0-S0306452204006918-main.pdf?_tid=4ea63aa2-1f98-11e3-9c38-0000aab0f6c&acdnat=1379422656_a98cadfab8bd9e7888b17a286a75f26d>.

ANDRADE, C. A. et al. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21-8, Sep 29 2006. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890365>
http://ac.els-cdn.com/S0306452206005008/1-s2.0-S0306452206005008-main.pdf?_tid=52229ae0-1f98-11e3-97e6-0000aacb35e&acdnat=1379422662_cec0d24d16012cd69628ed0046ff6ba1>.

_____. Enhancement of meal-associated hypertonic NaCl intake by moxonidine into the lateral parabrachial nucleus. **Behav Brain Res**, v. 183, n. 2, p. 156-60, Nov 2 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629970>>

http://ac.els-cdn.com/S0166432807002987/1-s2.0-S0166432807002987-main.pdf?_tid=55706eac-1f98-11e3-863f-00000aacb362&acdnat=1379422668_13542ccfb568c6a8445dd2bf44c40152>.

ANDRADE, C. A. et al. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. **Neuroscience**, v. 208, p. 69-78, Apr 19 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22373877> http://ac.els-cdn.com/S0306452212001364/1-s2.0-S0306452212001364-main.pdf?_tid=58afe69c-1f98-11e3-9622-00000aacb360&acdnat=1379422673_41dac9de7f355b821b464c0624443a72>.

ANDRADE, C. A. et al. Involvement of forebrain imidazoline and alpha(2)-adrenergic receptors in the antidipsogenic response to moxonidine. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p. 262-4, Dec 2003. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028596>>.

ANDRADE, C. A. F. et al. Gabaergic and opioid receptors mediate the facilitation of NaCl intake induced by α 2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 535–541, 1 February 2015 2015.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Controle neuroendócrino do balanço hidroeletrólítico. In: (Ed.). **Fisiologia, Aires, M. M.** 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 75, p.1182-1198.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrinology of Hydromineral Homeostasis. In: DE LUCA, L. A.;MENANI, J. V., *et al* (Ed.). **Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration**. Boca Raton (FL), 2014. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781466506930.

BLUME, A. et al. Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension. **Hypertension**, v. 29, n. 2, p. 592-8, Feb 1997. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040444>>.

BOOTH, R. E.; JOHNSON, J. P.; STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Adv.Physiol.Educ.**, v. 26, p. 8-20, 2002 2002.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 519-31, Jul 2008. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509340>>.

BRODY, M. J.; O'NEILL, T. P.; PORTER, J. P. Role of central catecholaminergic systems in pathogenesis and treatment of hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 6 Suppl 5, p. S727-41, 1984. ISSN 0160-2446 (Print) 0160-2446 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6084116>>.

BYLUND, D. B. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 763, p. 1-7, Jul 12 1995. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677317>>.

CABRAL, K. A.; ANDRADE, C. A. Importance of the lateral parabrachial nucleus to sodium balance in fluid-depleted rats. **Neurosci Res**, Jun 6 2016. ISSN 1872-8111 (Electronic) 0168-0102 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282217>>.

CALLERA, J. C. et al. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725-35, 2005. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009500>>.

CARRETTIERO, D. C.; FERRARI, M. F.; FIOR-CHADI, D. R. alpha2-Adrenergic receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats during development. **Auton Neurosci**, v. 166, n. 1-2, p. 39-46, Jan 26 2012. ISSN 1872-7484 (Electronic) 1566-0702 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22088943>>.

CHAN, R. K.; SAWCHENKO, P. E. Spatially and temporally differentiated patterns of c-fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. **J Comp Neurol**, v. 348, n. 3, p. 433-60, Oct 15 1994. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844257>>.

CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D.; PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res**, v. 322, n. 2, p. 388-92, Nov 26 1984. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6509329>>.

DAVERN, P. J. A role for the lateral parabrachial nucleus in cardiovascular function and fluid homeostasis. **Front Physiol**, v. 5, p. 436, 2014. ISSN 1664-042X (Electronic) 1664-042X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477821>>.

DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 4, p. R1136-41, Apr 2006. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357101>>.

DE GOBBI, J. I. et al. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Res**, v. 1301, p. 44-51, Dec 8 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747457>>.

DE GOBBI, J. I.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Res**, v. 880, n. 1-2, p. 131-8, Oct 13 2000. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032997>>.

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

DE LUCA JR, L. A.; VIVAS, L.; MENANI, J. V. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C., et al (Ed.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 10, p.116-131.

DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav**, v. 100, n. 5, p. 535-44, Jul 14 2010. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226201>>.

DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R552-9, Feb 2002. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792666>>.

DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Moxonidine and central alpha2 adrenergic receptors in sodium intake. **Brain Res**, v. 993, n. 1-2, p. 177-82, Dec 12 2003. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642844>
<http://ac.els-cdn.com/S0006899303037284/1-s2.0-S0006899303037284-main.pdf?_tid=6a687d5e-1f98-11e3-855e-00000aacb361&acdnat=1379422703_2c6152a68f7163eb77bbf13e2287d2a4>.

_____. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 350-8, Aug 13 2008. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602454>>.

DI NICOLANTONIO, R. Why does the spontaneously hypertensive rat have an exaggerated preference for sweet and salty solutions? An hypothesis. **J Hypertens**, v. 22, n. 9, p. 1649-54, Sep 2004. ISSN 0263-6352 (Print) 0263-6352 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311087>>.

DI NICOLANTONIO, R.; MENDELSON, F. A. Plasma renin and angiotensin in dehydrated and rehydrated rats. **Am J Physiol**, v. 250, n. 5 Pt 2, p. R898-901, May 1986. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3518497>>.

DINICOLANTONIO, R.; HUTCHINSON, J. S.; MENDELSON, F. A. Exaggerated salt appetite of spontaneously hypertensive rats is decreased by central angiotensin-converting enzyme blockade. **Nature**, v. 298, n. 5877, p. 846-8, Aug 26 1982. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7050726>>.

ELY, D.; TURNER, M.; MILSTED, A. Review of the Y chromosome and hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 6, p. 679-91, Jun 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10829096>>.

EPSTEIN, A. N.; STELLAR, E. The control of salt preference in the adrenalectomized rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 3, p. 167-72, Jun 1955. ISSN 0021-9940 (Print) 0021-9940 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13242684>>.

ERNSBERGER, P. et al. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is selective ligand for I₁-imidazoline sites. **J.Pharmacol.Exper.Therap.**, v. 264, p. 172-264, 1993 1993.

ERNSBERGER, P.; HAXHIU, M. A. The II-imidazoline-binding site is a functional receptor mediating vasodepression via the ventral medulla. **Am J Physiol**, v. 273, n. 5 Pt 2, p. R1572-9, Nov 1997. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374796>>.

FELTEN, S. Y.; WEYHENMEYER, J. A.; FELTEN, D. L. Norepinephrine and serotonin in central autonomic nuclei in the spontaneously hypertensive rat and two normotensive control rats. **Brain Res Bull**, v. 13, n. 3, p. 437-41, Sep 1984. ISSN 0361-9230 (Print)
0361-9230 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6498540>>.

FINK, G. D. et al. Lateral parabrachial nucleus and angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 17, n. 6 Pt 2, p. 1177-84, Jun 1991. ISSN 0194-911X (Print)
0194-911X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675203>>.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol.Rev**, v. 78, p. 583-686, 1998 1998.

FRANCHINI, L. F.; VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am J Physiol**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1180-7, Apr 1999. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198401>>.

FRENCH, N. Alpha₂-adrenoceptors and I₂ sites in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther.**, v. 68, n. 2, p. 175-208, 1995 1995.

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 1984. ISSN 0165-0173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984TM05800002 >.

GASPARINI, S. et al. Adrenergic mechanisms of the Kolliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 370-9, Dec 1 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716860>
http://ac.els-cdn.com/S0306452209014067/1-s2.0-S0306452209014067-main.pdf?_tid=74b626a8-1f98-11e3-be55-00000aacb362&acdnat=1379422720_4cf5b0f0273e3f6b978d2f279eb970ee>.

GASPARINI, S.; MENANI, J. V.; DANIELS, D. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus modifies postingestive signals involved in sodium intake control. **Neuroscience**, v. 284, p. 768-74, Jan 22 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264033>>.

GOMEZ-ROSO, M. et al. Cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats are improved by chronic treatment with zofenopril. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 8, p. 1911-21, Dec 2009. ISSN 1476-5381 (Electronic)
0007-1188 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917062>>.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 10th. Philadelphia: Saunders, 2000. xxxii, 1064 p. ISBN 072168677X.

HADE, J. S. et al. Stimulation of parabrachial neurons elicits a sympathetically mediated pressor response in cats. **Am J Physiol.**, v. 255, n. 6 Pt 2, p. H1349-H1358., 1988 1988.

HAEUSLER, G.; FINCH, L.; THOENEN, H. Central adrenergic neurones and the initiation and development of experimental hypertension. **Experientia**, v. 28, n. 10, p. 1200-3, Oct 15 1972

HAXHIU, M. A. et al. Selective antihypertensive action of moxonidine is mediated mainly by I₁-imidazoline receptors in the rostral ventrolateral medulla. **J.Cardiovasc.Pharmacol.**, v. 24, n. 1, p. S1-S8, 1994 1994.

HAYWARD, L. F.; FELDER, R. B. Lateral parabrachial nucleus modulates baroreflex regulation of sympathetic nerve activity. **Am J Physiol**, v. 274, n. 5 Pt 2, p. R1274-82, May 1998. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9644040>>.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Salt intake, plasma sodium, and worldwide salt reduction. **Ann Med**, v. 44 Suppl 1, p. S127-37, Jun 2012. ISSN 1365-2060 (Electronic)
0785-3890 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713141>>.

HERBERT, H.; FLUGGE, G. Distribution of alpha2-adrenergic binding sites in the parabrachial complex of the rat. **Anat Embryol (Berl)**, v. 192, n. 6, p. 507-516, 1995 1995.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 293, n. 4, p. 540-80, Mar 22 1990. ISSN 0021-9967 (Print)
0021-9967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691748>>.

HORIUCHI, J. et al. Distribution of neurons projecting to the rostral ventrolateral medullary pressor region that are activated by sustained hypotension. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1319-29, 1999. ISSN 0306-4522 (Print)
0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362317>>.

HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. **Pflugers Arch**, Jan 10 2015. ISSN 1432-2013 (Electronic)
0031-6768 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572931>>.

JHAMANDAS, J. H.; AIPPERSBACH, S. E.; HARRIS, K. H. Cardiovascular influences on rat parabrachial nucleus: an electrophysiological study. **Am J Physiol**, v. 260, n. 1 Pt 2, p. R225-31, Jan 1991. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1992822>>.

JHAMANDAS, J. H.; HARRIS, K. H. Influence of nucleus tractus solitarius stimulation and baroreceptor activation on rat parabrachial neurons. **Brain Res Bull**, v. 28, n. 4, p. 565-71, Apr 1992. ISSN 0361-9230 (Print)
0361-9230 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617439>>.

JHAMANDAS, J. H. et al. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res Bull**, v. 39, n. 2, p. 115-26, 1996 1996. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8846113>>.

JOHNSON, A.; THUNHORST, R. The neuroendocrinology, neurochemistry and molecular biology of thirst and salt appetite. In: LAJTHA, A. e LAUSTEIN, J. (Ed.). **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology**. . 3rd edn. New York: Springer, 2007. p.641-687.

JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 8, p. 1388-400, Aug 2007. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762373>>.

JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: GANTEN, D. e PFAFF, D. (Ed.). **Current Topics in Neuroendocrinology, Behavioral Aspects of Neuroendocrinology**. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. p.149-190.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 3, p. 292-353, Jul 1997. ISSN 0091-3022 (Print) 0091-3022 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237080>>.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology, neurochemistry and molecular biology of thirst and salt appetite. In: LAJTHA, A. e LAUSTEIN, J. (Ed.). **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology**. . 3rd edn. New York: Springer, 2007. p.641-687.

JUDY, W. V. et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21-9, Jun 1976. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/178466>>.

KEAST, R. S. J.; BRESLIN, P. A. An overview of binary taste–taste interactions. **Food Quality and Preference**, v. 14,, n. 2, p. 111–124, 2003.

KOBASHI, M. et al. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci Lett**, v. 158, n. 1, p. 47-50, Aug 6 1993. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233072>>.

KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H.; JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res Bull**, v. 30, n. 1-2, p. 163-72, 1993 1993. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678381>>.

LANCA, A. J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1117-26, Apr 1985. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2987755>>

http://ac.els-cdn.com/0306452285902817/1-s2.0-0306452285902817-main.pdf?_tid=7da2a8a4-1f98-11e3-89fe-00000aab0f6c&acdnat=1379422735_3a7d5323c2ba26dd0ed8fefef760c5e2>.

LEWIS, S. J. et al. Angiotensin II receptor binding in the rat nucleus solitarius is reduced after unilateral nodose ganglionectomy or vagotomy. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 125, p. 305-307, 1986 1986.

LIEM, D. G.; MIREMADI, F.; KEAST, R. S. Reducing sodium in foods: the effect on flavor. **Nutrients**, v. 3, n. 6, p. 694-711, Jun 2011. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254117>>.

MANGIAPANE, M. L. et al. Lesion of the area postrema region attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, v. 64, n. 1, p. 129-35, Jan 1989. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2909296>>.

MCKINLEY, M. J. et al. Angiotensin receptor binding in the human hypothalamus: autoradiographic localization. **Brain Res.**, v. 420, n. 2, p. 375-379, 1987 1987.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 1-6, 2004 2004.

MENANI, J. V. et al. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res**, v. 801, n. 1-2, p. 29-35, Aug 10 1998. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729254>
<http://ac.els-cdn.com/S0006899398005307/1-s2.0-S0006899398005307-main.pdf?_tid=8d709d0e-1f98-11e3-950d-00000aab0f6b&acdnat=1379422762_dd6d0a43557cff50644fe3a7e1cea036>.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. R555-60, Feb 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486317>>.

_____. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, n. 4, p. R201-10, Feb 15 2014. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401989>>.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1431-7, Nov 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9791058>>.

MENANI, J. V. et al. Central moxonidine on water and NaCl intake. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 4, p. 273-9, Jul 1 1999. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10424847>>

http://ac.els-cdn.com/S0361923099000593/1-s2.0-S0361923099000593-main.pdf?_tid=8a24e448-1f98-11e3-ac08-00000aacb361&acdnat=1379422756_6fb2426d85df5d6d0529a572b9b5ba68>.

MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1 Pt 2, p. R162-8, Jan 1996. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769798>>.

MENEZES, M. F. et al. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res**, v. 1372, p. 49-58, Feb 4 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129366>>.

MILLER, R. L. et al. Fos-activation of FoxP2 and Lmx1b neurons in the parabrachial nucleus evoked by hypotension and hypertension in conscious rats. **Neuroscience**, v. 218, p. 110-25, Aug 30 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641087>>.

MOREIRA, T. S. et al. Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 6, p. R1797-806, Jun 2009. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339677>>.

MOREIRA, T. S. et al. Involvement of central alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptors on cardiovascular responses to moxonidine. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, p. 164-171, 2007 2007.

MOREIRA, T. S. et al. Central blockade of nitric oxide synthesis reduces moxonidine-induced hypotension. **British J.Pharmacol**, v. 142, p. 765-771, 2004 2004.

MORI, K. Participation of the sympathetic nervous system in spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 37, n. 6, p. 609-18, Jun 1973. ISSN 0047-1828 (Print) 0047-1828 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4800400>>.

MORRISON, G. R.; YOUNG, J. C. Taste control over sodium intake in sodium deficient rats. **Physiol Behav**, v. 8, n. 1, p. 29-32, Jan 1972. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4665329>>.

MORTENSEN, L. H.; OHMAN, L. E.; HAYWOOD, J. R. Effects of lateral parabrachial nucleus lesions in chronic renal hypertensive rats. **Hypertension**, v. 23, n. 6 Pt 1, p. 774-80, Jun 1994. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8206576>>.

NORGREN, R. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. In: Y, K.;R, N., et al (Ed.). **Brain mechanisms of sensation**. New York: Wiley, 1981. p.143-160.

NURMINEN, M. L. et al. Effect of moxonidine on blood pressure and sympathetic tone in conscious spontaneously hypertensive rats. **Eur.J.Pharmacol**, v. 362, p. 61-67, 1998 1998.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282-93, Mar 1963. ISSN 0047-1828 (Print) 0047-1828 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13939773>>.

PENNER, S. B.; SMYTH, D. D. Central and renal II imidazoline preferring receptors: two unique sites mediating natriuresis in the rat. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 8 Suppl 1, p. 43-8, Mar 1994. ISSN 0920-3206 (Print) 0920-3206 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915136>>.

PENNER, S. B.; SMYTH, D. D. Sodium excretion following central administration of an II imidazoline receptor agonist, moxonidine. **Br.J.Pharmacol.**, v. 112, p. 1089-1094, 1994 1994.

_____. The role of the peripheral sympathetic nervous system in the natriuresis following central administration of an I₁ imidazoline agonist, moxonidine. **Br.J.Pharmacol.**, v. 116, p. 2631-2636, 1995 1995.

PEREIRA-DERDERIAN, D. T. et al. Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 310, n. 1, p. R15-23, Jan 1 2016. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538239>>.

PEREIRA-DERDERIAN, D. T. et al. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1298-309, May 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200133>>.

POTTS, P. D. et al. Effects of sinoaortic denervation on Fos expression in the brain evoked by hypertension and hypotension in conscious rabbits. **Neuroscience**, v. 77, n. 2, p. 503-20, Mar 1997. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472407>>.

RICHTER, C. P. Salt taste thresholds for normal and adrenalectomized rats. **Endocrinology** v. 24, p. 367-371, 1939.

ROBINSON, M. M.; EVERED, M. D. Pressor action of intravenous angiotensin II reduces drinking response in rats. **Am J Physiol**, v. 252, n. 4 Pt 2, p. R754-9, Apr 1987. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3551636>>.

ROCHA, M. J.; HERBERT, H. c-fos expression in the parabrachial nucleus following cardiovascular and blood volume changes. **J Hirnforsch**, v. 37, n. 3, p. 389-97, 1996. ISSN 0021-8359 (Print) 0021-8359 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8872561>>.

- ROWLAND, N. E. et al. Fos induced in brain of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II and co-localization with AT-1 receptors. **Brain Res**, v. 675, n. 1-2, p. 127-34, Mar 27 1995. ISSN 0006-8993 (Print)
0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796121>>.
- SANTOS, R. A.; KRIEGER, E. M.; GREENE, L. J. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. **Hypertension**, v. 7, n. 2, p. 244-52, Mar-Apr 1985. ISSN 0194-911X (Print)
0194-911X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2984118>>.
- SARNO, F. et al. [Estimated sodium intake by the Brazilian population, 2002-2003]. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 2, p. 219-25, Apr 2009. ISSN 1518-8787 (Electronic)
0034-8910 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225699>>.
- SARNO, F. et al. [Estimated sodium intake for the Brazilian population, 2008-2009]. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 3, p. 571-8, Jun 2013. ISSN 1518-8787 (Electronic)
0034-8910 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346570>>.
- SATO, M. A.; COLOMBARI, E.; MORRISON, S. F. Inhibition of neurons in commissural nucleus of solitary tract reduces sympathetic nerve activity in SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 5, p. H1679-84, May 2002. ISSN 0363-6135 (Print)
0363-6135 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959631>>.
- SATO, M. A. et al. Recovery of high blood pressure after chronic lesions of the commissural NTS in SHR. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 713-8, Oct 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900428>>.
- SATO, M. A.; YADA, M. M.; DE LUCA, L. A., JR. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiol Behav**, v. 60, n. 4, p. 1099-104, Oct 1996. ISSN 0031-9384 (Print)
0031-9384 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884939>>.
- SUGAWARA, A. M. et al. Noradrenaline and mixed alpha 2-adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. **Brain Res**, v. 839, n. 2, p. 227-34, Aug 28 1999. ISSN 0006-8993 (Print)
0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519045>
http://ac.els-cdn.com/S0006899399016959/1-s2.0-S0006899399016959-main.pdf?_tid=93d5dd08-1f98-11e3-950d-00000aab0f6b&acdnat=1379422772_e7656010c4c6a319b35298b1dd5084ae>.
- TALLEY, E. M. et al. Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v. 372, n. 1, p. 111-34, Aug 12 1996. ISSN 0021-9967 (Print)
0021-9967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841924>>.
- TOTOLA, L. T. et al. Commissural nucleus of the solitary tract regulates the antihypertensive effects elicited by moxonidine. **Neuroscience**, v. 250, p. 80-91, Oct 10 2013. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850502>>.

VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, n. 4, p. 471-503, Dec 2003. ISSN 1521-690X (Print) 1521-690X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687585>>.

VERNEY, E. B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc.Royal Soc., London**, v. 135, p. 25-106, 1947 1947.

VIEIRA, A. A. et al. Cardiovascular responses to microinjection of L-glutamate into the NTS in AV3V-lesioned rats. **Brain Res**, v. 1025, n. 1-2, p. 106-12, Oct 29 2004. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464750>>.

WARD, D. G. Stimulation of the parabrachial nuclei with monosodium glutamate increases arterial pressure. **Brain Res.**, v. 462, n. 2, p. 383-390, 1988 1988.

WHO. Reducing salt intake in populations. Report of a World Health Organization forum and technical meeting, 2006, Paris, France. 5-7 October 2006.

_____. In: (Ed.). **Guideline: Sodium Intake for Adults and Children**. Geneva, 2012. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). ISBN 9789241504836.

YAMAMOTO, T. et al. C-Fos Expression in the Parabrachial Nucleus after Ingestion of Sodium-Chloride in the Rat. **Neuroreport**, v. 4, n. 11, p. 1223-1226, Sep 10 1993. ISSN 0959-4965. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LX94300003 >.