

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA  
NA INGESTÃO DE SÓDIO INDUZIDA POR PRIVAÇÃO  
HÍDRICA EM RATOS**

**REGINA CÉLIA VENDRAMINI**

**Orientador: Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Junior**



**CONVÊNIO UFSCar/UNESP**  
2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA**  
**NA INGESTÃO DE SÓDIO INDUZIDA POR PRIVAÇÃO**  
**HÍDRICA EM RATOS**

**REGINA CÉLIA VENDRAMINI**



**CONVÊNIO UFSCar/UNESP**  
2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DO NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA  
NA INGESTÃO DE SÓDIO INDUZIDA POR PRIVAÇÃO  
HÍDRICA EM RATOS**

**Regina Célia Vendramini**

Tese de Doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos requisitos  
para a obtenção do Título de  
Doutor em Ciências Fisiológicas.

SÃO CARLOS  
2005

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

V543in

Vendramini, Regina Célia.

Influência do núcleo central da amígdala na ingestão de sódio induzida por privação hídrica em ratos / Regina Célia Vendramini. -- São Carlos : UFSCar, 2005.  
141 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Neurofisiologia. 2. Apetite ao sódio. 3. Núcleo central da amígdala. 4. Privação hídrica. 5. Detecção imunohistoquímica da proteína c-Fos. I. Título.

CDD: 612.8 (20<sup>a</sup>)

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço aos que colaboraram diretamente na elaboração, execução, análise dos dados e apresentação deste trabalho de Tese: Autores citados, Ana Vitor, Alexandre Vieira, Alexandre Santos, Christiane P. Soares, Centro de Referência Diagnóstica - NAC (FCF-UNESP), Daniela Borba, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP - Araraquara, Eliana Cainelli, Flávia Sales, Flávia Durlo, Iguatemy L. Brunetti, Juliana Constâncio, Juliana de Gobbi, Lisandra Brandino, Laboratório Experimental de Fisiologia, Marcos Dangona, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar - São Carlos, Professores do Programa e Professores da Fisiologia de Araraquara, Reginaldo Queiróz, Richard Boarato, Roseli Grippa, Silas Barbosa, Silvana Malavolta, Sílvia Fógliã, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Tânia Navarro Nunes, Teresa Pepato, Tirene Pavanelli e à você, que neste momento está lendo e doando seu tempo, possibilitando-me a busca de conhecimentos.*

*Agradeço aos que colaboraram indiretamente: **Minha família, amigos, alunos e todos os grandes parceiros do meu dia-a-dia**, que mesmo não estando participando diretamente deste trabalho, com certeza sempre dão suas contribuições diretas para uma Tese maior, a minha vida. Esta envolve a orientação e ajuda de muita gente na elaboração, execução de métodos imprevisíveis e variados protocolos, onde só os bons resultados deverão ser aproveitados. Como a Tese da vida está sempre incluindo novos e inesperados experimentos, é sempre bom contar com a ajuda de muitas pessoas queridas, que sempre nos motivam e que agora, mesmo não as citando nominalmente, quero dizer-lhes que são referências pessoais muito importantes nas minhas lembranças e em minhas ações, algumas pessoas em citações mais diárias, outras mais esporádicas, mas sempre presentes, de uma maneira que só eu possa atestar esta relevância e contribuição, possibilitando-me a busca de uma vida melhor.*

*Agradeço, em especial, ao **Laurival Antonio De Luca Jr.**, pois como orientador participou diretamente desta Tese e, como amigo, participa indireta e diretamente de uma Tese maior, a minha vida, sempre sendo uma referência científica a ser seguida e uma referência pessoal de amizade sempre compartilhada.*

## **EXPERIMENTAÇÃO**

***Permaneça sempre aberto e experimentador, sempre disposto a caminhar em uma trilha que você nunca percorreu antes.***

*Edison estava trabalhando em um certo experimento por quase três anos e fracassou setecentas vezes. Todos os seus colegas e alunos estavam completamente frustrados. Diariamente ele ia feliz ao laboratório, transbordando alegria, pronto a começar de novo. Era demais: setecentas vezes e três anos desperdiçados! Todos estavam convencidos de que o experimento não iria dar em nada. Tudo parecia inútil, apenas uma fantasia.*

*Reuniram-se então e disseram a Edison: “Fracassamos setecentas vezes! Não conseguimos coisa alguma e precisamos parar”.*

*Edison riu ruidosamente e disse: “O que vocês estão dizendo? Fracassamos? Fomos bem-sucedidos em saber que setecentos métodos não funcionam. A cada dia estamos nos aproximando cada vez mais da verdade! Se não tivéssemos batido nessas setecentas portas, não teríamos como saber. Mas agora estamos certos de que setecentas portas são falsas. Essa é uma grande conquista!”*

*Esta é a atitude científica básica: se você puder concluir que algo é falso, estará se aproximando da verdade. A verdade não está disponível no mercado para que você possa ir diretamente a ela e comprá-la. Ela não está pronta, disponível. Você precisa experimentar. Assim, seja um experimentador. E nunca se torne presunçoso, nunca ache que tudo o que você estiver fazendo é perfeito. Nunca é perfeito. Sempre é possível aprimorá-lo, sempre é possível torná-lo mais perfeito.*

Trecho extraído do livro **OSHO todos os dias**. Tradução de Leonardo Freire. 4 ed. Campinas: Verus Editora, 2003. p.37

## RESUMO

A lesão do núcleo central da amígdala (NCeA) reduz o comportamento de ingestão de sódio, mas não a sede, induzido por angiotensina II e depleção de sódio no modelo de furosemida. No presente trabalho investigamos o efeito da lesão do NCeA na ingestão de sódio induzida no modelo de privação hídrica-reidratação parcial (PHRP).

Ratos Holtzman adultos (260-320 g) ambientados por cinco dias com água, NaCl 1,8% e ração foram submetidos a lesão fictícia (n=12) ou lesões eletrolíticas do NCeA (1 mA /20 s): unilateral (n = 10) e bilateral (n = 8). Foi medida a ingestão diária de água e NaCl 1,8% cinco dias antes e cinco dias após as lesões. A lesão fictícia não alterou a ingestão diária de água nem de NaCl 1,8%. Lesões uni- ou bilaterais do NCeA reduziram a ingestão diária de sódio e não alteraram a ingestão diária de água.

Sete dias após as lesões, foram removidas a água e NaCl 1,8%, mas não a ração por 24 ou 36 horas. Então foi removida a ração e oferecida água por duas horas (modelo PHRP) e após a reidratação parcial, NaCl 1,8% e água foram oferecidos e medidos aos 15, 30, 60 e 120 minutos (teste do apetite ao sódio). Na privação hídrica de 24 horas, lesões do NCeA não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% ou água no teste do apetite ao sódio após reidratação parcial, já na privação hídrica de 36 horas, a lesão bilateral do NCeA reduziu a ingestão de NaCl 1,8% para  $3,4 \pm 1,7$  ml / h em relação



ao grupo com lesão fictícia ( $8,6 \pm 1,6$  ml / h,  $p < 0,05$ ), no teste do apetite após reidratação parcial. A ingestão de água não foi alterada pela lesão do NCeA. Houve incremento na ingestão regulatória de NaCl 1,8% em resposta a episódios repetidos de privações hídricas sucessivas em animais intactos. Este incremento não ocorreu em nenhum dos grupos com lesão do NCeA e nem mesmo no grupo com lesão fictícia. A lesão do NCeA reduziu também a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio com furosemida e remoção de sódio ambiente, confirmando os efeitos da lesão amigdalar já descritos na literatura. A integridade do NCeA é necessária para a expressão completa do apetite ao sódio no modelo PHRP em ratos, sendo importante para a ingestão regulatória de sódio.

A privação hídrica induz expressão da proteína c-Fos em núcleos hipotalâmicos e estruturas da lâmina terminal. Essa expressão é revertida ou permanece inalterada em diferentes núcleos após reidratação no modelo PHRP. Este trabalho também investigou o efeito de lesões do NCeA na expressão do gene c-Fos em áreas prosencefálicas e pontinas em resposta a 36 horas de privação hídrica e subsequente reidratação que precede a ingestão de sódio. Ratos ( $n = 6$  por grupo), com lesão fictícia (F) ou com lesão eletrolítica bilateral do NCeA (L), foram mantidos hidratados ou submetidos a privação hídrica e reidratação parcial, e tiveram os encéfalos perfundidos para detecção imunohistoquímica de neurônios expressando a proteína c-Fos. A expressão de c-Fos em estruturas da lâmina terminal, núcleo supra-óptico ou no núcleo parabraquial lateral não foi alterada e

aumentou no núcleo parabraquial medial e porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos com lesão bilateral do NCEA. A atividade neuronal aumentada no núcleo parabraquial medial pode estar relacionada ao efeito inibitório da lesão do NCEA no apetite ao sódio neste modelo.

## ABSTRACT

The lesion of central nucleus of amygdala (NCeA) decrease sodium intake, but not thirst, induced by angiotensin II and sodium depletion in furosemide model. In the present work we investigated the effect of lesion of NCeA on sodium intake induced by the water deprivation – rehydration protocol (PHRP).

Adult male Holtzman rats (260-320 g) housed for five days with water, 1.8% NaCl and regular food pellets received sham (n = 12) or eletrolytic lesion of NCeA (1 mA / 20 s): unilateral (n = 10) and bilateral (n = 8). The ingestion of water and 1.8% NaCl was recorded five days pre- and post-surgery. No significant alteration in daily water or sodium intake was produced after sham-lesion surgery. The uni- or bilateral lesions of NCeA reduced the daily 1.8% NaCl intake, but did not alter daily water intake.

Seven days after surgery, water and 1.8% NaCl were removed and only food remained available for 24 or 36 hours. Then, food was removed and water was offered for rehydration (2 hours), PHRP protocol. After partial rehydration with water, 1.8% NaCl and water was made available and ingestion was recorded at 15, 30, 60 and 120 minutes (sodium appetite test). No significant alteration was observed in cumulative 1.8% NaCl or water at sodium appetite test in NCeA lesioned rats after PH24hRP. After PH36hRP, the bilateral lesion of NCeA reduced 1.8% NaCl intake for  $3.4 \pm 1.7$  ml/h

compared with sham lesion ( $8.6 \pm 1.6$  ml / h,  $p < 0.05$ ). Water intake was not altered by NCeA lesion. There was an enhancement in need-induced 1.8% NaCl intake of intact rats in response to repeated episodes of water deprivation. This enhancement occurred neither in the group with NCeA lesion nor in the group with sham lesion. The NCeA lesion also reduced the 1.8% NaCl intake induced by sodium depletion with furosemide and removal of ambient sodium, thus confirming the effects of amygdalar lesion already described in the literature. The integrity of NCeA is necessary for full expression of sodium appetite in the PHRP protocol.

Water deprivation induced Fos expression in hypothalamic nuclei and cell groups of the lamina terminalis. Fos expression was reverted or did not change in different nuclei after rehydration in PHRP protocol. We also investigated the effect of lesion in the NCeA on Fos expression in forebrain and pontine structures in response to 36 hours of water deprivation and subsequent rehydration that immediately precede  $\text{Na}^+$  intake. Rats ( $n = 6$  per group), with sham lesion (F) or bilateral lesion of NCeA, were submitted to PH36hRP. Expression of Fos (as assessed by immunohistochemistry) in lamina terminalis or lateral parabrachial nucleus was not altered, but increased in medial parabrachial nucleus and parvocellular division of paraventricular nucleus of hypothalamus in NCeA lesioned rats. The increased neuronal activity in medial parabrachial nucleus may be related to the inhibitory effect of NCeA lesion on sodium appetite.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP = área postrema

BNST = núcleo da estria terminal

CVO's = órgãos circumventriculares

DAB = diaminobenzidina

dl = decilitro

DNR = núcleo dorsal da rafe

DOCA = desoxicorticosterona

g = grama

h = hora

i.c.v. = intracerebroventricular

i.p. = intraperitoneal

Kg = quilograma

mg = miligrama

min = minuto

ml = mililitro

mm = milímetro

MnPO = núcleo pré-optico mediano

NaCl = cloreto de sódio

NCeA = núcleo central da amígdala

NPB = núcleo parabraquial

NPBL = núcleo parabraquial lateral

NPBM = núcleo parabraquial medial

NTS = núcleo do trato solitário

OVLTL = órgão vasculoso da lâmina terminal

PB = tampão fosfato

PBS = tampão fosfato salina

PFA = paraformaldeído

PHRP = privação hídrica e reidratação parcial com água

PVN = núcleo paraventricular

rpm = rotações por minuto

sc = subcutânea

SFO = órgão subfornicial

SON = núcleo supraoptico

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Animais .....	19
3.2. Lesões eletrolíticas do Núcleo Central da Amígdala – NCeA .....	19
3.3. Ingestão diária de água e sódio .....	20
3.4. Privação hídrica 24 horas – reidratação parcial – modelo PH24hRP de ingestão de sódio – influência de lesões do NCeA .....	21
3.5. Privação hídrica 36 horas – reidratação parcial – modelo PH36hRP de ingestão de sódio – influência de lesões do NCeA .....	22
3.6. Verificação do incremento na ingestão de sódio após múltiplas privações hídricas .....	24
3.7. Teste do apetite ao sódio em animais depletados de sódio por desidratação com diurético – influência de lesões do NCeA .....	24
3.8. Parâmetros sanguíneos na privação hídrica – animais intactos 24 e 36 horas .....	25
3.9. Influência de lesão nos parâmetros sanguíneos – PR36hRP – animais com lesão fictícia e lesão bilateral do NCeA .....	26
3.10. Métodos utilizados nas determinações dos parâmetros sanguíneos .....	26
3.10.1. Hematócrito e proteínas séricas totais .....	26
3.10.2. Concentrações séricas de glicose .....	27
3.10.3. Concentrações séricas de triglicérides .....	28
3.10.4. Concentrações séricas de uréia .....	29
3.10.5. Concentrações séricas de sódio e potássio .....	30
3.10.6. Determinação da osmolalidade .....	30
3.10.7. Atividade da renina plasmática .....	31
3.10.8. Expressão da proteína c-Fos após PH36hRP – no momento de ingressar no teste do apetite ao sódio - influência de lesões do NCeA .....	31
3.11. Histologia .....	35

3.12. Seleção de cortes imunohistoquímicos para confecção de fotografias microscópicas para contagens de célula c-Fos positivas .....	37
3.13. Análises estatísticas .....	40
4. RESULTADOS .....	42
4.1. Histologia .....	42
4.2. Modelo privação hídrica de 24 horas e reidratação parcial com água por 2 horas – PH24hRP .....	44
4.2.1. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de NaCl 1,8% .....	44
4.2.2. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de água .....	45
4.2.3. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA no modelo PH24hRP .....	48
4.2.4. Comparação do comportamento de ingestão de NaCl 1,8% e água no teste do apetite ao sódio. Efeito do tempo de privação hídrica – animais intactos .....	52
4.3. Efeito da lesão do NCeA no modelo PH36hRP .....	57
4.3.1. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de NaCl 1,8% .....	57
4.3.2. Efeitos de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de água .....	58
4.3.3. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na primeira privação hídrica de 36 horas – modelo PH36hRP .....	61
4.3.4. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na segunda privação hídrica de 36 horas – modelo PH36hRP .....	66
4.4. Modelo depleção de sódio induzida por furosemida .....	71
4.4.1. Teste do apetite ao sódio após 24 horas de depleção de sódio .....	71
4.4.2. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão de NaCl 1,8% e água no teste do apetite ao sódio após 24 horas da depleção de sódio .....	71
4.5. Verificação do incremento na ingestão de sódio após sucessivas privações hídricas – modelo PH36hRP - teste apetite ao sódio .....	75
4.5.1. Grupo animais intactos .....	75
4.5.2. Grupo animais: lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA e lesão bilateral do NCeA .....	75



4.6. Efeitos da privação hídrica nas concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, proteínas totais, uréia, sódio, potássio e valores de hematócrito e osmolalidade .....	82
4.6.1. Privação hídrica de 24 horas .....	82
4.6.2. Privação hídrica de 36 horas .....	82
4.6.3. Efeitos da lesão bilateral do NCeA no modelo PH36hRP em parâmetros sanguíneos .....	83
4.7. Efeito das lesões bilaterais do NCeA na expressão da proteína c-Fos induzida por privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial em áreas prosencefálicas e pontinas .....	87
4.7.1. Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT) .....	87
4.7.2. Núcleo Pré-Óptico Mediano (MnPO) .....	91
4.7.3. Órgão Subfornicial (SFO) .....	95
4.7.4. Núcleo Supra-Óptico (SON) .....	98
4.7.5. Núcleo Paraventricular (PVN) .....	101
4.7.6. Núcleo Parabraquial (NPB) .....	105
5. DISCUSSÃO .....	109
5.1. Ingestão diária de NaCl 1,8% e água .....	109
5.2. Efeitos de lesões eletrolíticas do NCeA no apetite ao sódio induzido por privação hídrica .....	109
5.3. Incremento na ingestão de sódio após múltiplas privações hídricas .....	113
5.4. Efeito de lesões do NCeA na expressão da proteína c-Fos em áreas prosencefálicas e pontinas .....	115
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122

## 1. INTRODUÇÃO

A relação eficaz de animais terrestres com o ambiente depende de processos regulatórios que mantêm constantes as condições de seu meio interno, o *milieu intérieur* de Claude Bernard. O conjunto de mecanismos que atuam mantendo constante o meio interno e assim permitindo o funcionamento celular, definem a homeostase, conforme o proposto por Cannon (1932). Para que um organismo multicelular funcione adequadamente é necessário que os volumes dos compartimentos líquidos, o intracelular e o extracelular, estejam regulados. A concentração de sódio no líquido extracelular é determinante do equilíbrio osmótico e deve ser mantido dentro de faixas estreitas de variação, a fim de permitir o funcionamento adequado das células.

A integração funcional dos mecanismos homeostáticos é coordenada pelo sistema nervoso e pelo sistema endócrino, atuando conjuntamente em resposta às alterações ambientais. Na maioria das vezes, ingerimos mais água e sódio do que necessitamos e, principalmente os rins, eliminam o excesso. Entretanto, se as quantidades de água e de sódio estiverem muito reduzidas, caracteriza-se um estado de desidratação e serão ativados mecanismos de regulação, como os comportamentos motivados de beber água (sede) e ingerir sódio (apetite ao sódio).

A desidratação pode ser intracelular devido a um aumento na concentração extracelular de solutos osmoticamente ativos, gerando hiperosmolalidade e perda de água das células para o espaço extracelular (FITZSIMONS, 1985). O soluto mais efetivo para aumentar a concentração osmótica é o sódio e a desidratação intracelular pode ser produzida com dietas de alto teor de sódio ou induzida experimentalmente ou clinicamente com infusão endovenosa de soluções hipertônicas.

Mecanismos neurais e hormonais são acionados diante da desidratação intra ou extracelular e participam da restauração do equilíbrio hidroeletrólítico, que só é consumado por manifestação de comportamentos ingestivos de água e de sódio, restaurando a água e o sódio perdidos.

Um aumento de pelo menos 2% na osmolalidade extracelular leva à desidratação intracelular, produzindo sede e ativando os núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) hipotalâmicos, produtores e secretores de vasopressina e ocitocina. No PVN a porção magnocelular é responsável pelo aumento da ocitocina plasmática (que estimula a liberação de hormônios natriuréticos e a excreção de solutos pela natriurese) e a porção parvocelular é responsável pelo aumento de ocitocina central (que inibe a ingestão de sódio e alimento), evitando o agravamento da desidratação (ANTUNES-RODRIGUES e cols., 1991; VERBALIS e cols., 1993).

Em modelos de desidratação extracelular a perda do líquido extracelular é, necessariamente, acompanhado do íon sódio, portanto, neste

caso, há depleção de sódio, induzindo hipovolemia. Os mecanismos ativados para corrigir a hipovolemia, o que só acontece pela reposição de sódio e água, dependem do modelo experimental (STRICKER e cols., 1992; THUNHORST & JOHNSON, 1994; DE LUCA Jr. e cols., 2002a). A desidratação extracelular é devido à redução do volume do compartimento extracelular, causando hipovolemia. Pode ser produzida por diarreias, vômitos, hemorragias e substâncias diuréticas. Experimentalmente, pode ser induzida por adrenalectomia (RICHTER, 1936), injeções de soluções hiperoncóticas, como o polietilenoglicol (STRICKER, 1981), injeção de formalina (HANDAL, 1965), diálise peritoneal (FALK, 1965) ou por indução farmacológica com uso do diurético como a furosemida, que induz perda renal de água e eletrólitos, combinada com dieta pobre em sódio (JALOWIEC, 1974). Na desidratação extracelular, a hipovolemia desencadeia vários mecanismos de regulação na tentativa de restabelecer o volume do líquido extracelular, envolvendo o sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina (fatores não osmóticos) e outros hormônios, respondendo a alterações que dependem do modelo empregado para a obtenção experimental da desidratação extracelular. Em modelos de desidratação extracelular com o uso de hemorragias severas há redução de 30% do volume sanguíneo e redução aguda da pressão arterial, já na desidratação extracelular seletiva obtida no modelo de depleção de sódio induzida por furosemida há redução de 8% do volume sanguíneo, aumento de atividade de renina, angiotensina e

aldosterona plasmáticas (JALOWIEC, 1974; SAKAI e cols., 1989; ROWLAND & FREGLY, 1992; SCHOORLEMMER e cols., 1997), sendo que, neste modelo, a pressão arterial não é reduzida (DE LUCA Jr. e cols., 1996). A privação hídrica promove conjuntamente a desidratação intra e extracelular, isto é, hiperosmolemia e hipovolemia, aumento de atividade de renina e angiotensina plasmáticas, sendo que as alterações da volemia, que são semelhantes ao modelo da furosemida, não são acompanhadas de alterações significantes da pressão arterial e aldosterona plasmática (RAMSAY e cols., 1988; DE LUCA Jr. e cols., 2002a).

Embora os comportamentos de ingestão de água e de sódio sejam distintos, eles apresentam várias características em comum. Ambos são ativados por desidratação extracelular ou depleção de sódio (FITZSIMONS, 1972; BOLLES, 1975; DENTON, 1984) e ambos dependem de angiotensina II (AVRITH & FITZSIMONS, 1980; BUGGY & JONKLASS, 1984; ROWLAND & FREGLY, 1992; FITZSIMONS, 1998). Tipicamente, a ingestão de água (sede) surge logo nas primeiras duas horas e a ingestão de cloreto de sódio hipertônico (apetite ao sódio) surge entre cinco e dez horas após a indução de depleção de sódio (STRICKER & JALOWIEC & STRICKER, 1970; DE LUCA Jr. e cols., 1992).

No rato está demonstrado que a desidratação, provocada por privação hídrica, induz apetite ao sódio (WEISINGER e cols., 1985). Esta especificidade tem sido confirmada por trabalhos em andamento no nosso laboratório, onde, animais submetidos à privação hídrica por 24 horas e

reidratação parcial, aumentam seletivamente a ingestão de soluções minerais contendo sódio em testes de preferência entre soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M e NaCl 0,15 M (LEITE e cols., 2004).

Aumento da preferência por sódio, durante privação hídrica, tem sido relatada em humanos (TAKAMATA e cols., 1994). A privação hídrica é um modelo de indução do apetite ao sódio que simula o que ocorre com frequência na natureza e, o entendimento de seus mecanismos, é de grande interesse para as estratégias de hidratação e restabelecimento da homeostase em animais e humanos (LESHEM, 1999; KLEINER, 1999).

A privação hídrica é uma das formas mais naturais de se produzir desidratação, induzindo natriurese em ratos, coelhos e ovelhas e conseqüente redução do líquido extracelular (LUKE, 1973; McKINLEY e cols., 1983; SCHOORLEMMER & EVERED, 1993). O apetite ao sódio emerge facilitado pela angiotensina II podendo depender da retirada de inibidores, tais como: ocitocina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, noradrenalina, colecistoquinina e serotonina (ANTUNES-RODRIGUES e cols., 1986; RENAUD e cols., 1987; REIS e cols., 1990; MENANI & JOHNSON, 1998a, 2000; FRANCHINI & VIVAS, 1999; DE LUCA Jr. e cols., 2002b, 2003).

No modelo de privação hídrica, o apetite ao sódio é mediado por angiotensina II, pois a aplicação central de antagonistas de receptores de angiotensina II ou bloqueadores da enzima conversora de angiotensina

periféricamente aplicados, suprimem a ingestão de sódio hipertônico após privação hídrica de 24 horas e reidratação parcial com água (SATO e cols., 1996).

O modelo de privação hídrica mais reidratação parcial com água por duas horas (PHRP) fornece subsídios para o estudo da sede e do apetite ao sódio, separadamente. O rato é privado de água, ocorre hipovolemia, aumento da atividade de renina plasmática, aumento da osmolalidade e sódio plasmático. Reidrata-se parcialmente o animal com água por duas horas. O período de reidratação parcial corrige totalmente a osmolalidade, mas só parcialmente a hipovolemia e a atividade de renina plasmática permanece aumentada, assim como no período de desidratação (DE LUCA Jr. e cols., 2002a). No momento em que o rato tem acesso à solução de NaCl 1,8% (teste do apetite ao sódio) estão presentes sinais facilitadores do apetite ao sódio, como hipovolemia e angiotensina II, e, com a correção da osmolalidade, estão desativados os sinais inibitórios cardiovasculares de baixa pressão e de hipertonicidade para os circuitos do apetite ao sódio (JOHNSON & THUNSHORT, 1997; DE LUCA Jr. e cols., 2002b). Após reidratação, uma solução hipertônica de NaCl 1,8% é oferecida em conjunto com água (teste do apetite ao sódio) medindo-se as ingestões cumulativas aos 15, 30, 60 e 120 minutos. A ingestão de sódio corrige totalmente o volume do líquido extracelular e a perda de sódio que ocorreu na natriurese promovida pela privação hídrica (SCHOORLEMER & EVERED, 1993; DE LUCA Jr. e cols., 2002a).

O apetite ao sódio é um comportamento motivado inato em diversos mamíferos, que quando sujeitos à depleção de sódio ingerem soluções com sódio, mesmo sem nunca terem tido acesso prévio a estas soluções (DENTON, 1984). Apesar de ser um comportamento inato, mesmo assim pode sofrer influência da experiência, sofrendo incrementos diante de desidratações extracelulares sucessivas na fase adulta (EPSTEIN, 1991), ou na fase fetal uma vez que ratas grávidas, submetidas à depleção de sódio ou outras situações que induzem o apetite ao sódio, terão prole que, quando adultos, apresentarão incremento na ingestão regulatória (resposta à depleção de sódio) ou não regulatória (ingestão diária em quantidade acima da necessária) (GALAVERNA e cols., 1995; LESHEM e cols., 1999). Privações hídricas no modelo PHRP, incrementam a ingestão diária de sódio (não regulatória) ocorrendo em ratos submetidos a múltiplos episódios de privação, sem aumentar a ingestão de água (PEREIRA e cols., 2002).

Diante da depleção de sódio e hipovolemia, baroreceptores renais sinalizam para as células justaglomerulares o aumento de renina que, por clivagem do angiotensinogênio hepático, formam angiotensina I que, por ação da enzima conversora de angiotensina, forma a angiotensina II. A angiotensina II pode ser originada em vários tecidos, mas sua fonte mais significativa é a partir da clivagem da angiotensina I nos pulmões (FERRARIO, 1990). O cérebro também produz sua própria angiotensina II que pode agir independentemente da circulante (BUNEMANN e cols., 1993). A angiotensina II é, fisiologicamente, a forma mais importante de



angiotensina, produzindo uma variedade de respostas mediadas pelo cérebro e receptores periféricos de angiotensina II abrangendo respostas celulares e comportamentais. A angiotensina II produz seus efeitos celulares por meio de proteínas reguladoras G acopladas aos receptores da membrana celular que fazem a mediação, dependendo do tecido, inibindo a adenilato ciclase e diminuindo as concentrações intracelulares de AMP<sub>c</sub>, ativando a fosfolipase C e aumentando o inositol trifosfato e diacilglicerol ou promovendo a abertura dos canais de cálcio da membrana celular aumentando as concentrações de cálcio citosólico, exercendo assim, seus diferentes efeitos nas células alvo (JEFFRIES & PETTINGER, 1989). Respostas no balanço hidro-eletrolítico e função cardiovascular incluem aumento na pressão arterial por produzir vasoconstrição arteriolar e facilitação da liberação de noradrenalina nas terminações simpáticas, secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, estimulação direta na reabsorção tubular de sódio, liberação de vasopressina, ingestão de água e indução da ingestão regulatória de sódio (ZIMMERMAN e cols., 1981, 1984; PHILLIPS, 1987; WRIGHT & HARDING, 1992).

A angiotensina II circulante age nos órgãos circumventriculares (CVO's: área postrema – AP; órgão subfornicial: SFO; órgão vascular da lâmina terminal: OVLT), desprotegidos de barreiras hemato-encefálica, podendo responder tanto a angiotensina II circulante como a angiotensina II cerebral. Foi observado que em ratos depletados de sódio pelo tratamento com furosemida, associado com baixas doses de inibidor da enzima

conversora de angiotensina, captopril (modelo furocap), que por não formar a angiotensina II circulante, aumenta a angiotensina II de origem cerebral, o apetite ao sódio induzido por este modelo foi inibido por aplicação central de inibidor da enzima conversora de angiotensina no OVLT (FITTS & MASSON, 1996). Assim, os CVO's respondem tanto à angiotensina II circulante quanto à angiotensina II de formação local. Do SFO partem eferências para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), PVN, SON e para outras áreas do sistema límbico, incluindo a amígdala. O OVLT é também sensível às variações da osmolalidade e também se projeta para o MnPO. Estes núcleos, integrantes da lâmina terminal (SFO, OVLT e MnPO), são associados ao efeito ativador da sede e apetite ao sódio pela angiotensina II (SIMPSON & ROUTTENBERG, 1978; WEISINGER e cols., 1990; DE LUCA Jr. e cols., 1992; COLOMBARI e cols., 1996), pois possuem receptores e terminais de angiotensina II em abundância (LIND e cols., 1985; MENDELSON e cols., 1984).

Aparentemente, múltiplos sistemas agem em conjunto para sinalizar a desidratação. Variações na concentração de angiotensina II e de sódio são detectadas por neurônios angiotensinérgicos e osmosodiodetectores dos CVO's (OLDFIELD & MCKINLEY, 1995; JOHNSON & THUNHORST, 1997; MCKINLEY e cols., 2001a). Sinais viscerais detectados por baroreceptores, receptores cardiopulmonares osmosodiodetectores gástricos e hepáticos, trafegam por aferências vagais, glossofaríngeas e gástricas para o núcleo do trato solitário (NTS) e daí para a

área postrema (AP) e núcleo dorsal da rafe (DNR) de onde partem eferências para o núcleo parabraquial lateral (NPBL), PVN, amígdala e outras áreas do sistema límbico (FRANCHINI e cols., 2002, SHAPIRO & MISELIS, 1985; LANÇA & KOOY, 1985).

A amígdala recebe projeções angiotensinérgicas dos órgãos circumventriculares particularmente do SFO e aferências viscerais provenientes da AP, NTS e NPB (subdividido em lateral e medial). A amígdala interpreta estímulos internos e externos, integrando sinais viscerais (humorais e neuronais) do conteúdo de sódio e sinais somáticos (gosto), predispondo o animal para o comportamento motivado de procura e ingestão de água e sódio (SCHULKIN, 1991; SPECTOR e cols., 1992; JOHNSON & THUNSHORST, 1997; McKINLEY e cols., 2001b, ALBRECHT e cols., 2003).

Trabalhos clássicos na década de 60, do Prof. Covian e seus colaboradores estão entre os primeiros a estudarem a importância dos núcleos da amígdala para o controle da ingestão de sódio. Em animais com lesões bilaterais do hipotálamo anterior (destruindo PVN e SON), lesões da região corticomedia da amígdala, área septal e bulbo olfatório, determinaram aumento específico da ingestão de sódio, portanto, a região corticomedia da amígdala expressou caráter inibitório e lesões da região basolateral (estimulatória), diminuíram a ingestão de sódio. Estes trabalhos estabeleceram a importância de áreas límbicas para circuitos neurais que controlam o apetite ao sódio e balanço hidromineral, demonstrando que impulsos neurais facilitatórios do apetite ao sódio poderiam passar pela

amígdala, hipocampo, córtex motor e sensorial e convergir para o hipotálamo, iniciando o apetite ao sódio (COVIAN & ANTUNES-RODRIGUES, 1963; GENTIL e cols., 1968; SAAD e cols., 1972, 1981).

A amígdala (complexo amigdalóide) está localizada nos lobos temporais e tem como principais regiões os núcleos: medial: recebe aferências do bulbo olfativo (odores e feromônios) e envia informações para o prosencéfalo e hipotálamo; lateral: recebe informações sensoriais do córtex primário, do tálamo e formação hipocampal e projeta-se para os núcleos basal e central do complexo amigdalóide; basal: recebe aferências sensoriais dos núcleos lateral e basolateral do complexo e projeta-se para o núcleo central e matéria cinzenta periaquedutal; central: recebe aferências dos núcleos basolateral e basal do complexo amigdalóide e projeta-se para o hipotálamo, mesencéfalo, ponte e bulbo.

Assim, o núcleo central da amígdala (NCeA) é responsável por respostas emocionais e comportamentais (CARLSON e cols., 2002) e apresenta particular interesse no comportamento motivado na ingestão de sódio por manter conexões recíprocas com o bulbo, através do NTS e ponte, através do núcleo parabraquial (NPB), processadores de informações gustatórias, olfatórias e viscerais (NORGREN, 1995). A integridade do NCeA é necessária para vários mecanismos relacionados à ingestão de sódio. Lesões bilaterais do NCeA abolem a ingestão diária de NaCl 3% e o apetite ao sódio induzido pela depleção no modelo da furosemida combinada à remoção de sódio ambiente e a ingestão de NaCl 3% durante o tratamento

com desoxicorticosterona (DOCA), composto esteróide com propriedades semelhantes à aldosterona e por ativação da angiotensina II cerebral com injeção i.c.v. de renina (GALAVERNA e cols., 1992). O incremento na ingestão de sódio é também atenuado em ratos com lesão bilateral da amígdala do NCeA submetidos a múltiplas depleções de sódio induzidas por furosemida (GALAVERNA e cols., 1992). No entanto, este mesmo trabalho testou a ingestão diária de soluções palatáveis de sacarose 5%, comida e água e mostrou que animais com lesão bilateral do NCeA não sofreram danos globais na ingestão, verificando déficits específicos para a ingestão de NaCl 3%.

A indução do apetite ao sódio pode ser promovida em ratos repletos de sódio com injeções subcutâneas de ioimbina, um antagonista adrenérgico alfa-2 (THUNHORST e cols., 1990). Lesões do NCeA em ratos depletados de sódio com furosemida ou com ioimbina (sc) mostraram uma redução em torno de 70% após as lesões na ingestão cumulativa medida por 3 horas e na ingestão diária de NaCl 2%. As lesões do NCeA não afetaram a ingestão de água, quer por desidratação intracelular promovida por salina hipertônica, sc, ou por desidratação extracelular promovida por furosemida ou sede induzida por angiotensina II, sc, reforçando o conceito que lesões do NCeA reduzem especificamente o apetite ao sódio. Lesões do NCeA ou da porção lateral do núcleo da estria terminal (BNST) comportaram-se similarmente na redução do apetite ao sódio no modelo apresentado (ZARDETTO-SMITH e cols., 1994).

O NCEA e o BNST (ventral e lateral) formam um complexo denominado amígdala estendida (núcleo da estria terminal, substância inominada sublenticular e neurônios dos núcleos medial e central da amígdala) que, por suas similaridades funcionais, estruturais e neuroquímicas, suportam a idéia que são reciprocamente conectados com vários núcleos envolvidos no controle cardiovascular e balanço hidroeletrólítico (VEENING e cols., 1984; DeOLMOS e cols., 1985; ALHEID e cols., 1995; JOHNSON e cols., 1999).

Os resultados de lesões do NCEA, embora reduzindo o apetite ao sódio, não parecem advir de desordens da função gustatória, pois estes animais discriminam estímulos sapidos aplicados à língua, respondendo normalmente aos testes de reatividade gustatória ao NaCl (AZUMA e cols., 1984; SEELEY e cols., 1993). Este núcleo não parece ser importante para a sensação ao sabor, mas sim para conectar informações gustatórias provenientes de áreas bulbares (NTS) e pontinas (NPB) aos sistemas motores responsáveis para o consumo de sódio, sendo essas respostas modificadas pelo conteúdo de sódio do meio interno (GALAVERNA e cols., 1993; LUNDY & NORGREN, 2001).

Vias gustatórias do terço anterior da língua trafegam pelo nervo corda do tímpano e facial para o NTS e deste núcleo para o NPBL e amígdala estendida. (SCHULKIN, 1991; SPECTOR e cols., 1992; NORGREN, 1981; JOHNSON e cols., 1999). Com relação aos aspectos gustatórios, a estimulação elétrica do NCEA pode inibir ou facilitar respostas

aos testes de seletividade ao NaCl aplicado diretamente na língua de ratos, utilizando-se como supressor de canais de sódio o amiloride, sendo que prevalece a inibição na modulação da seletividade ao NaCl (LUNDY & NORGREN, 2001).

O NPB, processador de informações gustatórias provenientes da AP e NTS, também se projeta para o hipotálamo e amígdala, exercendo um controle inibitório, por via serotoninérgica, no sentido de limitar a ingestão de sódio (MENANI & JOHNSON, 1995). Mecanismos serotoninérgicos inibitórios no NPBL, foram descritos por Menani & Johnson (1995) através de injeções de metisergida (antagonista serotoninérgico). Sob efeitos indutivos da ingestão de sódio, tais como angiotensina II i.c.v., tratamento combinado de furosemida e baixas doses de inibidor da enzima conversora da angiotensina ou tratamento com desoxicorticosterona, o antagonista serotoninérgico metisergida no NPBL aumentou de forma pronunciada a ingestão de sódio induzida por estes tratamentos (MENANI & JOHNSON, 1995; MENANI e cols., 1996; DE GOBBI e cols., 2000) ou ainda por desidratação intracelular seletiva provocada por NaCl 2 M intragástrica (DE LUCA Jr. e cols., 2003). Mecanismos inibitórios serotoninérgicos ou colinérgicos presentes no NPB, diante da desidratação evitariam que o animal com desidratação intra e extracelular, como é o caso da privação hídrica, com hiperosmolalidade e hipernatremia bebesse sódio e agravasse seu quadro de desidratação. A atuação da metisergida no NPBL não modifica a ingestão de sódio ou água, sem que o estímulo natriorexigênico ou dipsogênico esteja presente

(COLOMBARI e cols., 1996; MENANI e cols., 1998b), sendo que a presença de sinais facilitatórios para a ingestão de sódio é que vão determinar a remoção de vias inibitórias serotoninérgicas do NPBL.

A influência de lesões do NCEA na redução do apetite ao sódio foi extensamente averiguada utilizando-se, como estratégia de indução do apetite ao sódio, modelos de desidratação extracelular seletiva. No entanto não se conhecem estudos da influência de lesões do NCEA na ingestão de sódio induzida por privação hídrica. Será que lesões do NCEA interferem como o apetite ao sódio no modelo PHRP?

Para entendimento da complexa circuitária neuronal que controla o apetite ao sódio, tem-se estudado a ativação neuronal através da detecção do produto protéico do protooncogene c-Fos por técnicas imunohistoquímicas (HUGHES & DRAGUNOW, 1995). Conhecidos como genes de expressão imediata, os genes desta família são considerados importantes transdutores de sinais que incidem sobre as células. Estes sinais incluem neurotransmissores e hormônios que podem ativar os genes de expressão imediata em poucas horas, o que ajuda a delinear vias neurais ativas através do aumento da imunoreatividade para proteína c-Fos em várias estruturas encefálicas de ratos após tratamentos que induzem a ingestão de sódio e água, tais como: angiotensina II, icv (HERBERT e cols., 1992; XU & HERBERT, 1994), salina hipertônica (HOCHSTENBACH & CIRIELLO, 1996), depleção de sódio com furosemida associado ao captopril (THUNHORST e cols., 1998), diálise peritoneal (VIVAS e cols., 1995;



FRANCHINI e cols., 2002) e na privação hídrica (McKINLEY e cols., 1994; DE LUCA Jr. e cols., 2002a).

A expressão da proteína c-Fos é induzida por privação hídrica em várias áreas cerebrais, tais como SFO, OVLT, MnPO e nos núcleos hipotalâmicos SON e PVN, que são fontes de vasopressina e ocitocina para a pituitária posterior. McKinley e cols. (1994) demonstraram o aumento na expressão c-Fos em estruturas da lâmina terminal (MnPO e OVLT) e SON e PVN após privação hídrica. Na privação hídrica por 24 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (modelo PHRP), após a reidratação parcial, a expressão c-Fos é reduzida no OVLT e MnPO, desaparece no SON e permanece inalterada no SFO. A persistência da expressão gênica c-Fos no SFO e aumento na atividade de renina plasmática que antecede a ingestão de sódio no teste do apetite ao sódio em ratos submetidos à privação hídrica podem indicar que o sinal para a ingestão de sódio na privação hídrica seja mediado pela angiotensina II produzida ou angiotensina II associada a outro sinal ou ainda pela remoção de sinais inibitórios, através da diluição extracelular causada pela ingestão de água no período de reidratação parcial, previamente ao teste do apetite ao sódio (DE LUCA Jr. e cols., 2002a).

Em trabalho usando como modelo de desidratação extracelular com diálise peritoneal, foi demonstrado que a expressão c-Fos em núcleos serotoninérgicos (AP e núcleo dorsal da rafe) foi diminuída quando em estado de depleção e aumentada em animais que ingeriram NaCl 2%

(FRANCHINI e cols., 2002). Considerando as projeções da AP-NTS e núcleo dorsal da rafe para o NPBL (REIS e cols., 1994), possuidor de sistema serotoninérgico inibitório para a ingestão de sódio (MENANI & JOHNSON, 1995; MENANI e cols., 1996; DE LUCA Jr. e cols., 2003), e suas conexões com o NCeA (FULWILER & SAPER, 1984; SPECTOR e cols., 1992; JOHNSON e cols., 1999; FRANCHINI & VIVAS, 2002), cabe o seguinte questionamento: será que lesões do NCeA interferem com a atividade neuronal em áreas que controlam o apetite ao sódio?

Neste trabalho analisaremos a influência de lesões do NCeA no apetite ao sódio induzido por privação hídrica e os efeitos de lesões do NCeA na expressão da proteína c-Fos em áreas prosencefálicas e pontinas após a reidratação parcial em ratos submetidos à privação hídrica por 36 horas (modelo PHRP), na busca do conhecimento dos circuitos envolvidos na modulação do apetite ao sódio para o restabelecimento do equilíbrio hidromineral.

## 2. OBJETIVOS

1. Verificar se a integridade do núcleo central da amígdala (NCeA) é necessária para o comportamento de ingestão de sódio induzido por privação hídrica (modelo PHRP).

2. Verificar se a expressão da proteína c-Fos induzida por privação hídrica em áreas prosencefálicas e pontinas é alterada por lesões bilaterais do NCeA.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Sprague Dawley-Holtzman, adultos, com peso entre 260 e 320 g. Os animais foram mantidos no Laboratório Experimental de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara - SP, com temperatura entre 21 e 25 °C, umidade  $55 \pm 10\%$  e ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas às 8 h 00 e apagadas às 20 h 00), em gaiolas individuais de aço inoxidável. Eles foram ambientados por pelo menos cinco dias, antes do início dos experimentos ou registros de ingestão, sendo diariamente manipulados pela experimentadora até o final dos experimentos.

Ração Purina granulada padrão contendo mais sódio (0,5 – 1,0%) do que o mínimo requerido pelo rato (The Harvard Bioscience Whole Rat Catalog), água de torneira e solução de cloreto de sódio 1,8% (p/v) ficaram disponíveis livremente a não ser quando indicado o contrário.

#### **3.2. Lesões eletrolíticas do Núcleo Central da Amígdala - NCeA**

Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg / kg de peso corporal) / xilazina (7 mg / kg de peso corporal) i.p. e em seguida a cabeça de cada animal foi fixada em aparelho estereotáxico (modelo Kopf

900). Após a trepanação do crânio com uma broca circular, foi introduzido bilateralmente um eletrodo de aço inoxidável isolado, exceto na extremidade (0,5 mm), seguindo as coordenadas: 2,2 e 2,7 mm caudal ao bregma, 4,1 mm lateral ao seio sagital e 6,3 mm de profundidade a partir da dura-máter. A cada introdução, foi liberada um corrente anódica de 1 mA durante 20 segundos. Em animais com lesão fictícia, o eletrodo foi introduzido até 5,3 mm abaixo da dura-máter, mantidas as demais coordenadas, sem passagem de corrente. Ao final das cirurgias os animais receberam uma dose profilática (0,2 ml 1.200.000 UI por rato, i.m.) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge) e foram recolocados em suas gaiolas individuais.

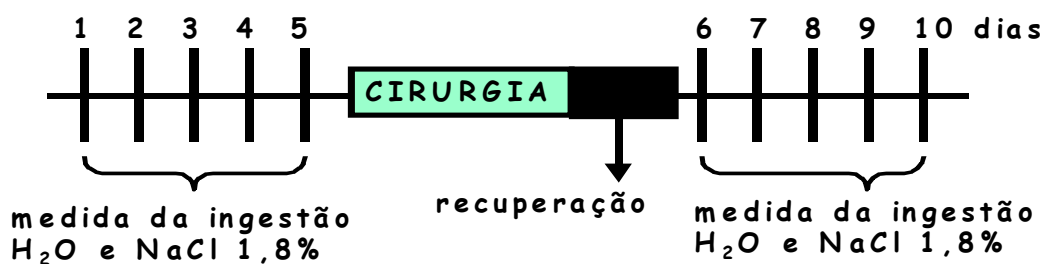
Alguns animais com danos no NCeA, podem apresentar afagia e adipsia moderadas nos primeiros cinco dias pós-cirúrgicos, resultando em perda de até 5% do peso corporal (GALAVERNA e cols., 1992). Portanto, os experimentos iniciaram pelo menos uma semana após as cirurgias para aguardar a recuperação de todos os animais. Aqueles em que a redução na ingestão diária de água persistiu por mais de um dia receberam, além de ração, água e NaCl 1,8%, uma solução palatável de sacarose 10% para reidratação e reposição calórica no período de recuperação pós-cirúrgica, até que restabelecessem a ingestão normal de água.

### **3.3. Ingestão diária de água e sódio**

A quantidade ingerida de água e NaCl 1,8% de cada animal foi medida diariamente entre 10h00 e 12h00 por cinco dias antes da cirurgia,

durante o período de recuperação por uma semana e por mais cinco dias, utilizando-se bebedouros de polipropileno com capacidade para 100 ml, graduados a cada ml, fixados na frente de cada gaiola.

**PROTOCOLO: Ingestão diária de NaCl 1,8% e água**

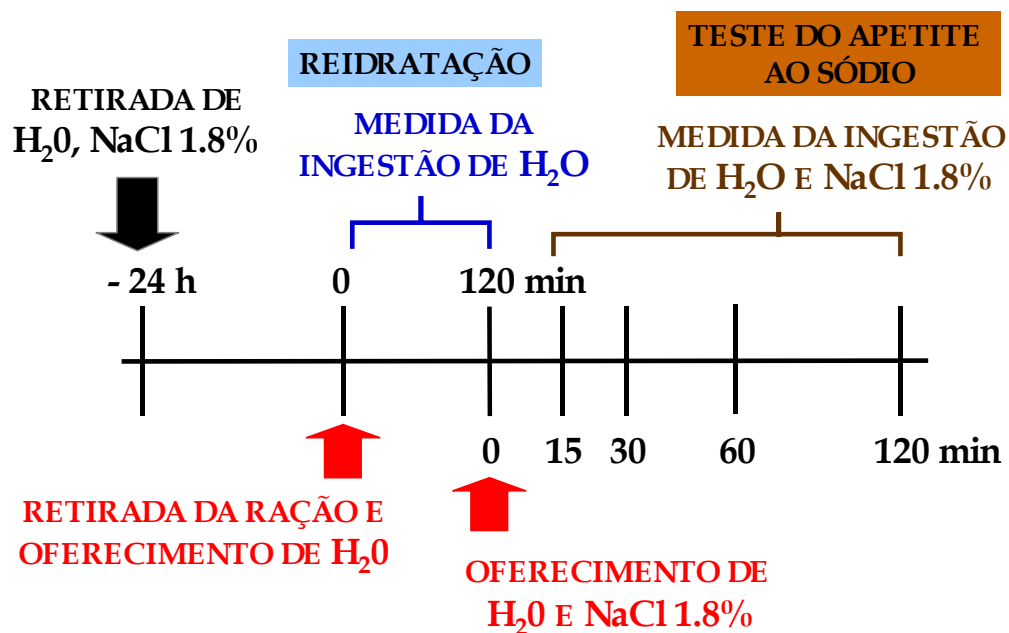


**3.4. Privação hídrica 24 horas – reidratação parcial – modelo PH24hRP de ingestão de sódio – influência de lesões do NCeA**

A água e NaCl 1,8% foram removidos das gaiolas às 8h00 e somente ração ficou disponível por 24 horas; a ração foi então removida às 8h00 do dia seguinte e apenas água foi oferecida por duas horas em buretas de vidro graduadas a cada 0,1 ml, com bico de aço inoxidável. No final destas duas horas (período de reidratação), foi medida a ingestão de água e anexada uma outra bureta com NaCl 1,8% e medidas as ingestões de água e

NaCl 1,8% aos 15, 30, 60 e 120 minutos (teste do apetite ao sódio após PH24hRP).

### PROTOCOLO: Privação hídrica 24 horas – modelo PHRP

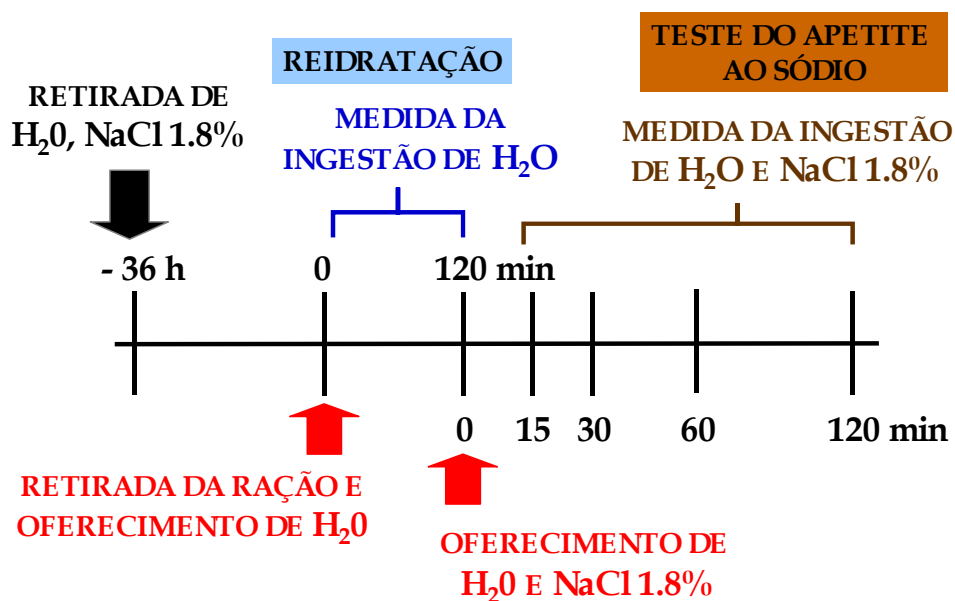


### 3.5. Privação hídrica 36 horas – reidratação parcial – modelo PH36hRP de ingestão de sódio – influência de lesões do NCeA

Os experimentos iniciais com 24 horas de privação hídrica mostraram pouca diferença entre animais com lesão real e fictícia do NCeA, provavelmente porque a ingestão de NaCl 1,8% dos animais com lesão fictícia não foi tão intensa em resposta a privação hídrica. Buscando uma

ativação mais intensa do apetite ao sódio, foram preparados novos grupos que foram submetidos à privação hídrica de 36 horas. Nesses, a água e NaCl 1,8% foram removidos das gaiolas às 20h00 e somente ração ficou disponível pelas próximas 36 horas. A ração foi então removida às 8h00 e apenas água foi oferecida em buretas de vidro, graduadas a cada 0,1 ml, com bicos de aço inoxidável. No final destas duas horas (período de reidratação), foi medida a ingestão de água e anexada uma outra bureta com NaCl 1,8% e medidas as ingestões de água e NaCl 1,8% aos 15, 30, 60 e 120 minutos (teste do apetite ao sódio após PH36hRP).

### PROTOCOLO: Privação hídrica 36 horas - modelo PHRP





### ***3.6. Verificação do incremento na ingestão de sódio após múltiplas privações hídricas***

Os animais do grupo intacto no PH36hRP sofreram quatro privações sucessivas de 36 horas, com intervalos de uma semana entre as privações, para verificação do incremento na ingestão de NaCl 1,8% nos testes do apetite ao sódio após múltiplas privações.

Os grupos de animais com lesão fictícia ou lesão eletrolítica do NCeA, depois uma semana do teste do apetite ao sódio após PH36hRP, mantidos com ração, água e NaCl 1,8% disponíveis, sofreram uma segunda privação hídrica de 36 horas seguida de reidratação parcial e teste do apetite ao sódio para verificação da influência das lesões do NCeA no incremento da ingestão de sódio após privações hídricas sucessivas.

### ***3.7. Teste do apetite ao sódio em animais depletados de sódio por desidratação extracelular com diurético – influência de lesões do NCeA***

Para confirmar se o efeito da lesão amigdalár poderia ser estendida ao modelo de desidratação extracelular seletiva nos mesmos animais do experimento 3.5, uma semana após o término desse experimento cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 1 ml de furosemida (10 mg / ml) após as gaiolas terem sido enxaguadas para remoção do sódio ambiental. Os animais permaneceram então com dieta deficiente em sódio

(fubá, 0,001% de sódio, 0,33% de K) e com água por 24 horas. Então, foi retirado o fubá e oferecido aos animais duas buretas de vidro, graduadas a cada 0,1 ml, com bicos de aço inoxidável, contendo água e NaCl 1,8%, respectivamente. Foram medidas as ingestões de água de NaCl 1,8% aos 15, 30, 60 e 120 minutos - teste do apetite ao sódio.

### **3.8. Parâmetros sanguíneos na privação hídrica – animais intactos – 24 e 36 horas**

Amostras de sangue troncular foram obtidas por decapitação em guilhotina de animais intactos em jejum de 12 horas, após 24 ou 36 horas de privação hídrica. Os respectivos controles tiveram livre acesso à água, mantidos os mesmos períodos de jejum.

Para determinação do hematócrito utilizou-se sangue total colhido em tubo capilar heparinizado e para as demais determinações de parâmetros sanguíneos, amostras de sangue foram colocadas em tubos com gel separador e obtido o soro por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.

### **3.9. Influência de lesão nos parâmetros sanguíneos – PH36hRP – animais com lesão fictícia e lesão bilateral do NCeA.**

Após privação hídrica de 36 horas foi retirada a ração e fornecida água por duas horas para os animais com lesão fictícia ou lesão bilateral do NCeA. Em seguida, os animais foram decapitados por guilhotina para obtenção do sangue troncular.

Para determinação do hematócrito utilizou-se sangue total colhido em tubo capilar heparinizado. Para determinação da atividade de renina plasmática foram utilizados tubos com EDTA, mantidos refrigerados e o plasma obtido à 4 °C, por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Para os demais parâmetros sanguíneos amostras de sangue foram colocadas em tubos com gel separador e o soro obtido por centrifugação a 2.500 rpm, por 10 minutos à temperatura ambiente.

### **3.10. Métodos utilizados nas determinações dos parâmetros sanguíneos**

#### **3.10.1. Hematócrito e proteínas séricas totais**

Método de determinação do microhematócrito (BAIN & BATES, 2001) utilizando tubo capilar heparinizado e centrífuga para microhematócrito.

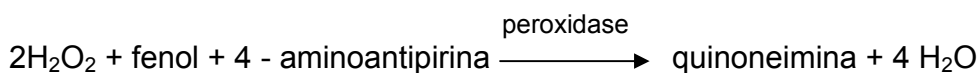
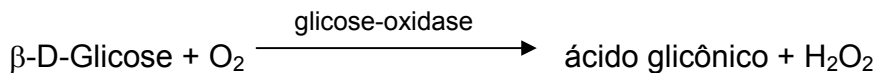
Método de determinação de proteínas por refratometria – índice de refração, utilizando-se refratômetro Atago.

Os valores de hematócrito e proteínas séricas foram utilizados como índice de volemia. Valores aumentados de hematócrito evidenciam a depleção de sódio e a presença de hipovolemia. As concentrações séricas de proteínas totais em ratos variam de 5,6 a 7,6 g / % (MITRUKA & RAMSLEY, 1977) e pode-se inferir o grau de hipovolemia dos animais com o aumento de proteínas séricas e do hematócrito.

### **3.10.2. Concentrações séricas de glicose**

Método da glicose-oxidase-peroxidase (TRINDER, 1969) - com reagentes da marca Labtest, automatizado em analisador RA XT - Technicon - Ames.

Reações:

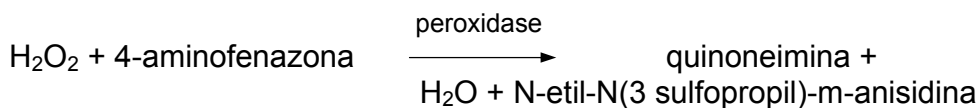
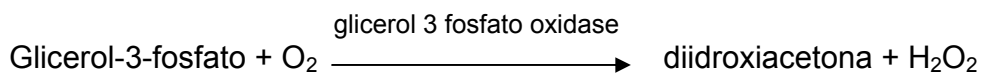
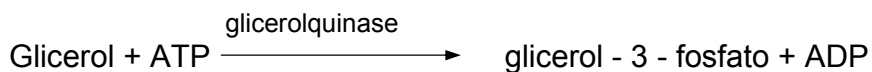
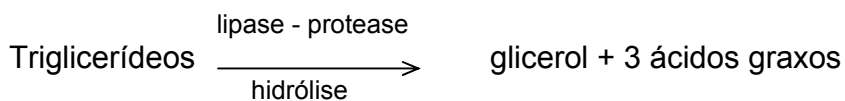


A glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glicônico e o peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose da amostra.

### 3.10.3. Concentrações séricas de triglicerídeos

Método de triglicerídeos "fast-color" (FOSSATI & PRENCIPE, 1982) - com reagentes da marca Sera Pak - Ames e automatizado em analisador RA XT Technicon - Ames.

Reações:

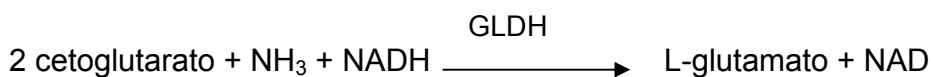
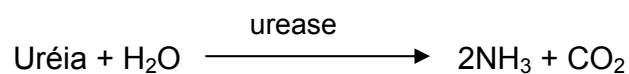


O glicerol liberado na hidrólise dos triglicerídeos pela lipase é convertido pela glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado pela glicerol-3-fosfato oxidase para fosfato dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. Pela reação de Trinder, na presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio oxida o cromógeno 4-aminofenazona / N-etil-N (3-sulfopropil)-m-anisidina a um composto de cor violeta, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de triglicerídeos da amostra.

#### **3.10.4. Concentrações séricas de uréia**

Método da urease-enzimático UV (BERGMEYER, 1985) com reagentes da marca Labtest automatizado em analisador RA-XT-Technicon – Ames.

Reações:



A uréia é hidrolisada pela urease, gerando amônio e dióxido de carbono. A amônia reage com o 2-cetogluturato e NADH em uma reação catalisadora pela glutamato desidrogenase, ocorrendo oxidação do NADH a

NAD. A conseqüente redução da absorvância, medida em UV (340 nm) é proporcional à concentração de uréia na amostra.

Elevações das concentrações séricas de uréia podem ocorrer por febre, septicemias, desidratação ou por defeitos na excreção renal, variando no rato entre 15 e 21 mg/dl (MITRUKA & RAMSLEY, 1977).

### **3.10.5. Concentrações séricas de sódio e potássio**

Método direto de eletrodos seletivos (MASS & KOFSTAD, 1984), baseado no princípio da potenciometria. Foi utilizado o analisador de eletrólitos ISE-AVL 9180 com eletrodo de sódio BP 0413 (140 mmol / l) e eletrodo de potássio BP 0359 (5 mmol / l), condicionando o eletrodo com o BP 0380 Electrode Conditioning Solution e o BP 1025 Cleaning Solution da AVL – Medical Instruments – Áustria.

### **3.10.6. Determinação da osmolalidade**

As determinações foram realizadas através da medida da diminuição do ponto de congelamento, em Osmômetro Digimatic Model 3D2 (Advanced Instruments) do Laboratório Experimental do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Antes das determinações da osmolalidade das amostras de soro, o osmômetro foi calibrado em 100 e 900 mOsm / kg com soluções padrões e

conferido com Accuref 290  $\pm$  mOsm como padrão de referência (Friske Associates, Norwood – Massachussetts – USA).

### **3.10.7. Atividade da renina plasmática**

A atividade da renina plasmática foi determinada pela quantidade de angiotensina I formada a partir de substrato, por método de radioimunoensaio, usando como traçador radioativo o Iodo<sup>125</sup> do kit RENIN-MAIA - Adaltis – Itália, realizado pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi, de São Carlos – SP, em animais com lesão fictícia e lesão bilateral do NCeA, privados de água por 36 horas e reidratados parcialmente.

### **3.10.8. Expressão da proteína c-Fos após PH36hRP - no momento de ingressar no teste do apetite ao sódio - influência de lesões do NCeA**

Em animais ambientados por pelo menos cinco dias com água, ração e NaCl 1,8% disponíveis, foram realizadas lesões fictícias (grupo fictício – F) e lesões bilaterais do NCeA (grupo lesado - L).

Após o período de uma semana da recuperação da cirurgia, os animais foram mantidos com ração, água e NaCl 1,8%. Os animais foram então submetidos à privação hídrica por 36 horas (retirada de água e NaCl 1,8% às 20h00 até 8h00 do dia do experimento). A ração foi removida ao final das 36 horas de privação hídrica e os animais do grupo lesão fictícia



(FPHRP) e lesado (LPHRP) tiveram acesso a apenas água por duas horas. Imediatamente após esse período de reidratação parcial, no momento de ingressar no teste do apetite ao sódio, foi iniciado o processo de imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos.

Durante as mesmas 36 horas em que os dois grupos de animais permaneceram sem água, dois outros grupos (hidratados) permaneceram com acesso livre à água e NaCl 1,8%: um grupo de animais com lesão fictícia (Fh) e outro grupo com lesão do NCEA (Lh). Ao final das 36 horas foi retirada a ração por duas horas nesses dois grupos e imediatamente após foi iniciado o processo de imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos.

#### **PROTOCOLO: Detecção imunohistoquímica da proteína c-Fos**

- 1) Os animais anestesiados com pentobarbital sódico (12 mg/100g i.p.) sofreram abertura do tórax, exposição do coração e pinçamento da aorta em posição dorsal próxima do diafragma.
- 2) Em seguida foi realizada perfusão transcardíaca com tampão fosfato salina 0,1M (PBS pH 7,4) por gravidade, com fluxo de 33 ml/minuto por 10 minutos (~300 ml) seguida da perfusão de paraformaldeído (PFA 4% em tampão fosfato PB 0,1M) por 10 minutos (~300 ml).
- 3) Os encéfalos foram então removidos, fixados por 6 horas em PFA 4% e estocados à 4 °C em uma solução de PB 0,1M com 30% de sacarose.

- 4) Os encéfalos pós-fixados foram cortados serialmente no plano coronal na espessura de 40  $\mu\text{m}$ , utilizando micrótomo de congelamento Leica SM 2000 R, no sentido rostro-caudal para regiões das estruturas prosencefálicas e no sentido caudo-rostral para estruturas pontinas, baseados no Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.

Uma outra série de cortes da região de estruturas do complexo amigdalóide, dos respectivos encéfalos, no momento dos cortes, foi montada em lâminas e coradas por Giemsa para análise histológica da localização de lesões bilaterais do NCeA.

- 5) Foram escolhidos os cortes contendo áreas prosencefálicas e pontinas e colocados em placas plásticas – 4 a 5 cortes por escavação da placa, com PBS 0,1 M.
- 6) Os cortes foram mantidos por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente (25 °C) em solução aquosa com 10% de metanol e 10% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para inibição da peroxidase endógena.
- 7) Lavagem dos cortes com PBS 0,1 M por três vezes (5 minutos cada).
- 8) Transporte dos cortes para solução contendo 4% de soro bloqueador (normal goat serum – S 1000 da Vector Laboratories) em PBS 0,1M e 0,3% de Triton X-100 (Aldrich) onde foi colocado o anticorpo primário (anti c-Fos H 125 – SC 7202 – Santa Cruz Biotechnology) na proporção de 1:4000, permanecendo sob agitação em temperatura ambiente por 22 horas.

- 9) Lavagem dos cortes com PBS 0,1 M por três vezes (5 minutos cada).
- 10) Transporte dos cortes para solução contendo 4% de soro bloqueador (normal goat serum – S1000 da Vector Laboratories) em PBS 0,1M e 0,3% de Triton X-100 (Aldrich) onde foi colocado o anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories) na proporção 1:400; permanecendo sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora.
- 11) Lavagem dos cortes com PBS 0,1 M por três vezes (5 minutos cada).
- 12) Transporte dos cortes para solução avidina-biotina peroxidase – HRP Vectastain – Elite ABC Kit – Vector Laboratories em PBS na proporção 1:200, permanecendo sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora.
- 13) Lavagem dos cortes com PBS 0,1 M por três vezes (5 minutos cada).
- 14) A revelação da peroxidase foi detectada por meio da reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v (H1009 – Sigma) 0,04% e DAB-3,3' Diaminobenzidine (D5637 – Sigma) 0,02% em PBS por 10 minutos.  
  
Nesta incubação a enzima peroxidase reage com a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (substrato) e DAB (receptor de hidrogênios) ocorrendo uma reação de oxidação que forma um composto insolúvel, corado de cor acobreada que se depositará, marcando a localização do anticorpo primário e revelando células positivas para proteína transcrita do gene c-Fos.
- 15) Após a última lavagem (PBS 0,1M) os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados para secar em temperatura ambiente por 24 horas. Depois foram desidratados em baterias de álcool etílico,

clareados com xilol e recobertos por lamínulas fixadas com Permount (SP 15-500 – Fisher Scientific) para as análises da expressão c-Fos.

### **3.11. HISTOLOGIA**

Logo após o teste de apetite ao sódio, seguido de privação hídrica e reidratação parcial com água por 2 horas (modelo PH24hRP) ou após os testes sucessivos de apetite ao sódio (modelo PH36hRP), os animais dos grupos fictícios ou grupos com lesões eletrolíticas do NCeA foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/100 g i.p.). Foi aberto o tórax por incisão abaixo do diafragma para exposição do coração, pinçamento da aorta em posição dorsal próxima do diafragma e os encéfalos foram perfundidos através de injeção de 20 ml de formalina 10% direto no ventrículo esquerdo.

Os encéfalos foram retirados, mantidos em solução de formalina com 20% de sacarose (pós-fixação), seccionados em micrótomo de congelamento Leica CM 1800, em cortes de 60 µm de espessura, colocados em lâminas gelatinizadas e corados com Giemsa. Os cortes foram analisados por microscopia em campo claro para localização das lesões no NCeA. Os dados foram considerados dos grupos lesão unilateral do NCeA e lesão bilateral do NCeA de acordo com a localização e semelhanças de extensão de lesão baseada em PAXINOS & WATSON, 1986.

Nos protocolos experimentais de privação hídrica por 36 horas, foi considerado como grupo bilateral controle um grupo de animais que apresentou lesões bilaterais localizadas em outras estruturas, que não englobam os núcleos do complexo amigdalóide, na análise histológica.

No grupo de animais com lesão bilateral do NCeA, utilizado para avaliação de parâmetros sanguíneos, após a decapitação, os encéfalos foram removidos sem perfusão, pós-fixados em formalina com 20% de sacarose, seccionados e corados para análise histológica e aproveitamento de dados das lesões bilaterais do NCeA consideradas positivas. Neste grupo a falta de perfusão prejudicou a obtenção de cortes histológicos de boa qualidade para análise.

No grupo lesão bilateral do NCeA submetido ao protocolo de privação hídrica (PH36hRP) ou normohidratados (h), ao serem cortados os encéfalos, para detecção imunohistoquímica da proteína c-Fos, alguns cortes de áreas do complexo amigdalóide foram colocados em lâminas gelatinizadas no momento da confecção, para análise histológica e verificação da localização e extensão da lesão do NCeA, concomitante aos cortes que foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas

### **3.12. Seleção de cortes imunohistoquímicos para confecção de fotografias microscópicas para contagens de célula c-Fos positivas**

As lâminas contendo cortes do encéfalo de diferentes grupos de ratos (n = 6) com lesão fictícia normohidratados (Fh), lesão bilateral do NCeA normohidratados (Lh), lesão fictícia submetidos a privação hídrica por 36 horas e reidratados parcialmente (FPHRP) e lesão bilateral do NCeA submetidos a privação hídrica por 36 horas e reidratados parcialmente (LPHRP), após o protocolo imunohistoquímico para detecção da proteína c-Fos, foram fotografadas (aumento de 10 x) em câmera Olympus DP10, acoplada ao microscópio Olympus BX 50 para as contagens de células c-Fos positivas (marcação de cor acobreada).

Para maior uniformidade da localização das áreas, para as contagens de células c-Fos positivas dos diferentes cortes, utilizou-se como parâmetros figuras do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986. Foram tomadas, como referência, as seguintes posições demarcadas nas figuras para confecção das fotografias das áreas prosencefálicas e pontinas:

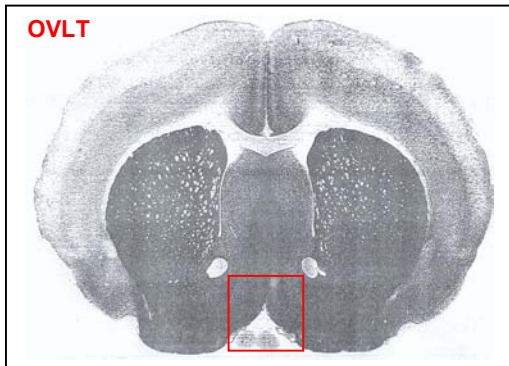


FIGURA A: Órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT). Posição: bregma 0,20 mm – início da aproximação da fusão da comissura anterior. Baseada na figura 17 do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.

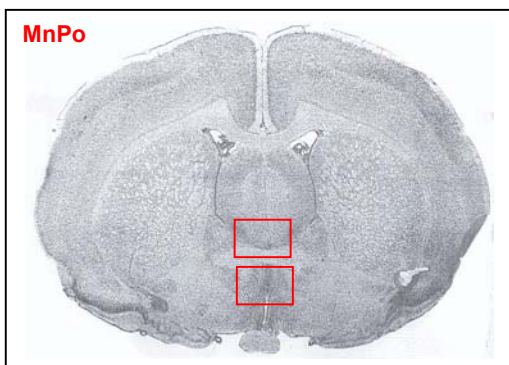


FIGURA B: Núcleo pré-óptico mediano (MnPO). Posição: bregma -0,26 mm – fusão completa da comissura anterior – dorsal (MnPOd) superior à comissura e ventral (MnPOv) inferior com relação à comissura. Baseada na figura 18 do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.



FIGURA C: Órgão subfornicial (SFO). Posição: bregma - 0,92 mm. Baseada na figura 22 do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.

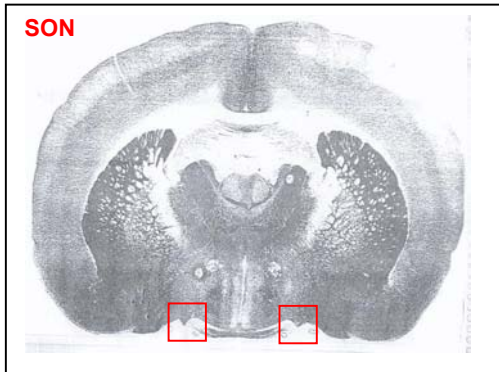


FIGURA D: Núcleo supra-óptico (SON). Posição: bregma  $-1,40$  mm – parte externa ao trato óptico, bilateral fotografados como direito e esquerdo e contados separadamente e somados. Baseada na figura 24 do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.

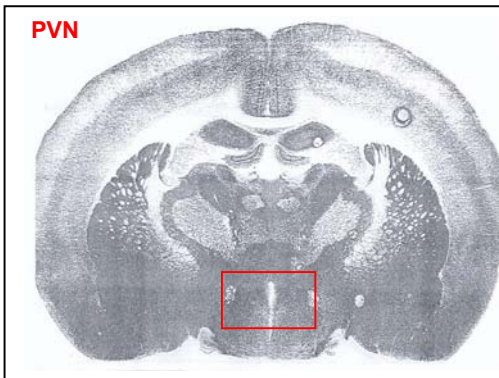


FIGURA E: Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Posição: bregma  $-1,80$  mm, bilateral ao 3º ventrículo – porção parvocelular (PVNp) e porção magnocelular (PVNm) – contados dos lados direito e esquerdo separadamente e somados. Baseada na figura 24 do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.

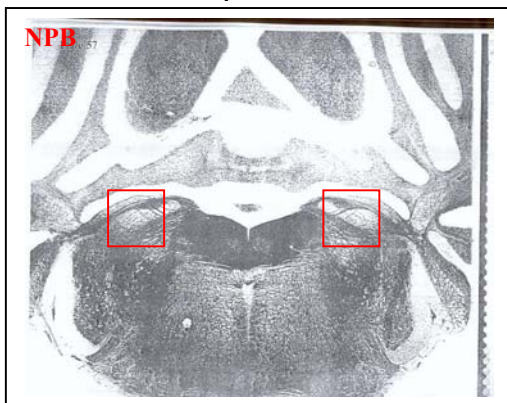


FIGURA F: . Núcleo parabraquial (NPB). Posição: bregma  $-9,80$  mm – lateral (NPBL) superior ao braquia e medial (NPBM), inferior ao braquia – fotografados dos lados direito e esquerdo, contados separadamente e somados. Baseada na figura 57 do Atlas de PAXINOS & WATSON, 1986.



### **3.13. Análises estatísticas**

Resultados individuais, de cada animal submetido aos protocolos experimentais, foram colocados em planilhas e foi utilizado o programa de computador Excel para se calcular a média e o erro padrão da média. Os dados obtidos nos diferentes protocolos foram analisados utilizando-se o programa Sigma Stat. A análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores, com medidas repetidas ou não repetidas dependendo do protocolo experimental, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para a comparação entre os grupos, períodos pré e pós-cirurgias e tratamentos. Diferenças significativas foram consideradas para  $p < 0,05$ , com grupos de, no mínimo, seis animais.

As figuras demonstradas nos resultados foram confeccionadas utilizando-se o programa Sigma-Plot.

A expressão c-Fos nas áreas de interesse foram fotografadas (aumento 10x) e para as contagens das células c-Fos positivas foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.1.0.0, expressos em áreas contadas em  $\mu\text{m}^2$  e os resultados convertidos e expressos em número de células positivas /  $10^{-2} \text{mm}^2$ .

As contagens foram realizadas em duplicata, de cada uma das áreas, e os dados considerados como a média de duas contagens de cada imagem. As áreas bilaterais foram contadas individualmente e apresentadas como somatória dos lados direito e esquerdo.

Os resultados apresentam-se com média  $\pm$  erro padrão da média /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. A significância considerada foi de  $p < 0,05$  na análise entre os grupos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Histologia

Os grupos de animais com lesões eletrolíticas do núcleo central da amígdala (NCeA), após a análise histológica dos cortes preparados em lâminas, foram agrupados em lesão unilateral e bilateral do NCeA.

As análises histológicas foram baseadas no Atlas de Paxinos & Watson, 1986, para a localização das lesões no NCeA, verificação de simetria lateral nas lesões bilaterais e extensão semelhante para o aproveitamento de dados. A extensão da lesão foi avaliada tomando-se como referência as posições rostro-caudais do NCeA, baseadas nas posições: -2,12mm, -2,56 mm e -2,80 mm caudal ao bregma. Os diagramas com demarcações das lesões eletrolíticas estão representados na Figura 1A.

O NCeA foi completamente destruído, tanto na lesão eletrolítica unilateral como na lesão bilateral. Em dois animais do grupo lesão bilateral, as lesões atingiram uma pequena porção do globus pallidus unilateralmente e em outros dois, o núcleo ventrolateral da amígdala foi parcialmente danificado. Fotomicrografias de cortes histológicos das lesões eletrolíticas consideradas como típicas estão demonstradas na Figura 1B.

Os animais com lesões fictícias foram também analisados histologicamente, para confirmação da integridade dos núcleos da amígdala.

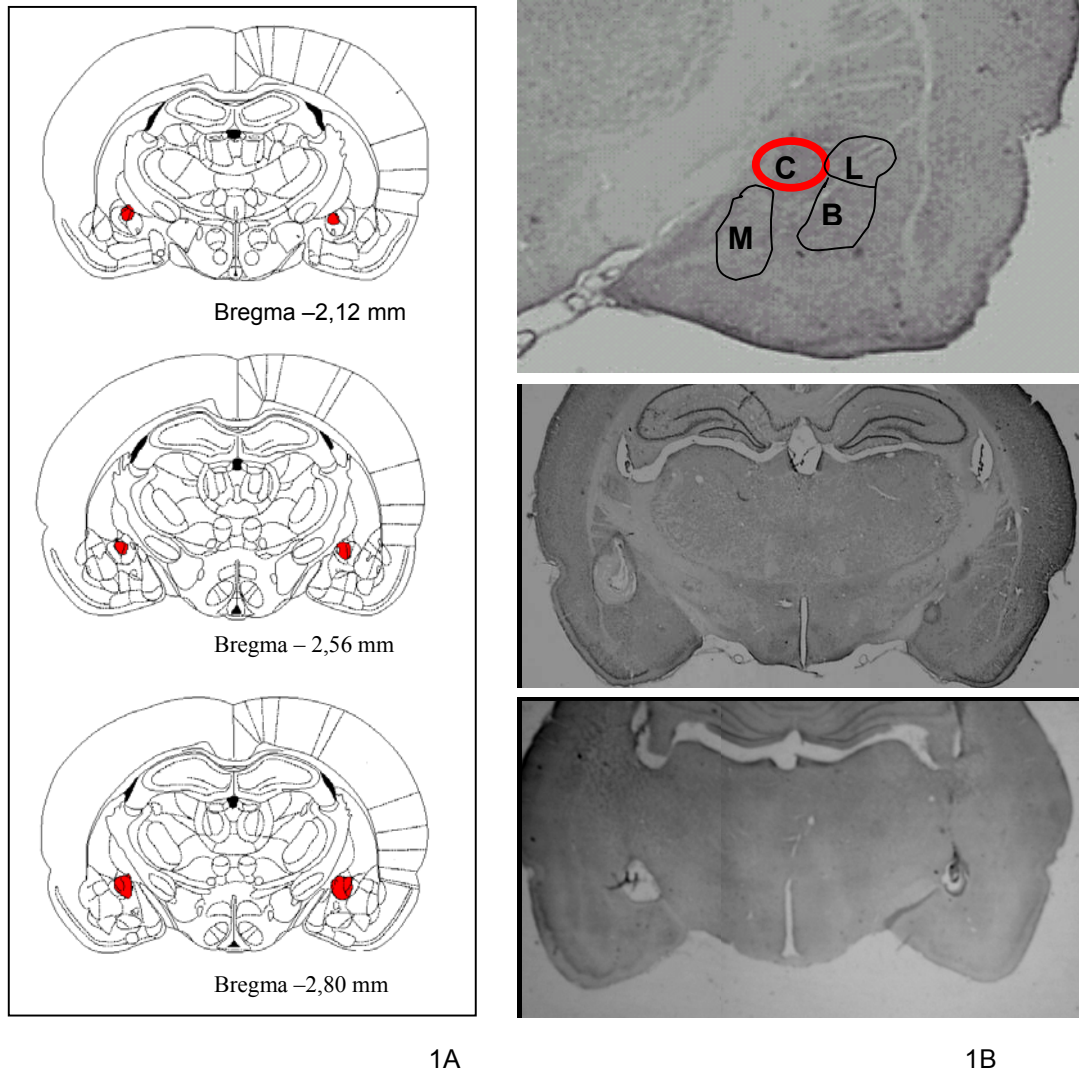


FIGURA 1A – Representação de diagramas retirados do Atlas de Paxinos & Watson (1986), com demarcação de extensão de lesão bilateral do NCeA de um rato, baseado na posição antero-posterior ao bregma.

FIGURA 1B – Fotomicrografias de cortes histológicos corados por Giemsa. Acima: animal com lesão fictícia com delimitações do complexo amigdalóide (C = núcleo central; L = núcleo lateral; BL = núcleo basolateral e M = núcleo medial). Meio: típica lesão unilateral do NCeA. Embaixo: lesão representativa típica de um animal do grupo lesão bilateral do NCeA.

#### **4.2. Modelo privação hídrica de 24 horas e reidratação parcial com água por 2 horas – PH24hRP**

##### **Grupos analisados:**

- **intactos:** animais não submetidos aos procedimentos cirúrgicos.
- **lesão fictícia:** animais submetidos às cirurgias, sem as lesões eletrolíticas.
- **lesão unilateral do NCeA:** animais submetidos às lesões eletrolíticas do núcleo central da amígdala – unilateral.
- **lesão bilateral do NCeA:** animais submetidos às lesões eletrolíticas do núcleo central da amígdala – bilateral

##### **4.2.1. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de NaCl 1,8%**

Comparando-se os mesmos grupos nos períodos pré e pós-lesões, não foram observadas alterações na ingestão diária de sódio em ratos com lesão fictícia.

A lesão eletrolítica unilateral do NCeA reduziu 42% a ingestão diária de NaCl 1,8% (de  $11,4 \pm 3,2$  ml pré-lesão para  $6,4 \pm 2$  ml pós-lesão,  $p < 0,05$ ). A lesão bilateral do NCeA reduziu 64% a ingestão diária de NaCl 1,8% (de  $8,6 \pm 2,2$  ml pré-lesão para  $2,8 \pm 0,9$  ml pós-lesão,  $p < 0,05$ ). Figura 2.

#### ***4.2.2. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de água***

A lesão fictícia do NCeA não alterou a ingestão diária de água. Tanto a lesão unilateral quanto a lesão bilateral do NCeA reduziram transitoriamente a ingestão diária de água, restaurada dois dias após as lesões. Figura 3.

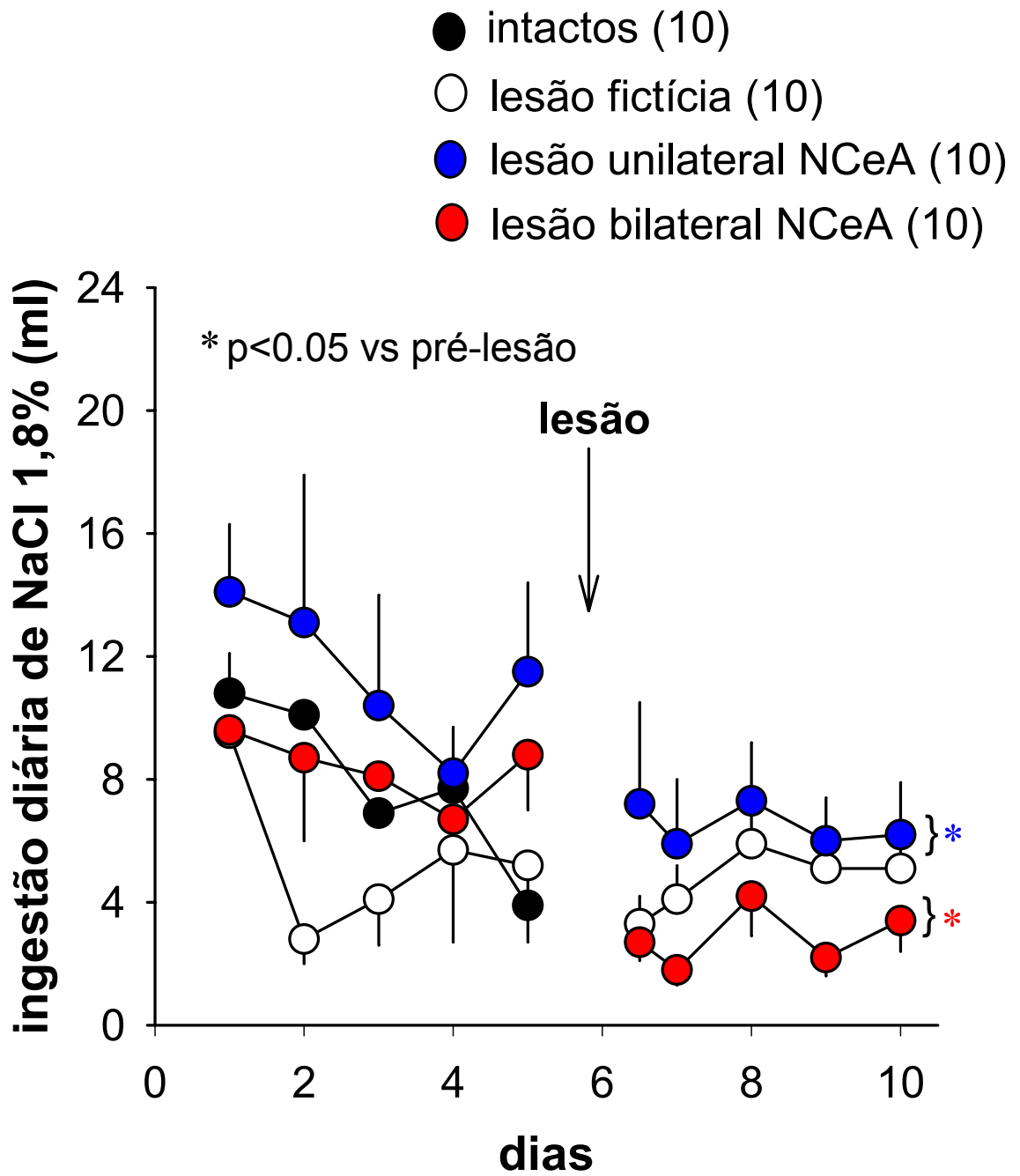


Figura 2

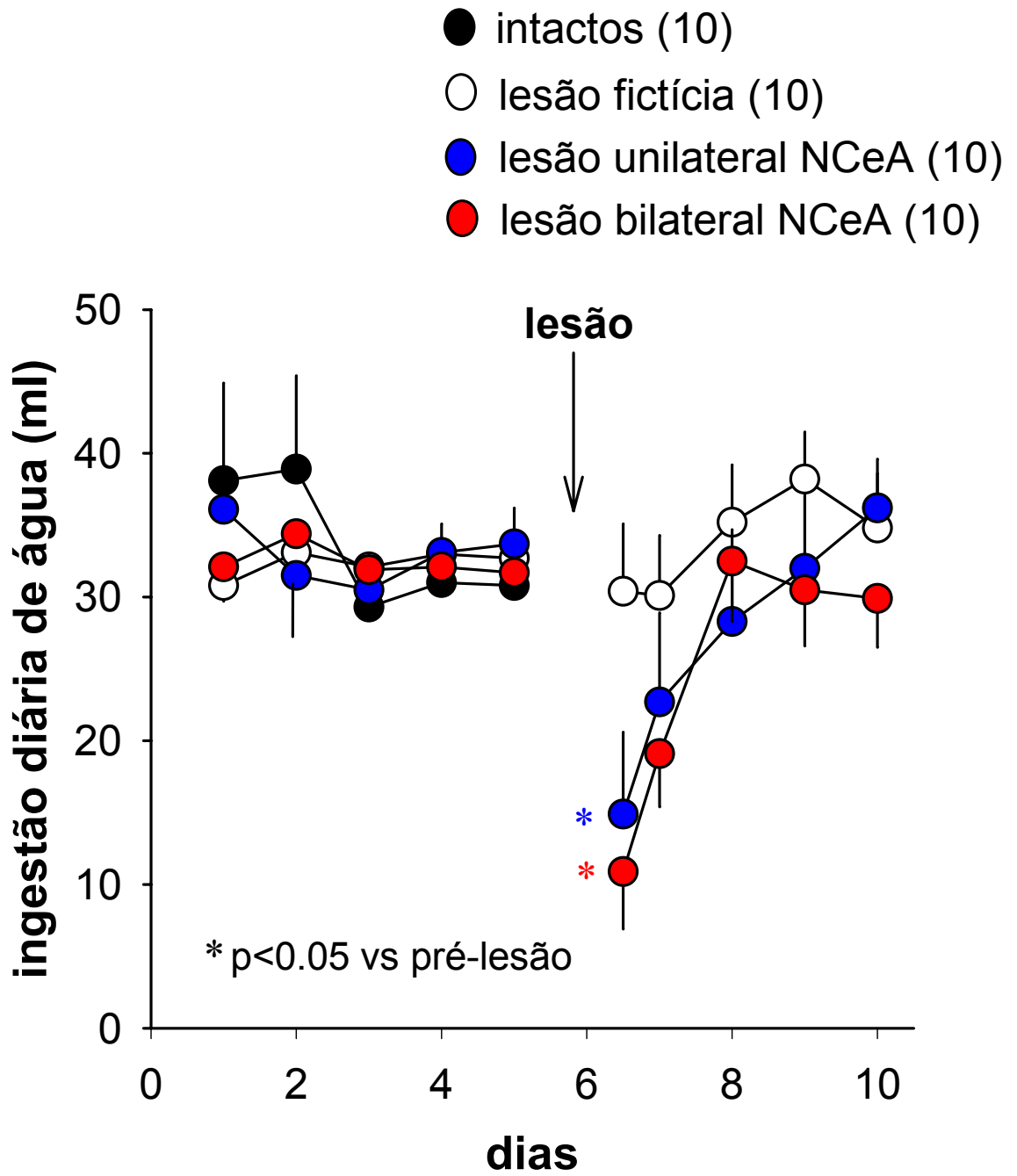


Figura 3



### **4.2.3. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA no modelo PH24hRP**

- **Reidratação após privação hídrica de 24 horas**

Os grupos intactos, lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA e lesão bilateral do NCeA beberam volumes similares de água no período de reidratação parcial, oferecimento de água nas 2 horas precedentes ao teste do apetite de sódio. Figura 4.

- **Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão de NaCl 1,8% e água durante o teste do apetite ao sódio após PH24hRP**

Não foram observadas alterações nas ingestões cumulativa de NaCl 1,8% ou cumulativa de água medidas aos 15, 30, 60 ou 120 minutos (teste do apetite ao sódio) em ratos dos grupos intactos, lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA e lesão bilateral do NCeA. Figuras 5 e 6.

## reidratação após privação hídrica de 24 horas

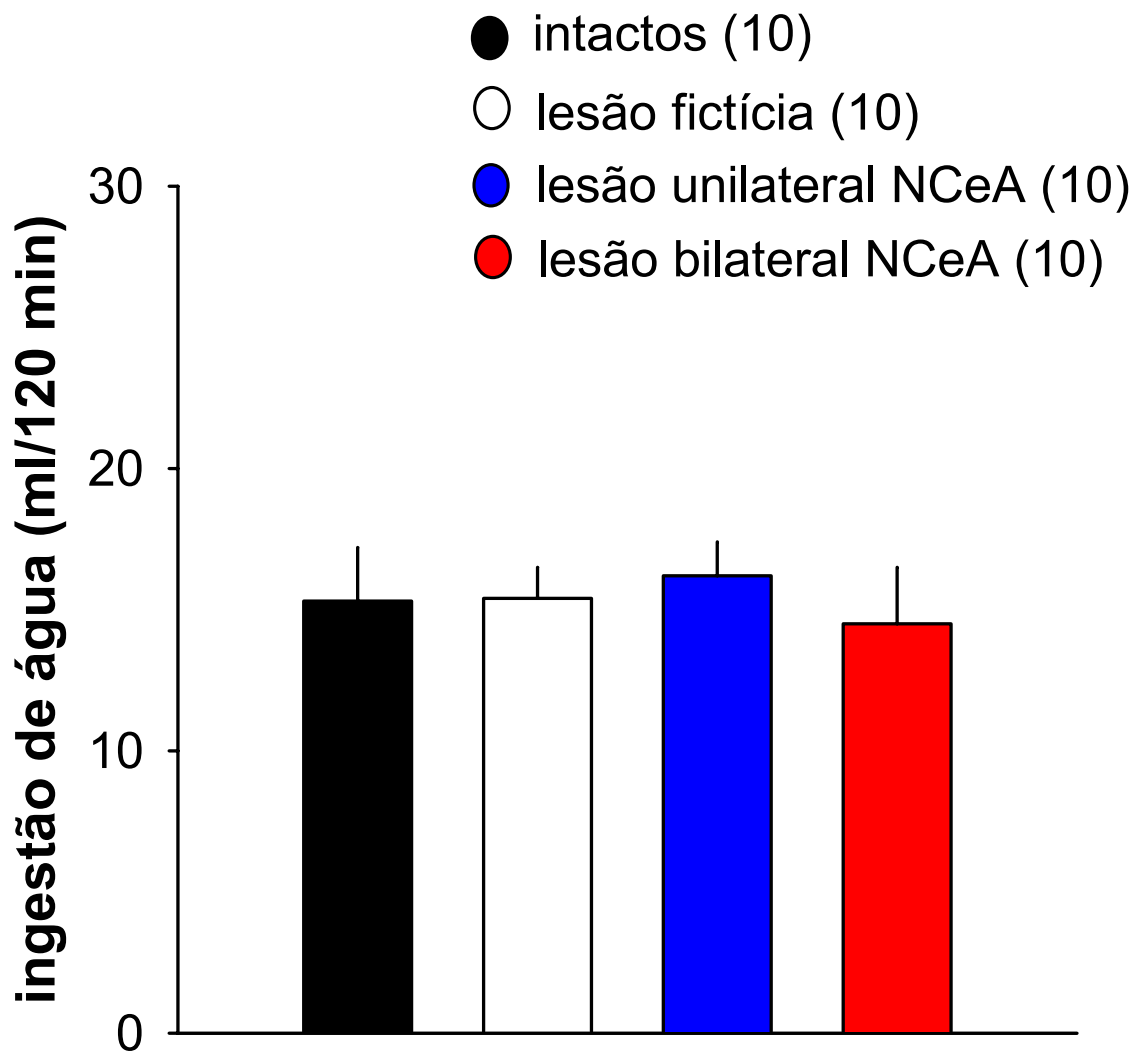


Figura 4

**teste do apetite ao sódio após  
24 horas de privação hídrica -  
reidratação parcial**

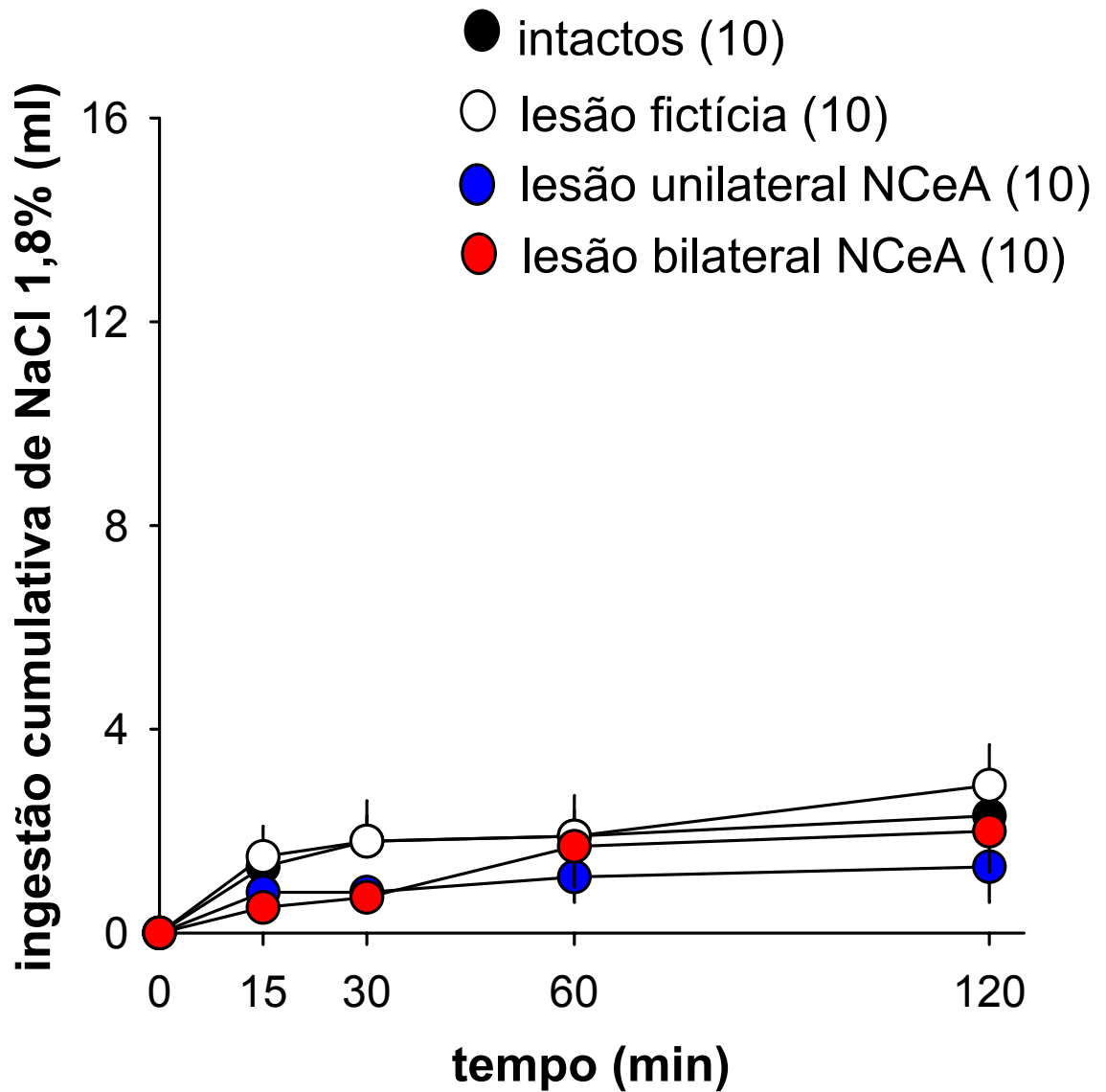


Figura 5

**teste do apetite ao sódio após  
24 horas de privação hídrica -  
reidratação parcial**

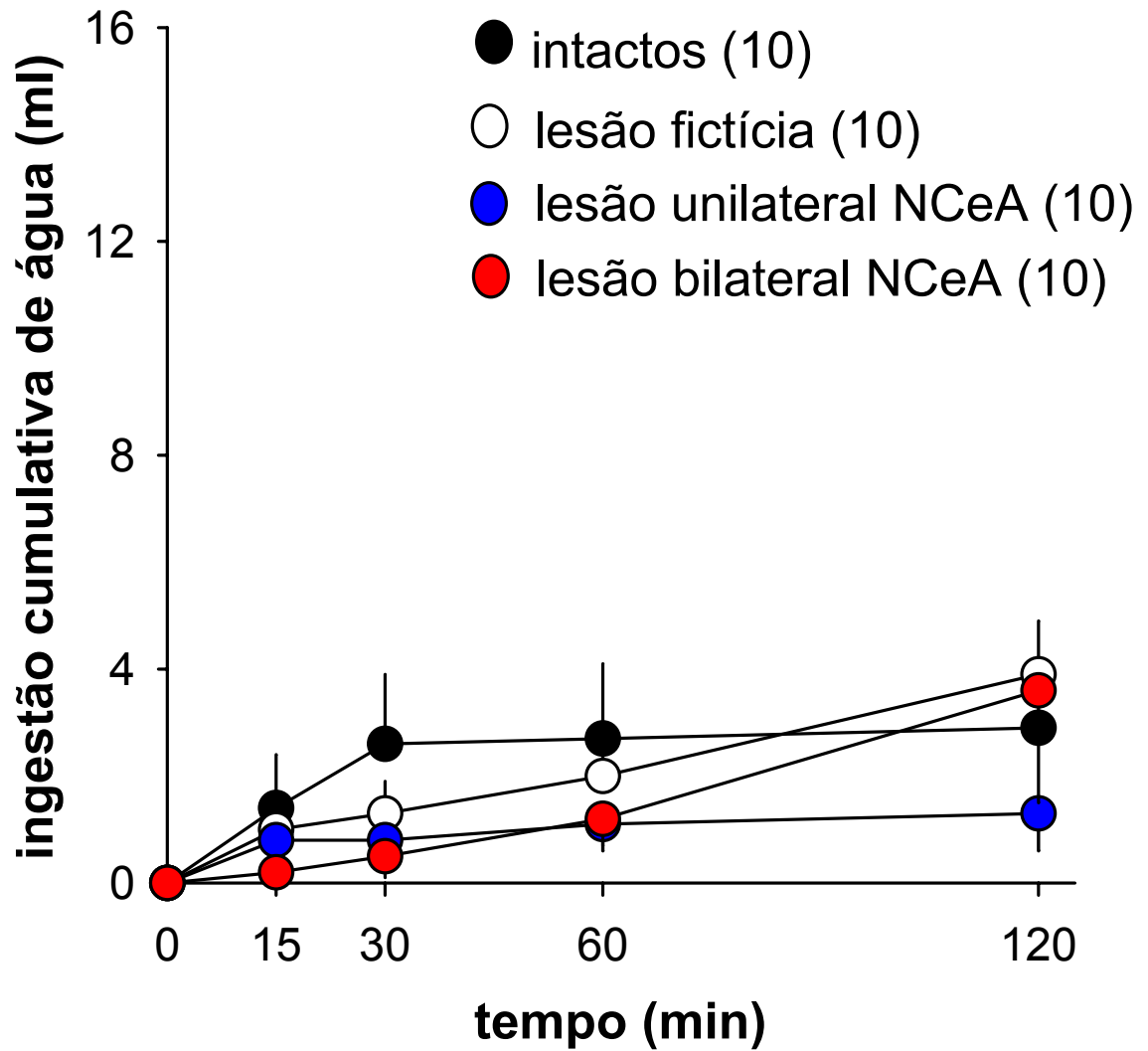


Figura 6

**4.2.4. Comparação do comportamento de ingestão de NaCl 1,8% e água no teste do apetite ao sódio. Efeito do tempo de privação hídrica – Animais intactos**

Foram utilizados ratos intactos submetidos ao modelo PH24hRP e PH36hRP para a comparação de ingestão de NaCl 1,8% e água nos testes do apetite ao sódio.

No período de reidratação parcial (120 minutos), ratos intactos submetidos à privação hídrica de 36 horas mostraram um aumento de 53% na ingestão de água ( $24,8 \pm 0,8$  ml,  $p < 0,05$ ) quando comparados com ratos intactos submetidos à privação hídrica de 24 horas ( $15,3 \pm 1,4$  ml). Figura 7.

No teste do apetite ao sódio, a ingestão cumulativa de NaCl 1,8%, medida aos 60 minutos, quadruplicou em ratos submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial ( $8,3 \pm 1,7$  ml / h,  $p < 0,05$ ) comparado ao grupo privado por 24 horas e reidratado parcialmente ( $1,9 \pm 0,5$  ml / h). O grande aumento na ingestão cumulativa de NaCl 1,8%, medida aos 120 minutos, persistiu no grupo privado por 36 horas ( $10,1 \pm 1,8$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ) comparado ao grupo privado de água por 24 horas ( $2,2 \pm 0,4$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ). Figura 8.

A ingestão cumulativa de água, medida aos 15, 30 e 60 minutos no teste do apetite ao sódio, mostrou-se semelhante em ratos intactos submetidos às privações hídricas de 24 ou 36 horas.

Ratos submetidos à privação hídrica de 36 horas triplicaram a ingestão de água aos 120 minutos ( $10,1 \pm 1,8$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ) comparados aos ratos submetidos à privação hídrica de 24 horas ( $2,9 \pm 1,4$  ml / 2 h).  
Figura 9.

Os resultados demonstram que o período de 36 horas é o mais efetivo para avaliação do comportamento de ingestão de NaCl 1,8% no modelo PHRP.

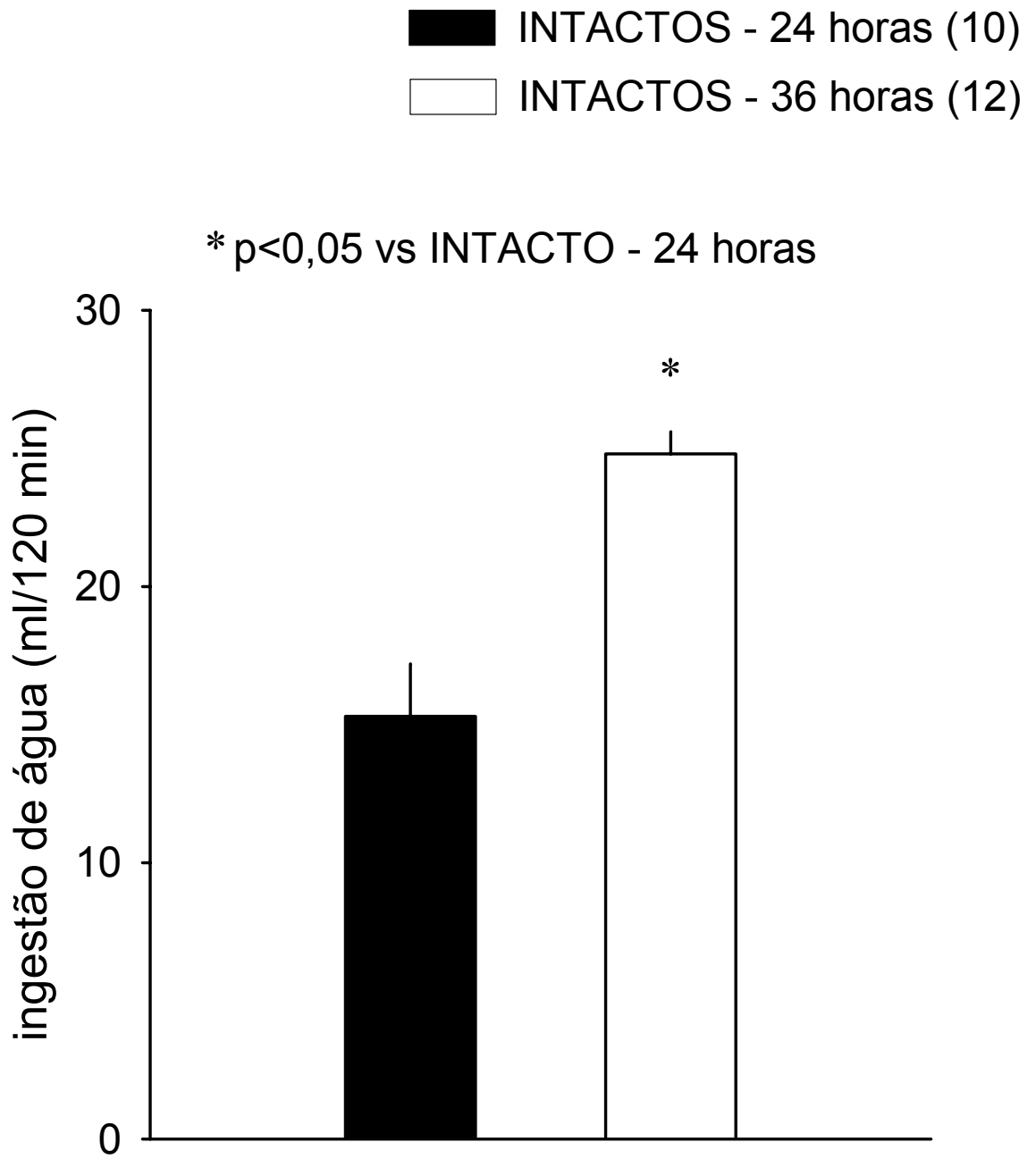


Figura 7

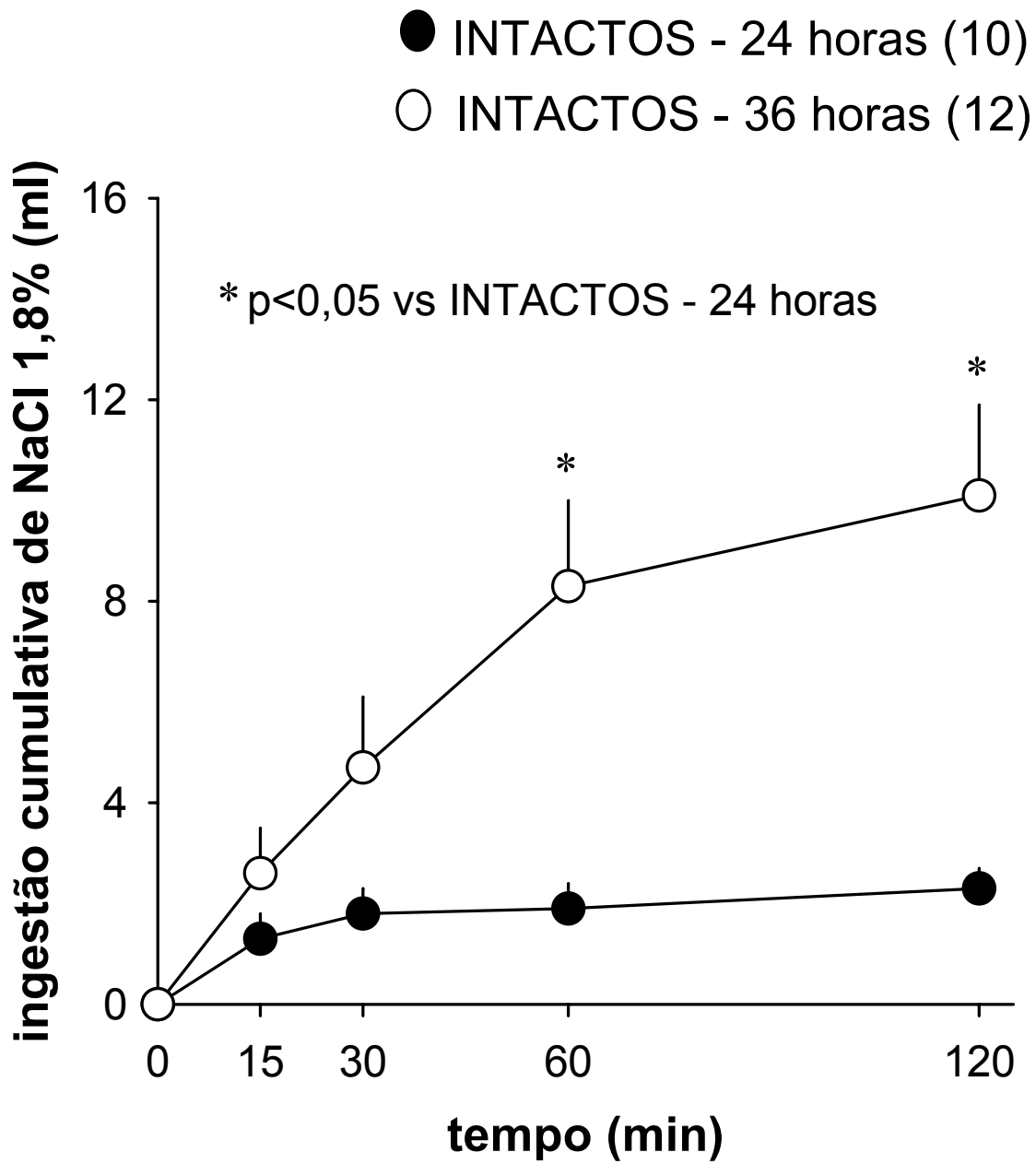


Figura 8



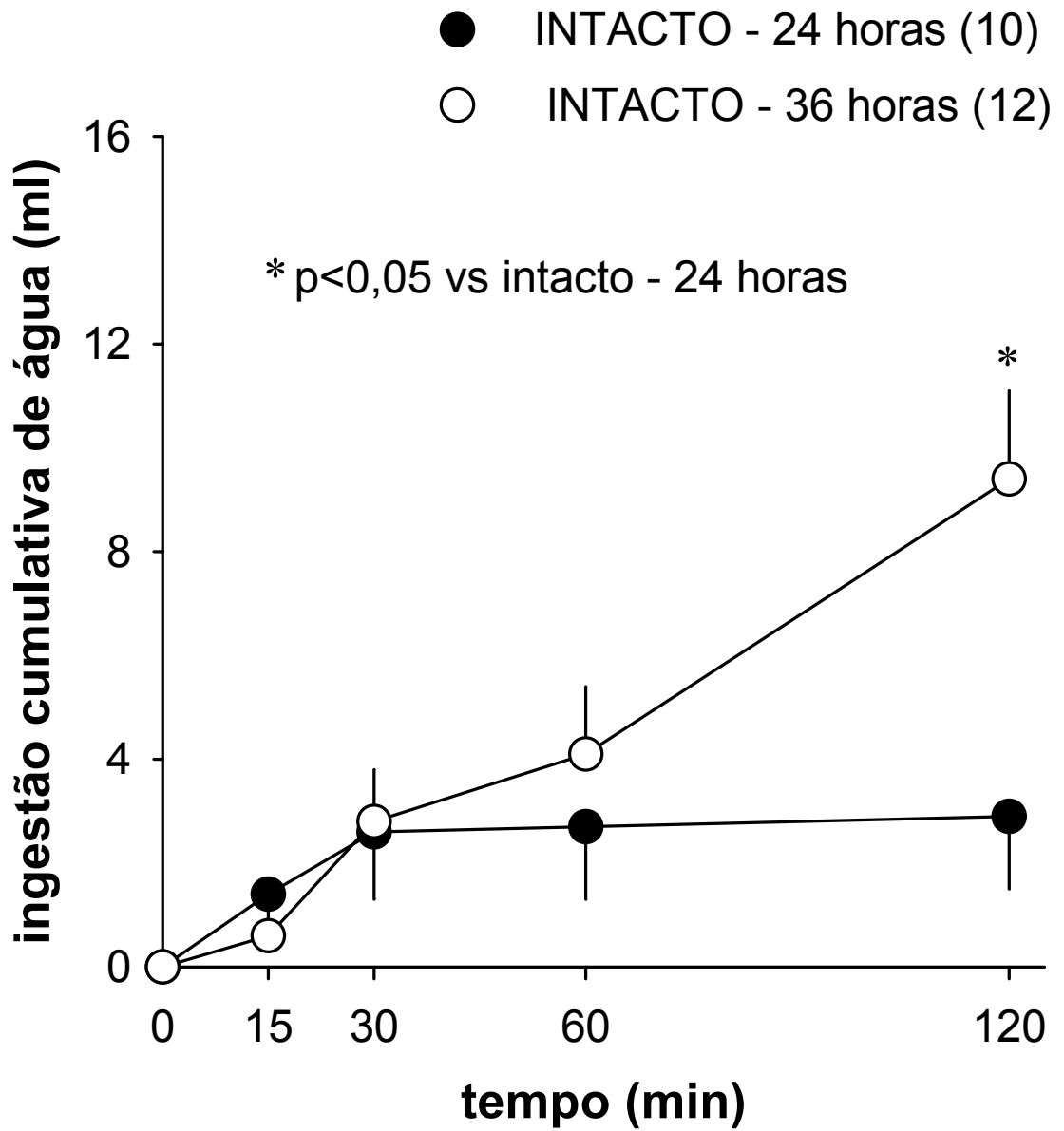


Figura 9

### **4.3. Efeito da lesão do NCeA no modelo PH36hRP**

#### **Grupos analisados:**

- **intactos:** animais não submetidos aos procedimentos cirúrgicos.
- **lesão fictícia:** animais submetidos às cirurgias, sem as lesões eletrolíticas.
- **lesão unilateral do NCeA:** animais submetidos às lesões eletrolíticas do núcleo central da amígdala – unilateral.
- **lesão bilateral do NCeA:** animais submetidos às lesões eletrolíticas do núcleo central da amígdala – bilateral
- **lesão bilateral controle:** animais submetidos à lesões eletrolíticas localizadas em estruturas que não englobam os núcleos da amígdala.

#### **4.3.1. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de NaCl 1,8%**

Comparando-se os mesmos grupos nos períodos pré e pós-lesões, não foram observadas diferenças na ingestão diária de NaCl 1,8% em ratos com lesão fictícia.

A lesão unilateral do NCeA reduziu 40% a ingestão diária de NaCl 1,8% (de  $8,2 \pm 1,0$  ml pré-lesão para  $4,0 \pm 1,6$  ml pós-lesão,  $p < 0,05$ ). A lesão bilateral do NCeA reduziu 60% a ingestão diária de NaCl 1,8% (de  $7,8 \pm 1,8$  ml pré-lesão para  $3,0 \pm 0,7$  ml pós-lesão,  $p < 0,05$ ). Figura 10.

#### **4.3.2. Efeitos de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão diária de água**

A lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA e lesão controle bilateral não alteraram a ingestão diária de água nos períodos pré e pós-lesões. O grupo lesão bilateral do NCeA apresentou redução transitória na ingestão diária de água, restaurada dois dias pós-lesão. Figura 11.

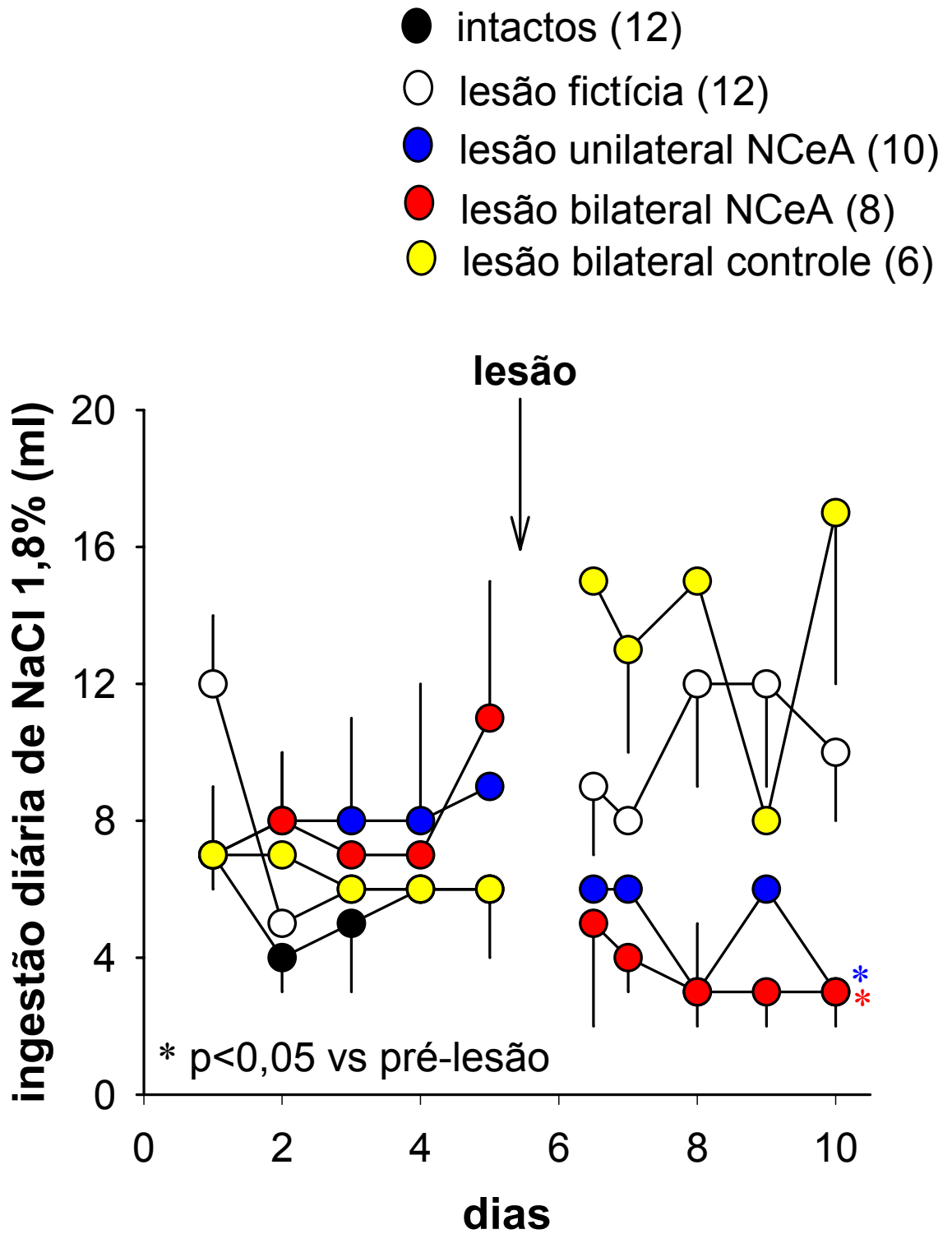


Figura 10

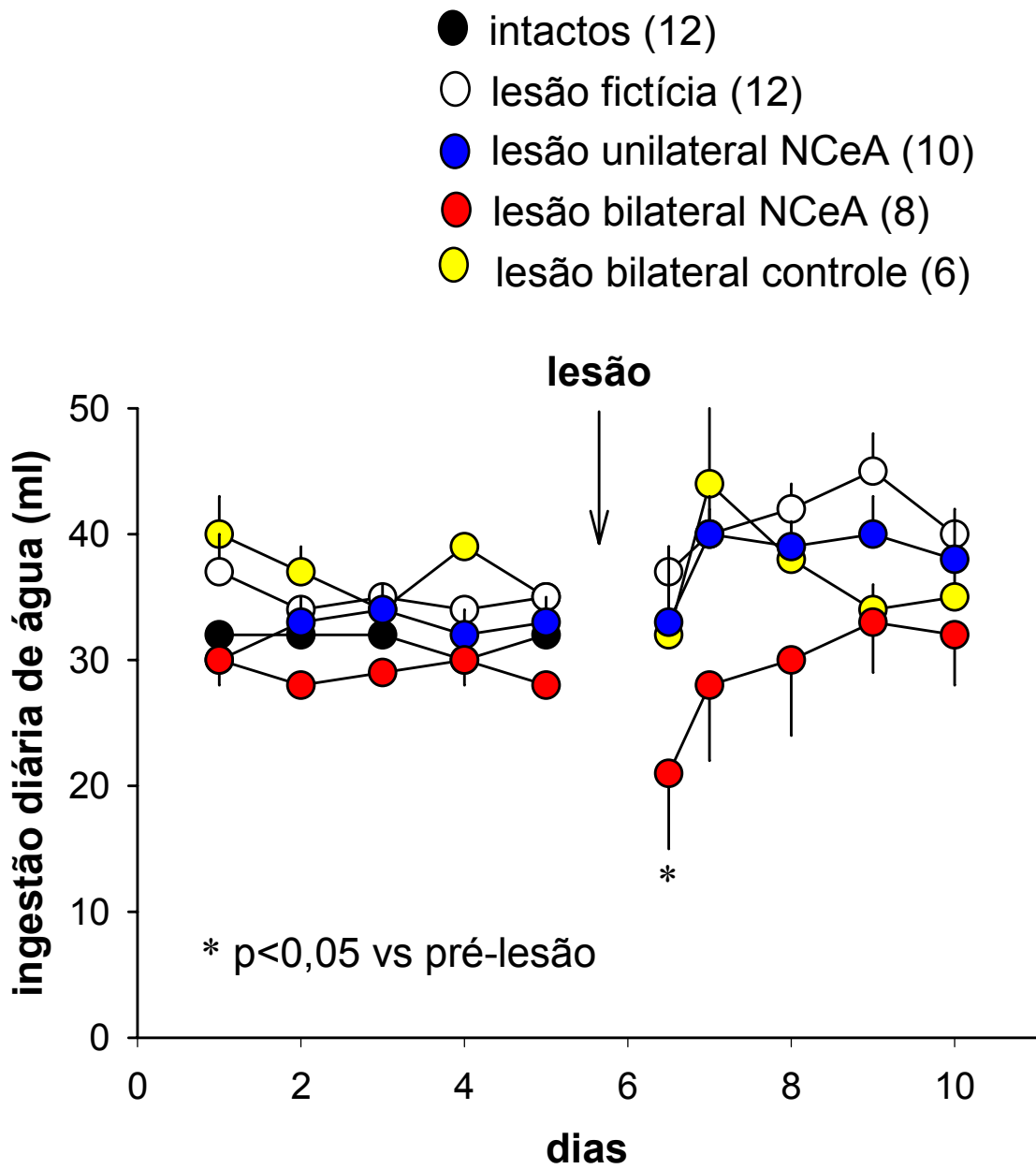


Figura 11

#### **4.3.3. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na primeira privação hídrica de 36 horas – modelo PH36hRP**

- **Reidratação após primeira privação hídrica de 36 horas**

Os grupos intactos, lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA, lesão bilateral do NCeA e lesão bilateral controle beberam volumes similares de água no período de reidratação parcial por 2 horas. Figura 12.

- **Efeitos de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão cumulativa de NaCl 1,8% e água durante o teste de apetite ao sódio após a primeira privação hídrica de 36 horas**

A lesão unilateral do NCeA reduziu 33% a ingestão de NaCl 1,8% ( $5,2 \pm 1,8$  ml / h,  $p < 0,05$ ) e a lesão bilateral do NCeA reduziu 51% a ingestão de NaCl 1,8% ( $3,4 \pm 1,7$  ml / h,  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo lesão fictícia ( $8,9 \pm 1,6$  ml / h) no teste do apetite ao sódio, após a primeira privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial. Figura 13.

No grupo bilateral controle a ingestão cumulativa de NaCl 1,8% ( $9,6 \pm 2,8$  / 2 h) foi semelhante ao grupo com lesão fictícia ( $9,7 \pm 1,5$  ml / 2 h) no teste do apetite ao sódio, após a primeira privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial. Figura 13.

A ingestão cumulativa de água no teste do apetite ao sódio, após a primeira privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial, não foi diferente quando comparados os grupos lesão unilateral ou lesão bilateral do NCeA com o grupo lesão fictícia aos 15, 30, 60 e 120 minutos.

O grupo lesão bilateral controle reduziu pela metade a ingestão cumulativa de água ( $1,8 \pm 1,0$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ) comparado ao grupo lesão bilateral do NCeA ( $4,0 \pm 1,0$  ml / 2 h) no teste do apetite ao sódio após a primeira privação hídrica de 36 horas. Figura 14.

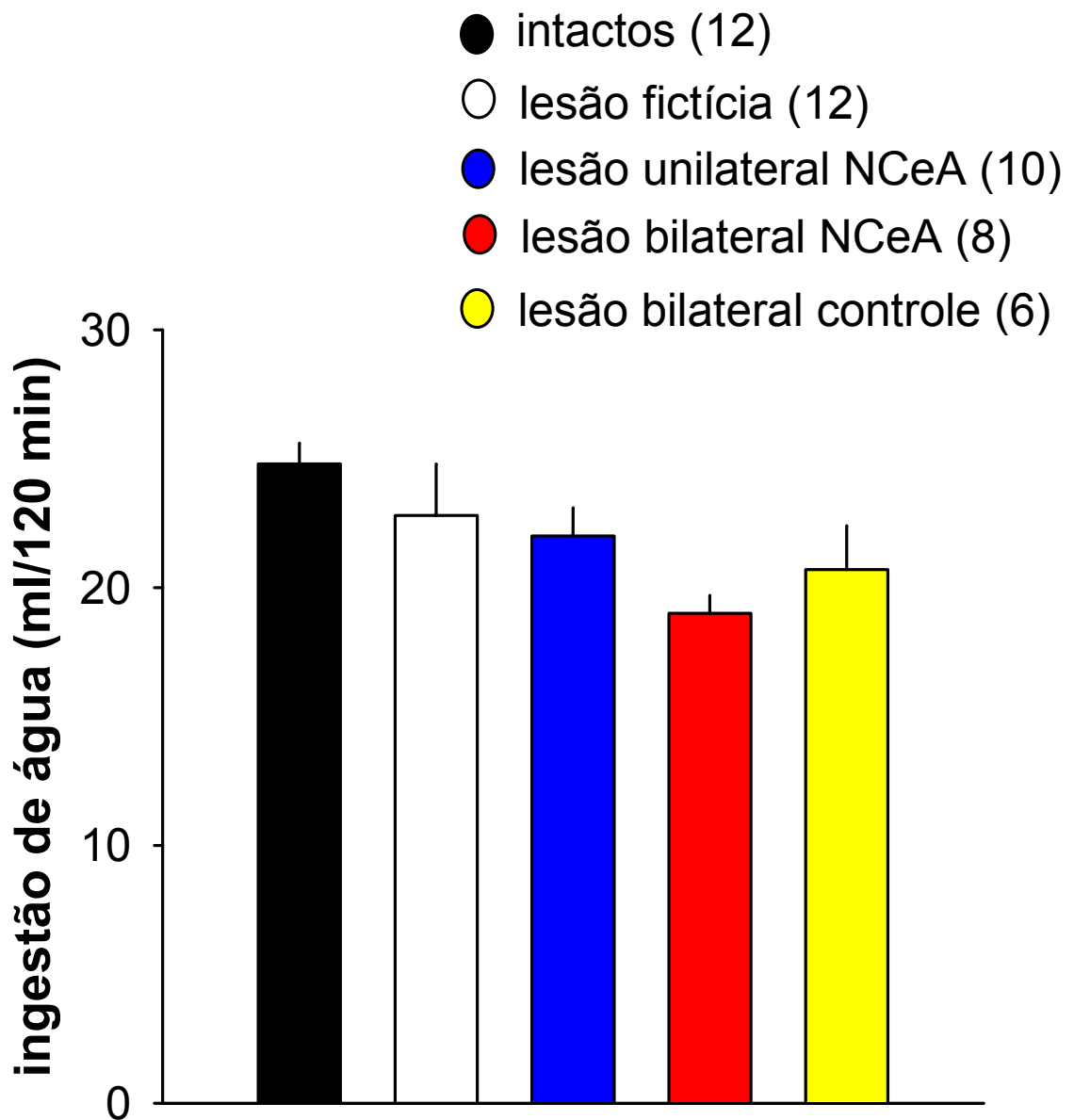
**reidratação após 1ª privação hídrica de 36 horas**

Figura 12



### 1º teste do apetite ao sódio após 36 horas de privação hídrica - reidratação parcial

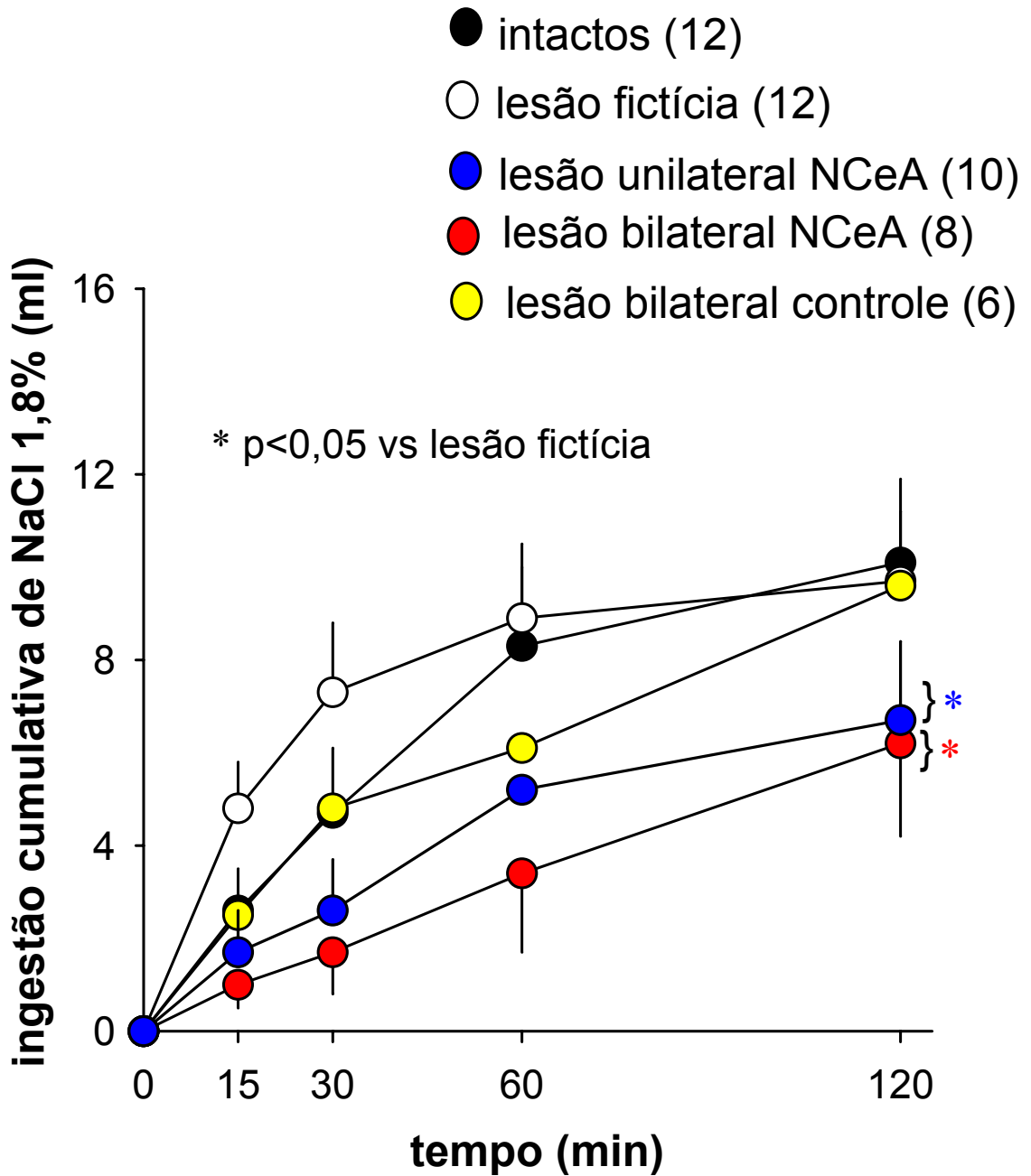


Figura 13

### 1º teste do apetite ao sódio após 36 horas de privação hídrica - reidratação parcial

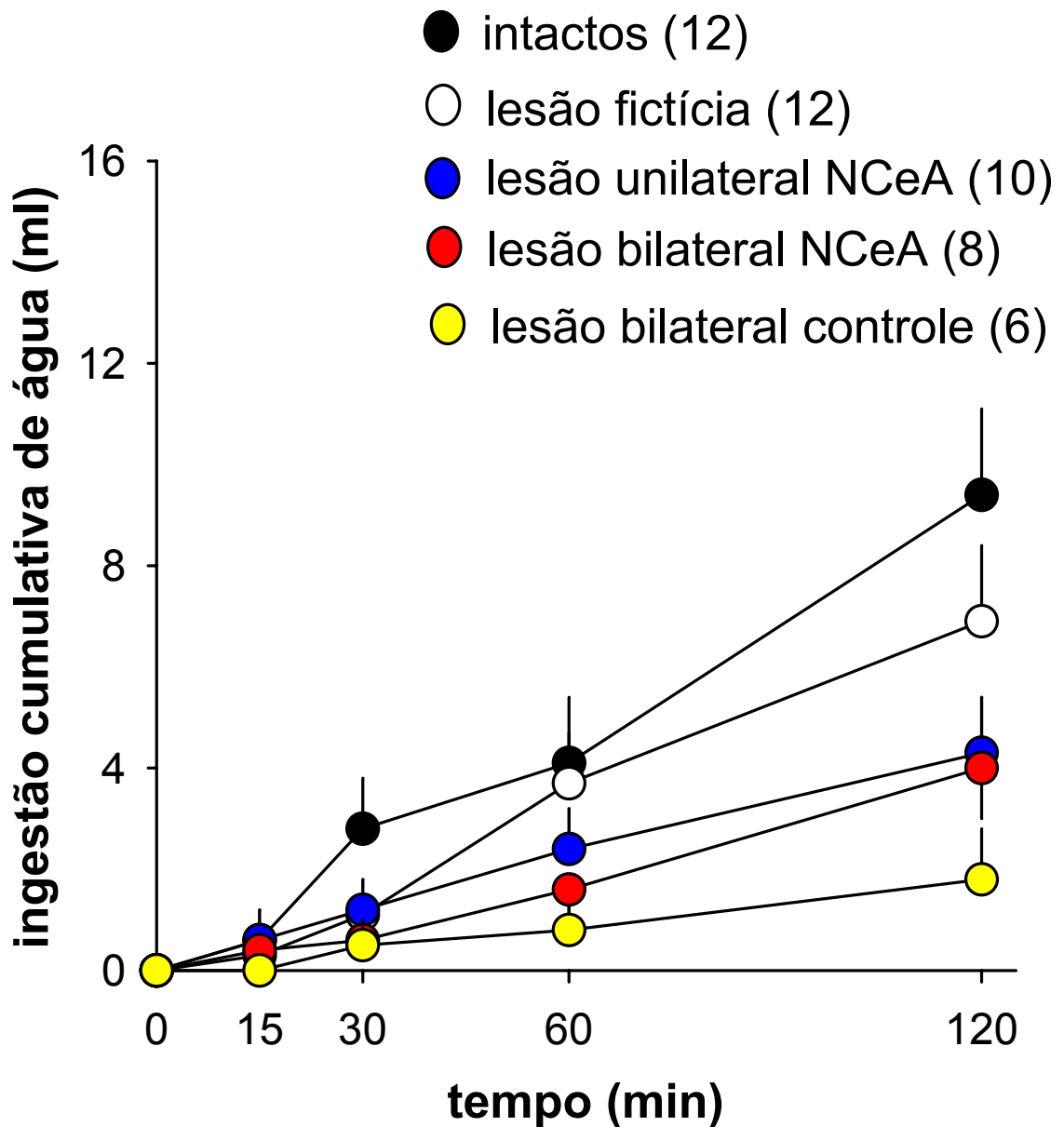


Figura 14

#### **4.3.4. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na segunda privação hídrica de 36 horas – modelo PH36hRP**

- **Reidratação após a segunda privação hídrica de 36 horas**

A lesão bilateral do NCeA reduziu 25% a quantidade de água ingerida no período de reidratação parcial por 2 horas ( $20,4 \pm 0,6$  ml,  $p < 0,05$ ) comparado ao grupo lesão fictícia ( $27 \pm 1,2$  ml) na segunda privação hídrica de 36 horas. Figura 15.

- **Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão cumulativa de NaCl 1,8% e água durante o teste do apetite ao sódio após a segunda privação hídrica de 36 horas**

A lesão bilateral do NCeA reduziu 44% a ingestão de NaCl 1,8% ( $6,0 \pm 2,1$  ml / 2 h) quando comparado ao grupo lesão fictícia ( $13,4 \pm 1,3$  ml / 2 h) e reduziu 41% a ingestão de NaCl 1,8% quando comparada ao grupo lesão unilateral do NCeA ( $10,8 \pm 3,1$  ml / 2 h) na segunda privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial. Figura 16.

A lesão bilateral do NCeA reduziu a ingestão de água ( $2,7 \pm 0,9$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ) comparado ao grupo lesão fictícia ( $10 \pm 1,4$  ml / 2h) e reduziu a ingestão de água comparado ao grupo lesão unilateral do NCeA ( $7,6 \pm 1,9$  ml / 2 h), proporcional à redução da ingestão de NaCl 1,8% e acompanhada

pelo grupo lesão bilateral controle no teste do apetite ao sódio após segunda privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial. Figura 17.

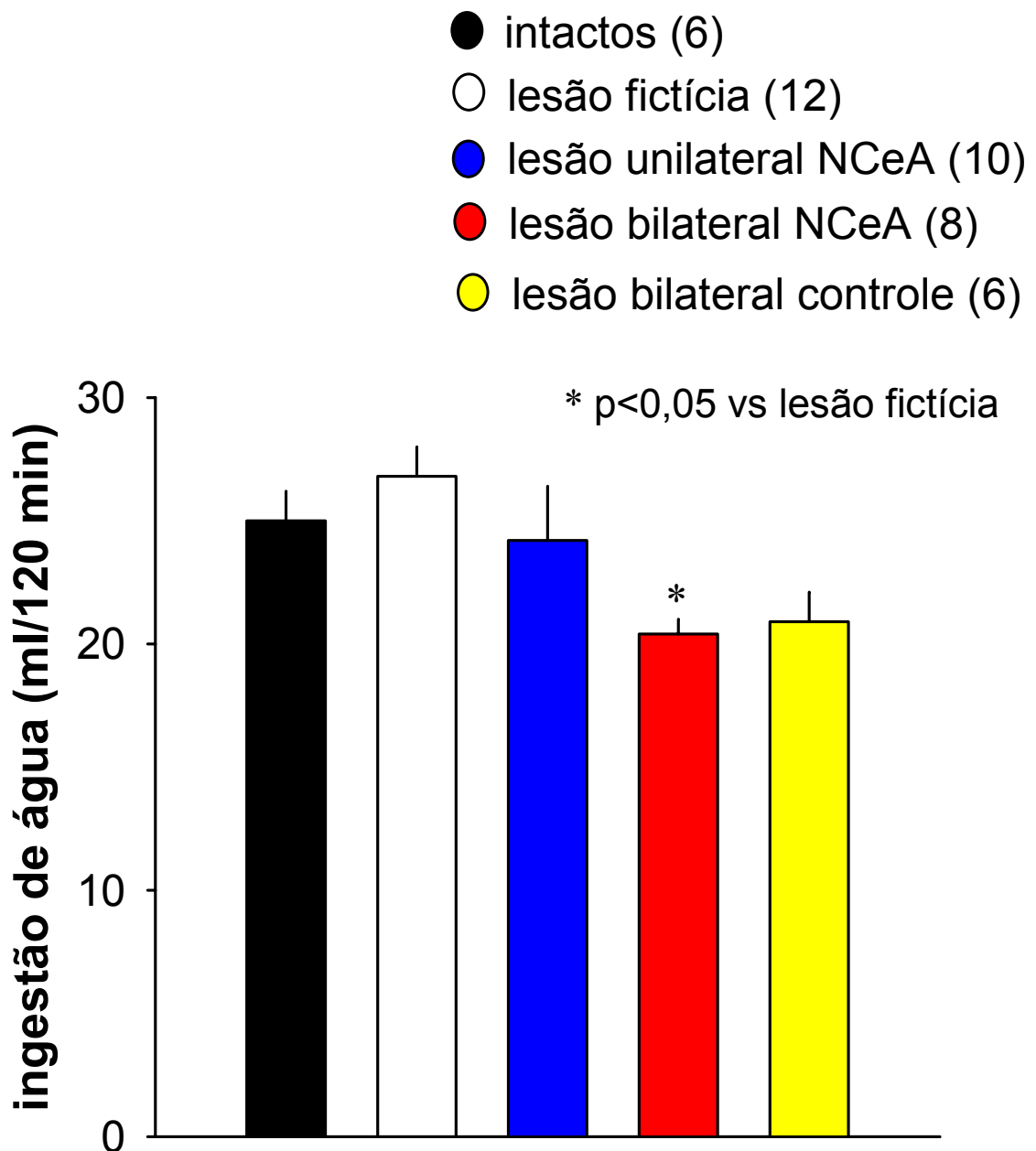
**reidratação após 2ª privação hídrica de 36 horas**

Figura 15

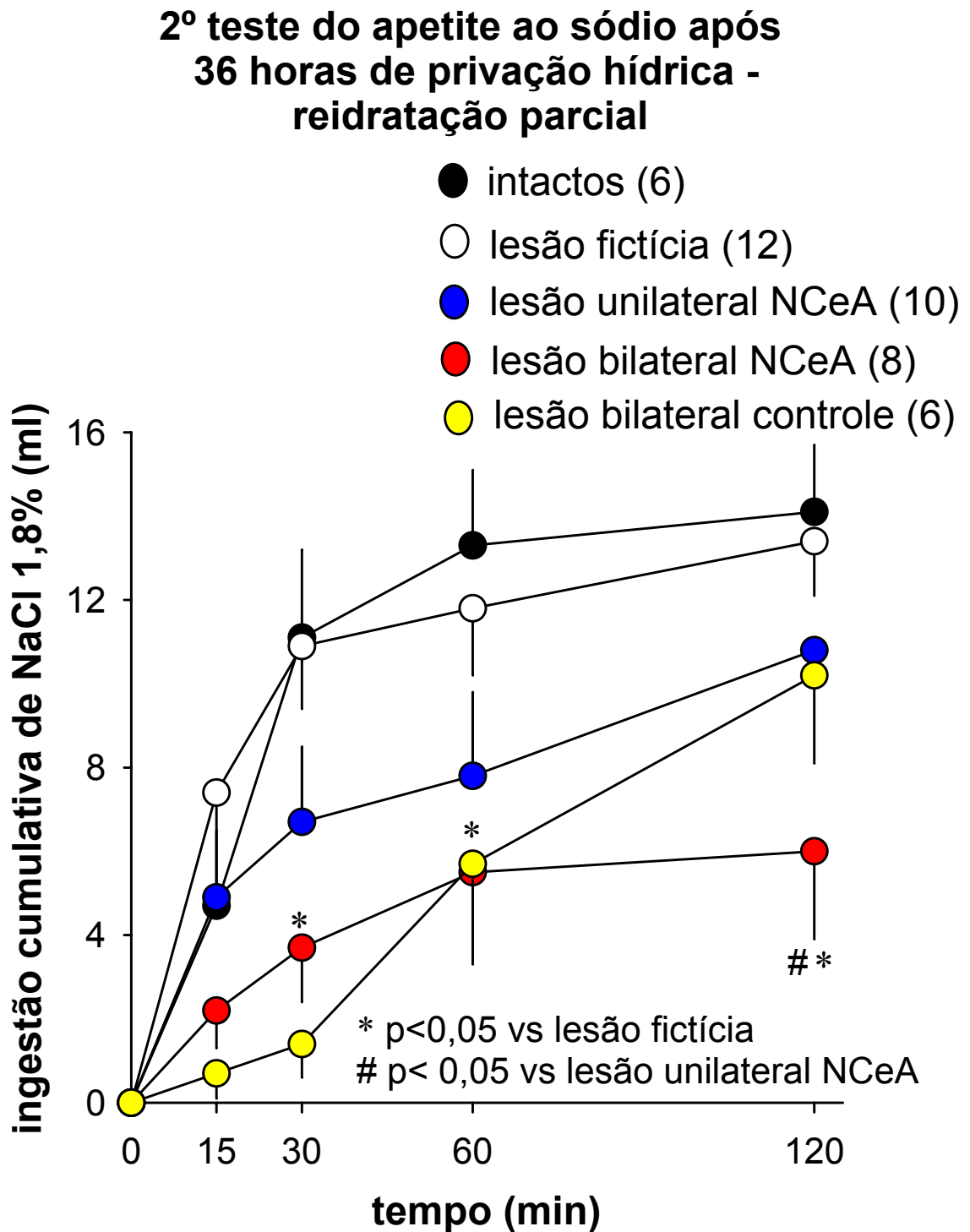


Figura 16

## 2º teste do apetite ao sódio após 36 horas de privação hídrica - reidratação parcial

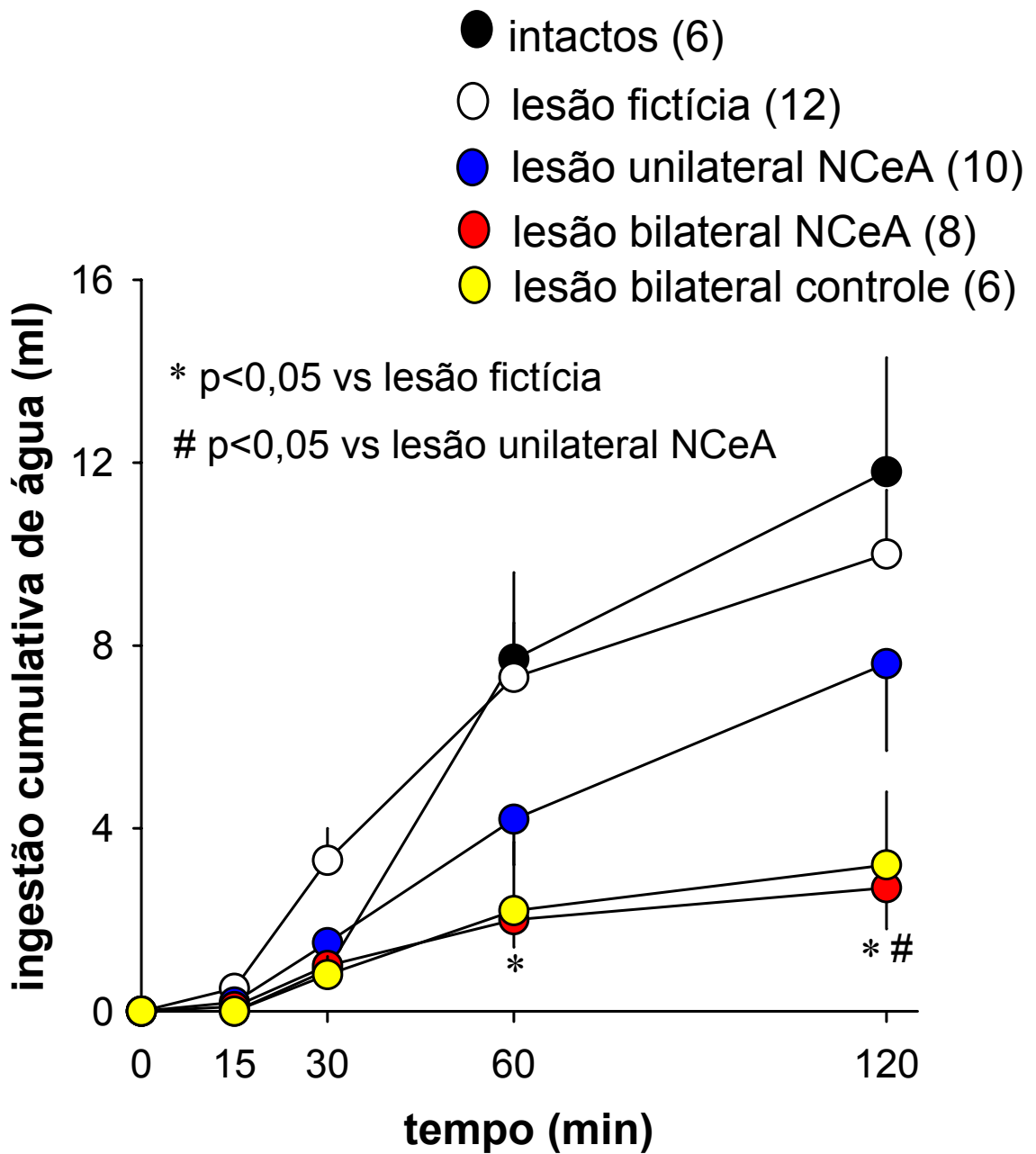


Figura 17

#### **4.4. Modelo depleção de sódio induzida por furosemida**

##### **4.4.1. Teste do apetite ao sódio após 24 horas de depleção de sódio**

Para comprovar os efeitos da lesão do NCeA no comportamento ingestivo de água e sódio, nos mesmos animais do grupo lesão fictícia, lesão unilateral e lesão bilateral do NCeA e lesão bilateral controle, que foram submetidos às duas privações de 36 horas e respectivos testes de apetite ao sódio, foi induzida a depleção de sódio por furosemida, que elicia o comportamento ingestivo de sódio e água e aplicado o teste de apetite ao sódio.

##### **4.4.2. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA na ingestão de NaCl 1,8% e água no teste do apetite ao sódio após 24 horas da depleção de sódio**

A lesão bilateral do NCeA reduziu em torno de 25% a ingestão de NaCl 1,8% ( $13,3 \pm 1,5$  ml / h,  $p < 0,05$ ) comparado com o grupo lesão fictícia ( $17,9 \pm 1,2$  ml / h) no teste do apetite ao sódio após 24 horas de depleção de sódio induzida por furosemida. Figura 18.

Tanto a lesão unilateral do NCeA ( $1,0 \pm 0,4$  ml / h,  $p < 0,05$ ), quanto a lesão bilateral do NCeA ( $1,2 \pm 0,5$  ml / h,  $p < 0,05$ ) reduziram pela metade a ingestão de água comparados ao grupo lesão fictícia ( $3,3 \pm 1$  ml/h)



no teste do apetite ao sódio após 24 horas de depleção de sódio induzida por furosemida. Figura 19.

**teste do apetite ao sódio  
após 24 h de depleção de sódio  
induzida por furosemida**

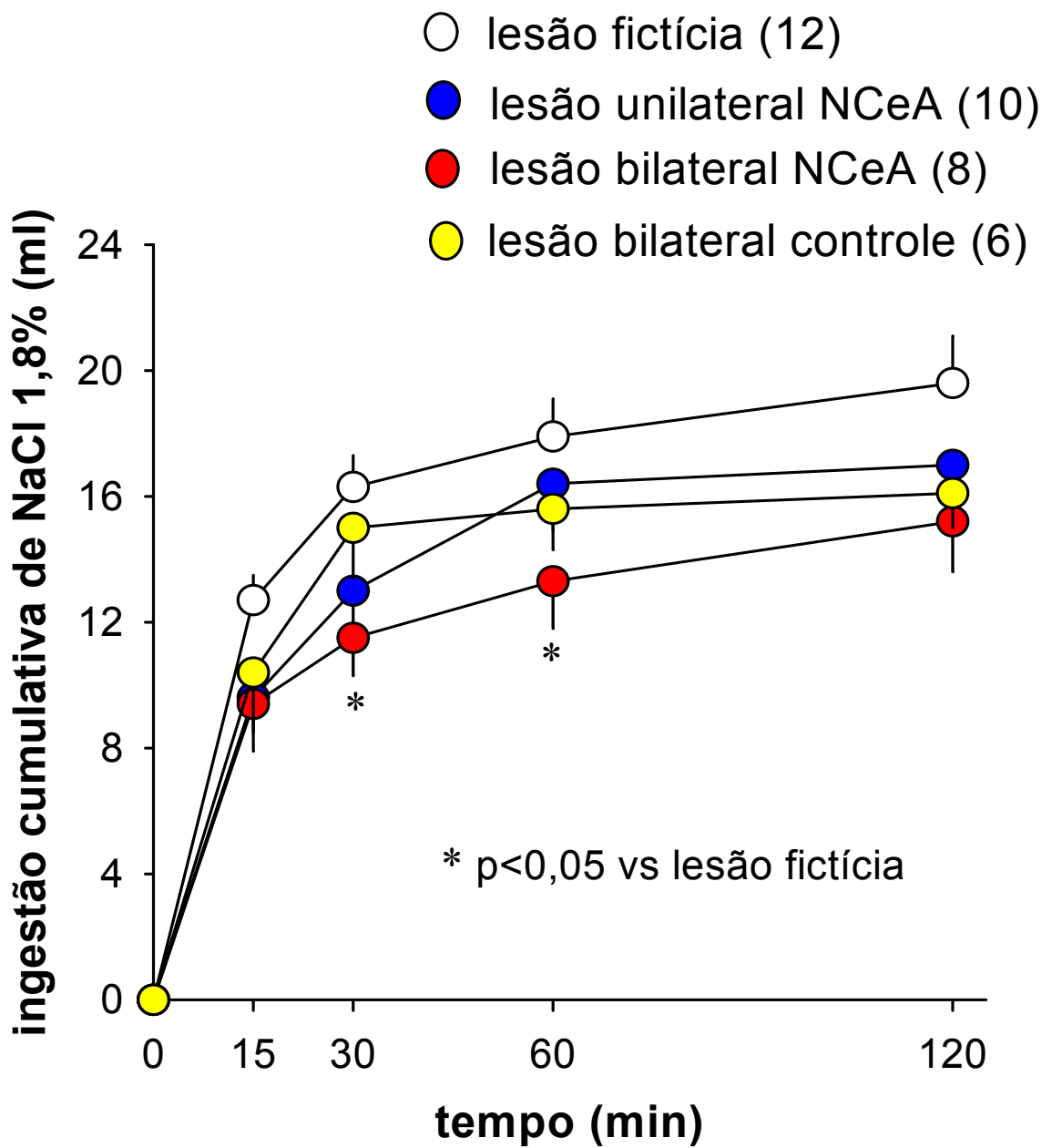


Figura 18

**teste do apetite ao sódio  
após 24 h de depleção de sódio  
induzida por furosemida**

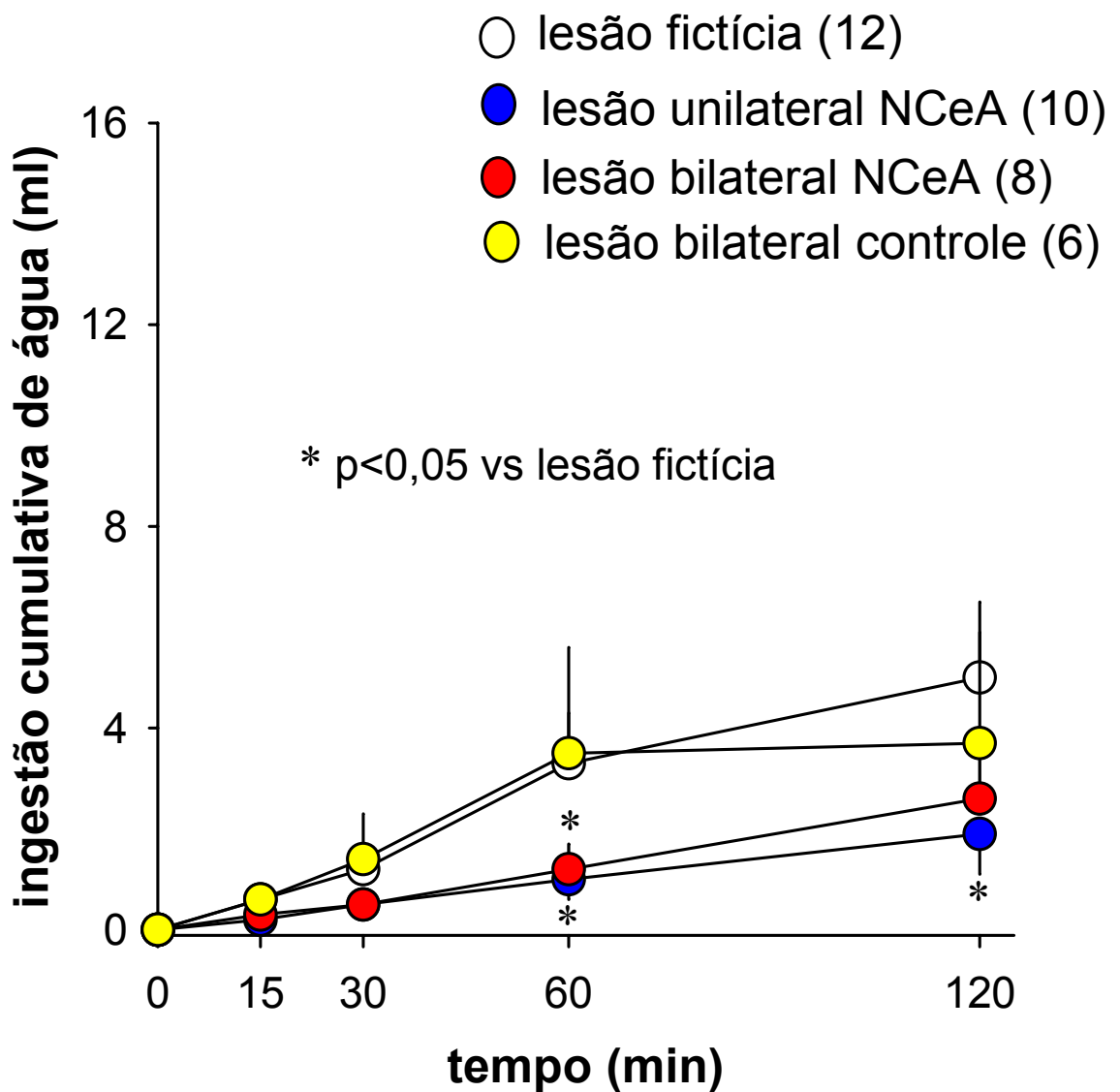


Figura 19

#### **4.5. Verificação do incremento na ingestão de sódio após sucessivas privações hídricas – modelo PH36hRP - teste apetite ao sódio**

##### **4.5.1. Grupo animais intactos**

A ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em animais intactos foi verificada nos testes de apetite ao sódio após quatro privações sucessivas, com intervalos de uma semana entre as privações de 36 horas.

No período de reidratação parcial com água por 2 horas, animais intactos beberam quantidades semelhantes de água ( $26,4 \pm 1,9$  ml / 2 h), não apresentando diferenças entre as quatro privações.

Apresentaram incremento na ingestão cumulativa de NaCl 1,8% a partir da segunda privação hídrica – PH36hRP ( $14,1 \pm 1,6$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ), na terceira PH36hRP ( $13,3 \pm 3,3$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ) e na quarta PH36hRP ( $15,5 \pm 1,2$  ml / 2 h,  $p < 0,05$ ) comparados a primeira PH36hRP ( $10,1 \pm 1,8$  ml NaCl 1,8% / 2 h). Figura 20.

##### **4.5.2. Grupo animais: lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA e lesão bilateral do NCeA**

A ingestão cumulativa de NaCl 1,8%, em animais com lesão, foi verificada em testes de apetite ao sódio após duas privações sucessivas, com intervalo de uma semana entre as privações de 36 horas.

Não foi observado incremento na ingestão cumulativa de NaCl 1,8% ou água comparando-se o primeiro e o segundo teste do apetite após PH36hRP, com intervalo de uma semana em ratos dos grupos: lesão fictícia, lesão unilateral do NCeA e lesão bilateral do NCeA. Figuras 21, 22 e 23.

Os danos na ingestão regulatória de NaCl 1,8% (teste do apetite ao sódio) após PH36hRP, causados pelas lesões unilaterais ou bilaterais do NCeA, não foram recuperados no período estabelecido entre o primeiro e o segundo teste do apetite ao sódio, o que é demonstrado também por não aumentar a ingestão diária (não regulatória) de NaCl 1,8% nos intervalos entre os testes. Figura 24.

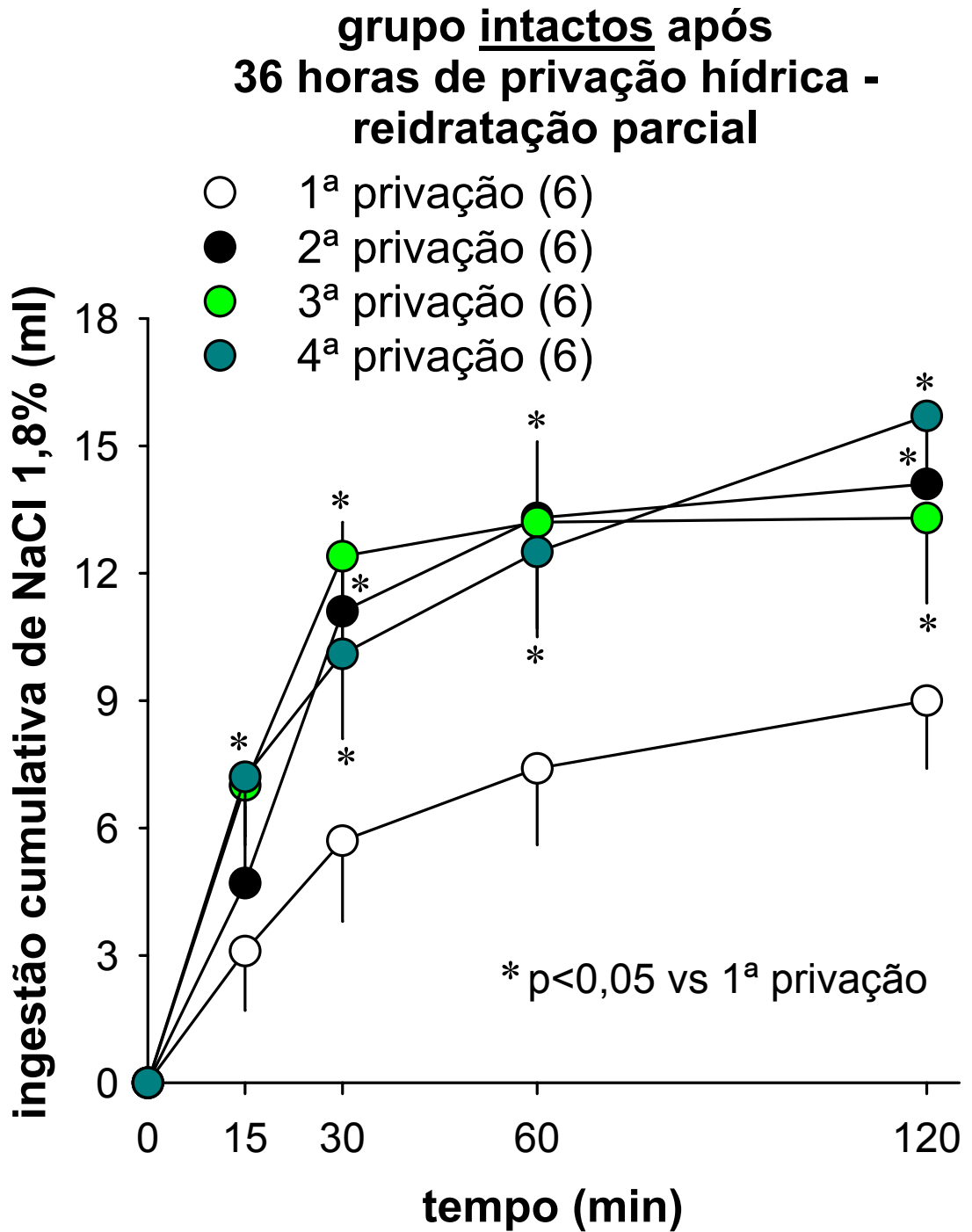


Figura 20

**grupo fictício após  
36 horas de privação hídrica -  
reidratação parcial**

- 1ª privação (12)  
● 2ª privação (12)

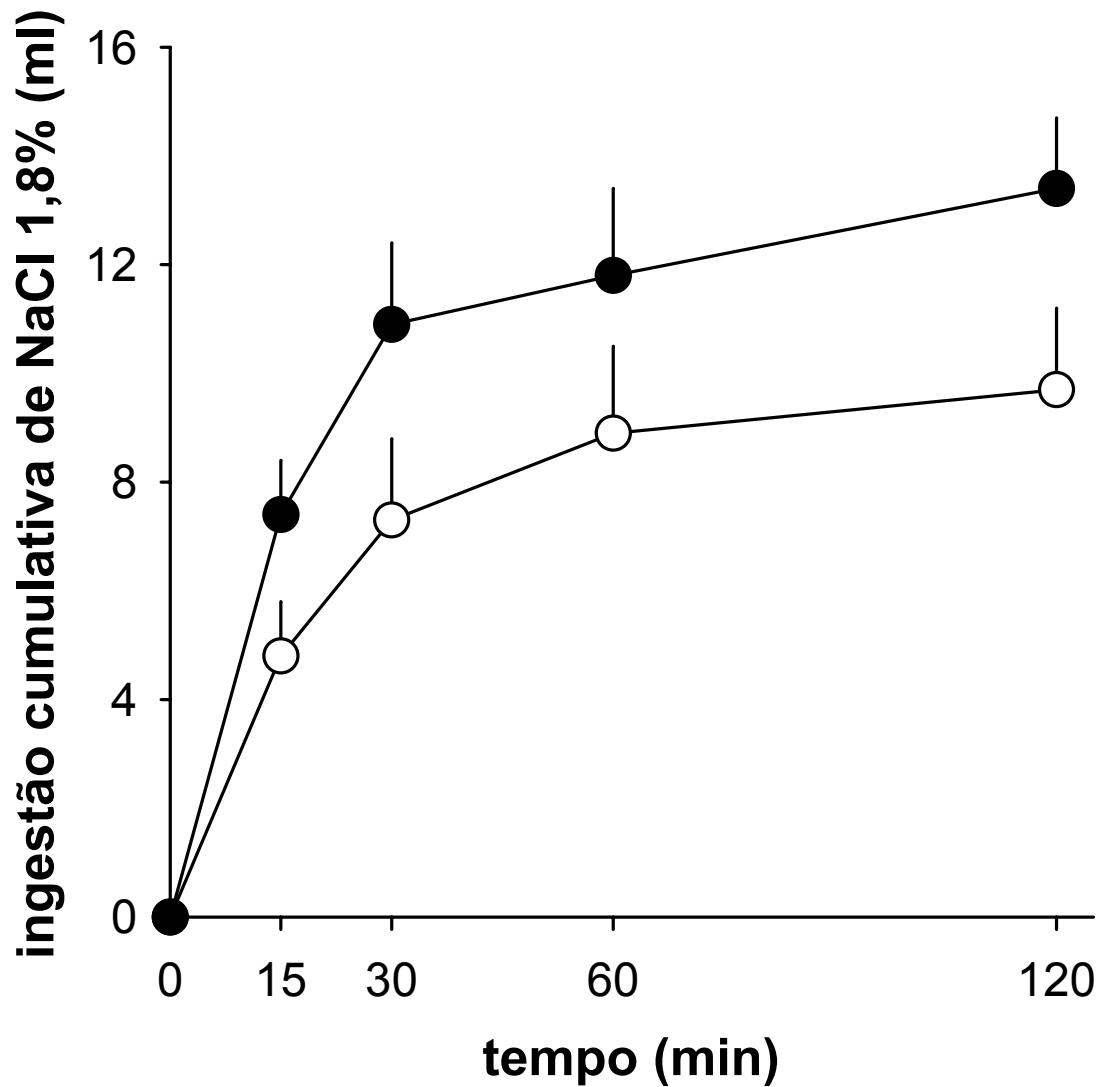


Figura 21

**grupo unilateral após  
36 horas de privação hídrica -  
reidratação parcial**

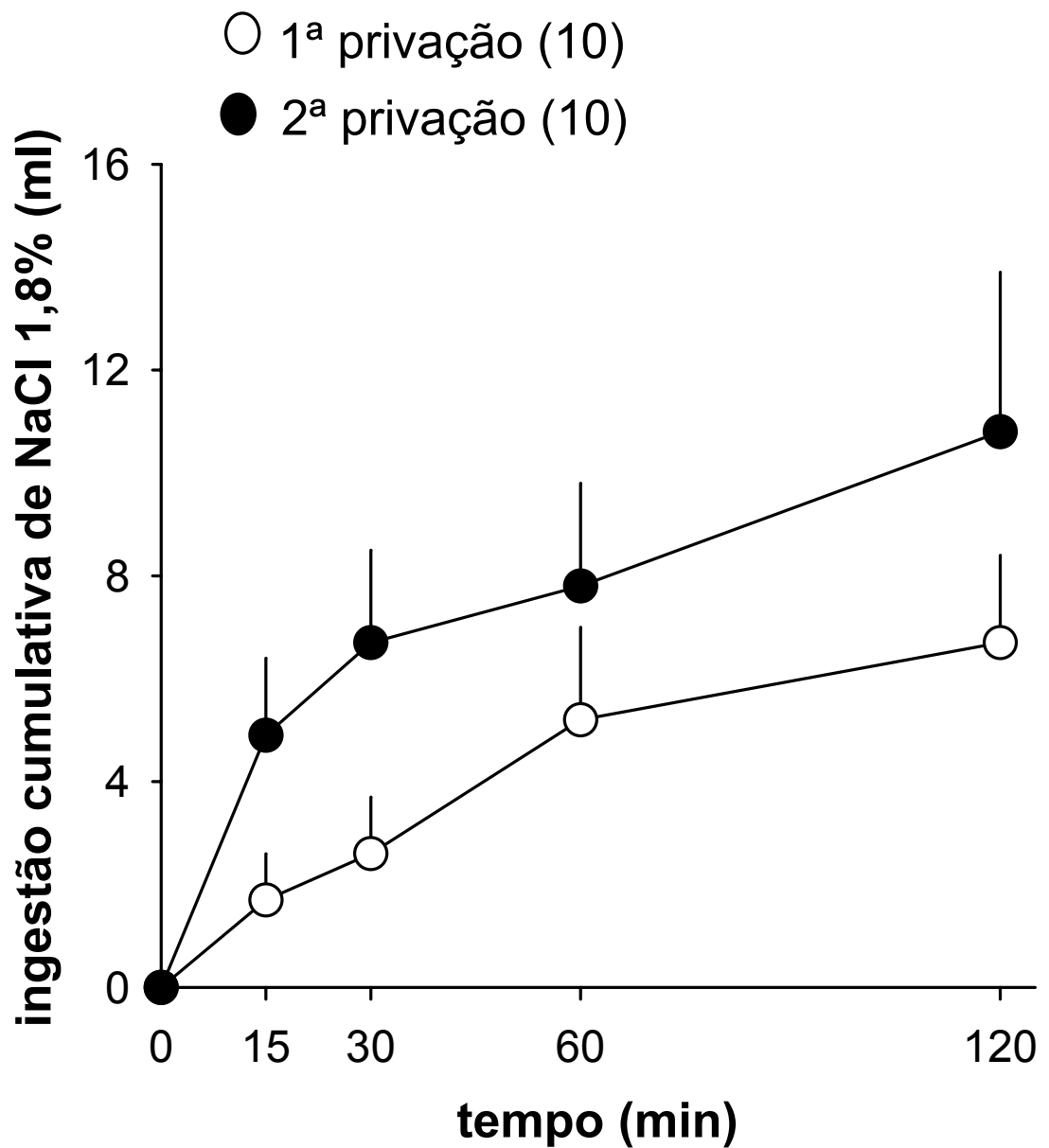


Figura 22



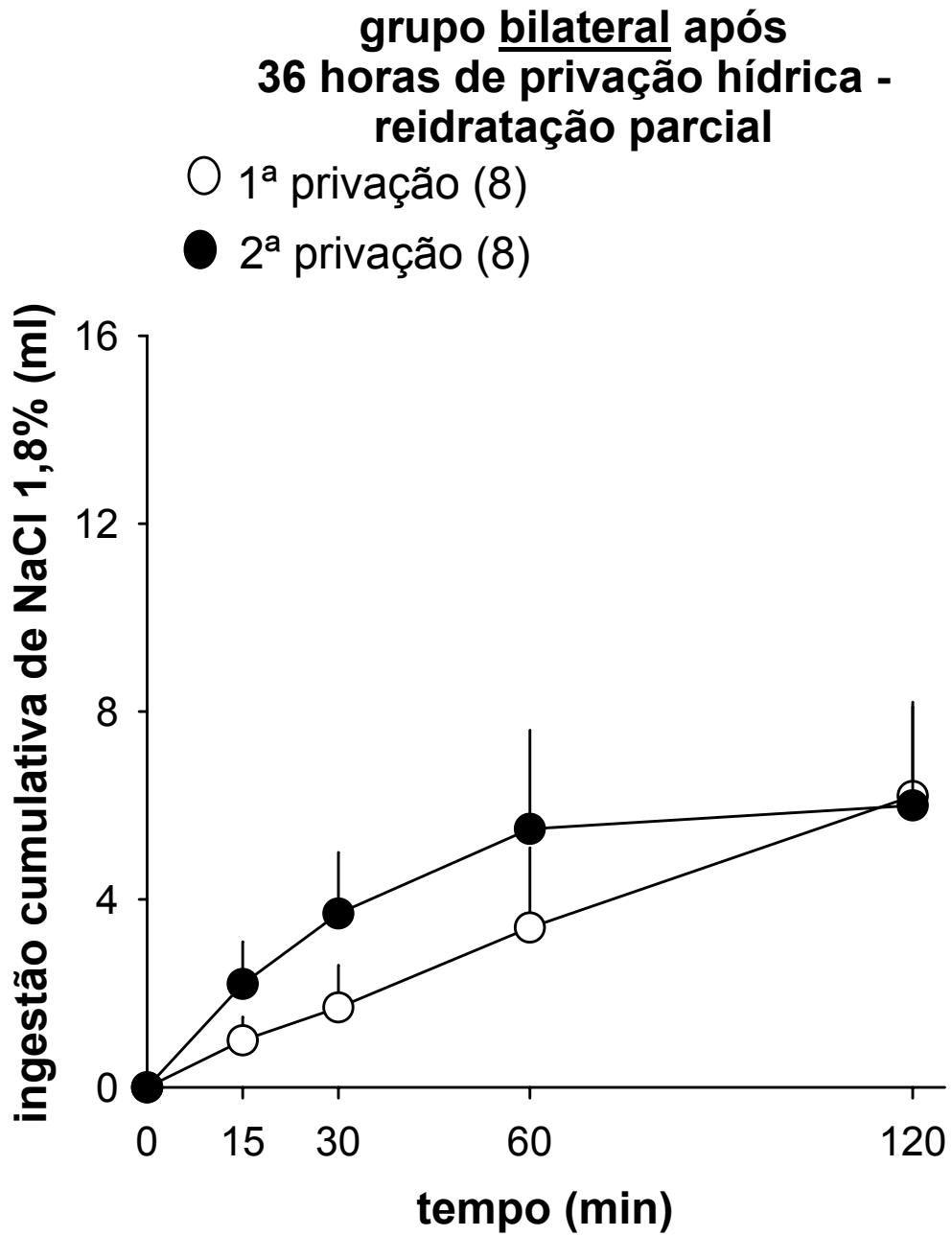


Figura 23

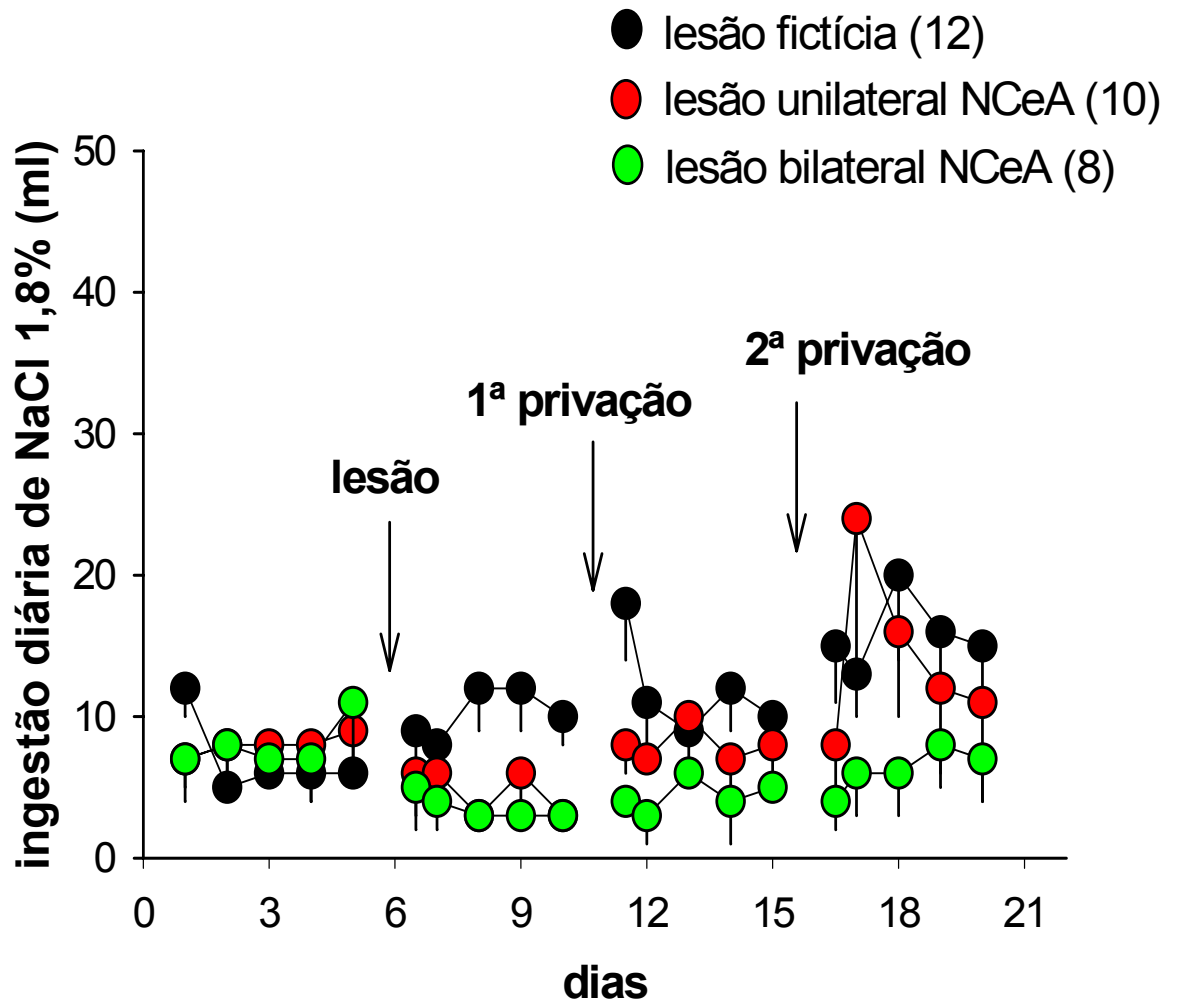


Figura 24

#### **4.6. Efeitos da privação hídrica nas concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, proteínas totais, uréia, sódio, potássio e valores de hematócrito e osmolalidade**

##### **4.6.1. Privação hídrica de 24 horas**

Animais intactos, privados de água por 24 horas, apresentaram aumento de 6% nas proteínas séricas e hematócrito, aumento de 16% nas concentrações séricas de uréia, aumento de 2% nas concentrações séricas de sódio, caracterizando hipovolemia (6%) e hipernatremia, quando comparados ao grupo controle hidratado.

O aumento da osmolalidade foi de 3% na privação hídrica de 24 horas.

As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos e potássio não apresentaram alterações na privação hídrica de 24 horas. Tabela 1.

##### **4.6.2. Privação hídrica de 36 horas**

Animais intactos, privados de água por 36 horas, apresentaram aumento de 10% nas proteínas séricas, aumento de 7% nos valores de hematócrito, aumento de 32% nas concentrações séricas de uréia, aumento de 2% nas concentrações séricas de sódio, caracterizando hipovolemia (> 6%) e hipernatremia, quando comparados ao grupo controle hidratado.

O aumento da osmolalidade foi de 9% na privação hídrica de 36 horas.

As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos e potássio não apresentaram alterações na privação hídrica de 36 horas, quando comparados os grupos privado e hidratado. Tabela 2.

#### ***4.6.3. Efeitos da lesão bilateral do NCeA no modelo PH36hRP em parâmetros sanguíneos***

Animais com lesão bilateral do NCeA submetidos a PH36hRP não apresentaram diferenças nas concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, proteínas totais, uréia, sódio, potássio, nos valores de hematócrito e osmolalidade ou da atividade da renina plasmática, quando comparados com o grupo lesão fictícia submetidos ao PH36hRP. Tabela 3.

A lesão eletrolítica bilateral do NCeA não influenciou variações de parâmetros metabólicos bioquímicos no modelo PH36hRP.

**TABELA 1 - Parâmetros sanguíneos na privação de 24 horas**

Determinações Bioquímicas	Grupo controle	Grupo privado de água por 24 horas
Glicose (mg/dl)	135 ± 5	123 ± 6
Triglicerídeos (mg/dl)	60 ± 5	59 ± 7
Proteína total (mg %)	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,1*
Uréia (mg/dl)	36 ± 2	42 ± 2*
Sódio (mmol/l)	140 ± 0,5	143 ± 0,9*
Potássio (mmol/l)	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,2
Osmolalidade (mOsm/Kg)	294 ± 1	301 ± 2*
Hematócrito (mg/dl)	47 ± 1	49 ± 1

Concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, proteína total, uréia, sódio, potássio e valores da osmolalidade e hematócrito em ratos intactos: controle (hidratados) e privados de água por **24 horas**. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média, n = 10 por grupo. \* p < 0,05 comparado com o grupo controle.

**TABELA 2 - Parâmetros sanguíneos na privação de 36 horas**

<b>Determinações Bioquímicas</b>	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo privado de água por 36 horas</b>
Glicose (mg/dl)	136 ± 7	124 ± 5
Triglicerídeos (mg/dl)	59 ± 4	56 ± 3
Proteína Total (mg %)	6,1 ± 0,1	6,7 ± 0,1*
Uréia (mg/dl)	45 ± 1	59 ± 2*
Sódio (mmol/l)	138 ± 0,4	141 ± 0,7*
Potássio (mmol/l)	4,8 ± 0,1	5,0 ± 0,1
Osmolalidade (mOsm/Kg)	270 ± 8	296 ± 6*
Hematócrito (mg/dl)	45 ± 1	48 ± 1*

Concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, proteína total, uréia, sódio, potássio e valores da osmolalidade e hematócrito em ratos intactos: controle (hidratados) e privados de água por **36 horas**. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média, n = 11 por grupo. \* p < 0,05 comparado com o grupo controle.

**TABELA 3 – Parâmetros sanguíneos no PH36hRP – lesão do NCeA**

<b>Determinações bioquímicas</b>	<b>Grupo controle Cirurgia fictícia (n = 9)</b>	<b>Grupo lesão bilateral NCeA (n = 8)</b>
Glicose (mg/dl)	97 ± 4	96 ± 2
Triglicerídeos (mg/dl)	43 ± 4	38 ± 3
Proteína total (mg%)	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1
Uréia (mg/dl)	65 ± 4	66 ± 4
Sódio (mmol/l)	131 ± 0,3	134 ± 0,9
Potássio (mmol/l)	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,2
Osmolalidade (mOsm/kg)	278 ± 1	282 ± 3
Hematócrito (mg/dl)	48 ± 1	49 ± 2
Renina (ng/ml/h)	4,3 ± 0,3	3,7 ± 0,7
Volume água ingerido (2 horas)	25 ± 1	23 ± 2

Concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, proteína total, uréia, sódio, potássio e valores da osmolalidade e hematócrito e atividade da renina plasmática em ratos com lesão fictícia (controle) e lesão bilateral do NCeA privados de água por 36 horas e reidratados com água por 2 horas. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média, n = (número de animais por grupo).

**4.7. Efeito das lesões bilaterais do NCeA na expressão da proteína c-Fos induzida por privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial em áreas prosencefálicas e pontinas**

**Grupos analisados:**

- **lesão fictícia (F):** grupo normohidratado (Fh) e submetidos à privação hídrica por 36 horas e reidratação parcial (FPHRP)
- **lesão bilateral do NCeA (L):** grupo normohidratado (Lh) e submetidos à privação hídrica por 36 horas e reidratação parcial (LPHRP)

**4.7.1. Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT)**

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh apresentou em média  $1,7 \pm 0,5$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo FPHRP aumentou 14 vezes a expressão c-Fos ( $23,6 \pm 6,4$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Fh [ $F(23,69) = 34,56$ ,  $p < 0,05$ ].

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $1,3 \pm 0,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo LPHRP aumentou 19 vezes a expressão c-Fos ( $26,8 \pm 4,8$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh [ $F(23,69) = 34,56$ ,  $p < 0,05$ ].

Comparando-se os grupos Fh com Lh e grupos FPHRP com LPHRP não foram encontradas diferenças, portanto, no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) o aumento da expressão c-Fos é resultado da condição de



desidratação do modelo PH36hRP e não foi influenciado pela lesão bilateral do NCeA. Figuras 25 e 26.

## ÓRGÃO VASCULOSO DA LÂMINA TERMINAL (OVLT)

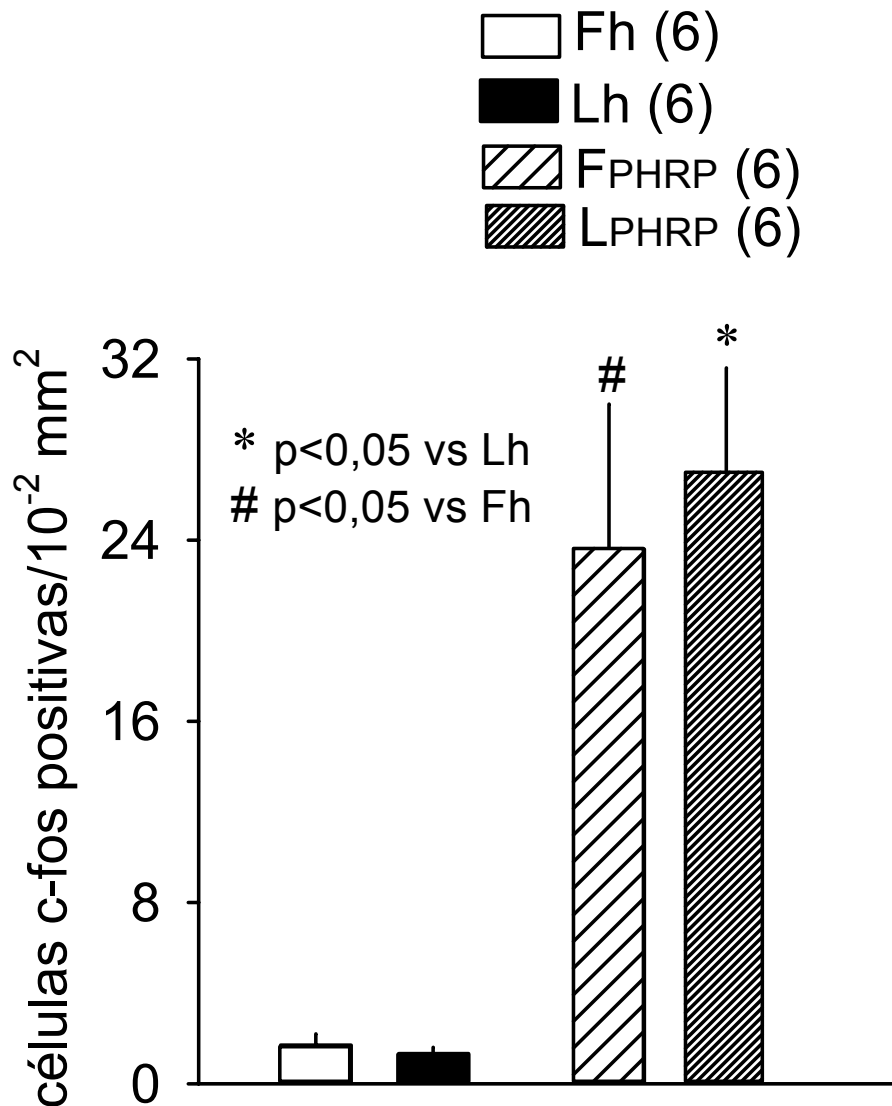


FIGURA 25 – Células c-Fos positivas /  $10^{-2} \text{ mm}^2$  no OVLT de ratos com lesão fictícia hidratados (Fh), lesão bilateral do NCeA hidratados (Lh), lesão fictícia submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (FPHRP) e lesão bilateral do NCeA submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (LPHRP). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e o número de animais está demonstrado entre parênteses.

## ORGÃO VASCULOSO DA LÂMINA TERMINAL (OVLT)

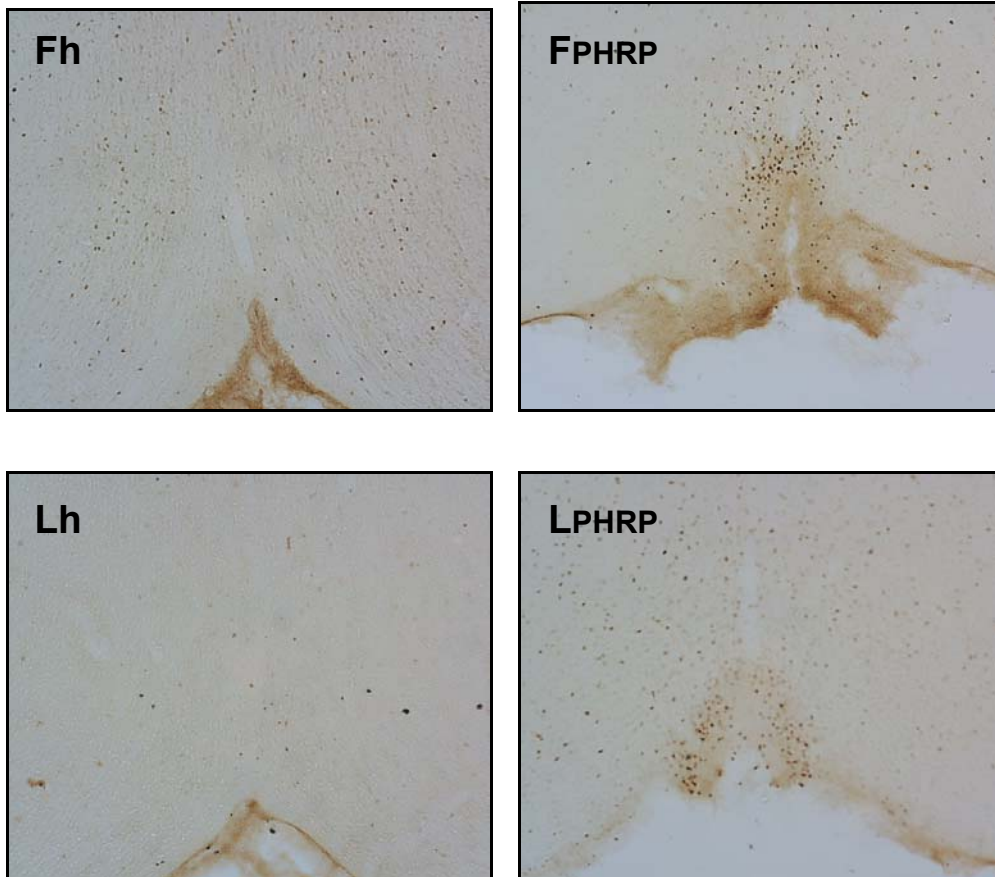


FIGURA 26 – Fotomicrografias (aumento de 10 x) de secções coronais do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína c-Fos representativa de um rato dos grupos: Fh (fictício hidratado), FPHRP (fictício submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas), Lh (lesão bilateral do NCeA hidratado) e LPHRP (lesão bilateral do NCeA submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas).

#### **4.7.2. Núcleo Pré-Óptico Mediano (MnPO)**

O núcleo pré-óptico mediano apresenta parte dorsal (acima da comissura anterior) e parte ventral (abaixo da comissura anterior, contadas separadamente e apresentou como resultados:

##### ***MnPO dorsal***

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh apresentou em média  $4,4 \pm 0,6$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo FPHRP aumentou 3,6 vezes a expressão c-Fos ( $19,7 \pm 3,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Fh [ $F(23,69) = 43,27$ ,  $p < 0,05$ ].

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $4,0 \pm 1,1$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo LPHRP aumentou 3,2 vezes a expressão c-Fos ( $18,3 \pm 2,7$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh.

Comparando-se os grupos Fh com Lh e grupos FPHRP com LPHRP não foram encontradas diferenças no núcleo pré-óptico mediano – parte dorsal (MnPOd).

##### ***MnPO ventral***

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh apresentou em média  $5,2 \pm 1,0$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo FPHRP aumentou 2,5

vezes a expressão c-Fos ( $19,5 \pm 2,0$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Fh [ $F(23,69) = 51,88, p < 0,05$ ].

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $5,6 \pm 1,1$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo LPHRP aumentou 2 vezes a expressão c-Fos ( $16,6 \pm 2,5$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh [ $F(23,69) = 51,88, p < 0,05$ ].

Comparando-se os grupos Fh com Lh e grupos FPHRP com LPHRP não foram encontradas diferenças no núcleo pré-óptico mediano – parte ventral (MnPOv)

No núcleo pré-óptico mediano (MnPO), partes dorsal e ventral, foram semelhantes na expressão c-Fos, o aumento na expressão foi decorrente da condição de desidratação do modelo PH36hRP e não foi influenciado pela lesão bilateral do NCeA. Figuras 27 e 28.

## NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO (MnPO)

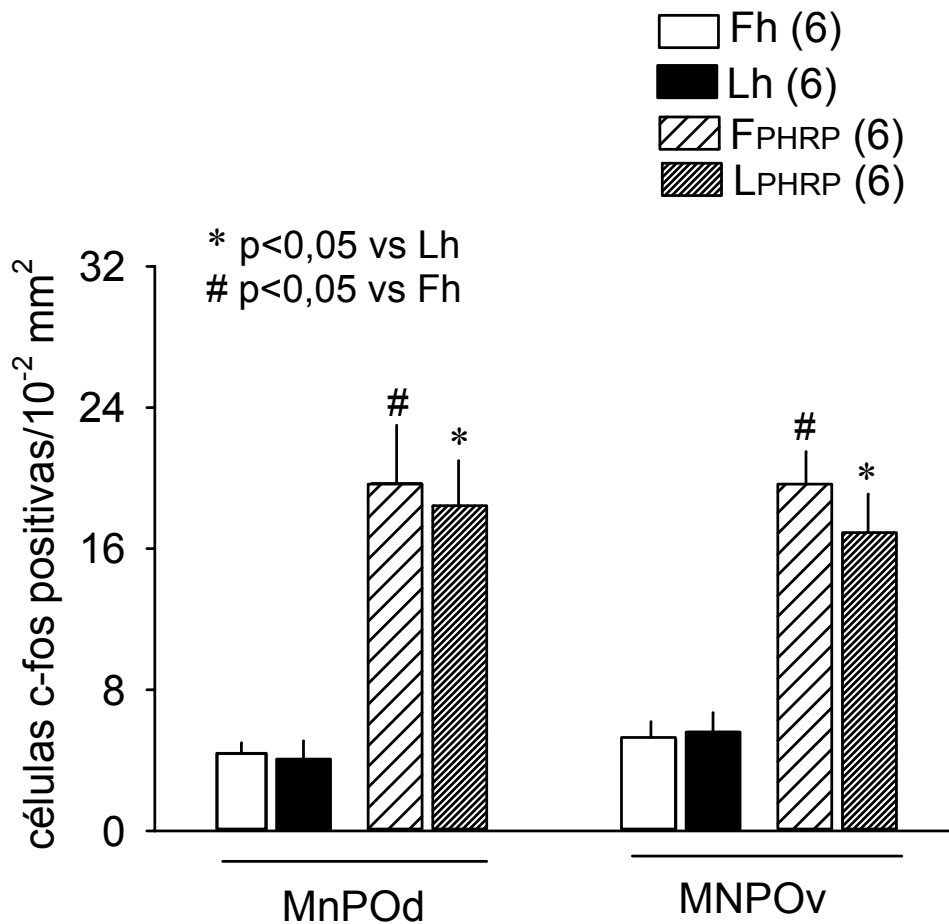


FIGURA 27 – Células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup> no MnPO dorsal (MnPOd) e ventral (MnPOv) de ratos com lesão fictícia hidratados (Fh), lesão bilateral do NCeA hidratados (Lh), lesão fictícia submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (FPHRP) e lesão bilateral do NCeA submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (LPHRP). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e o número de animais está demonstrado entre parênteses.

## NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO (MnPO)

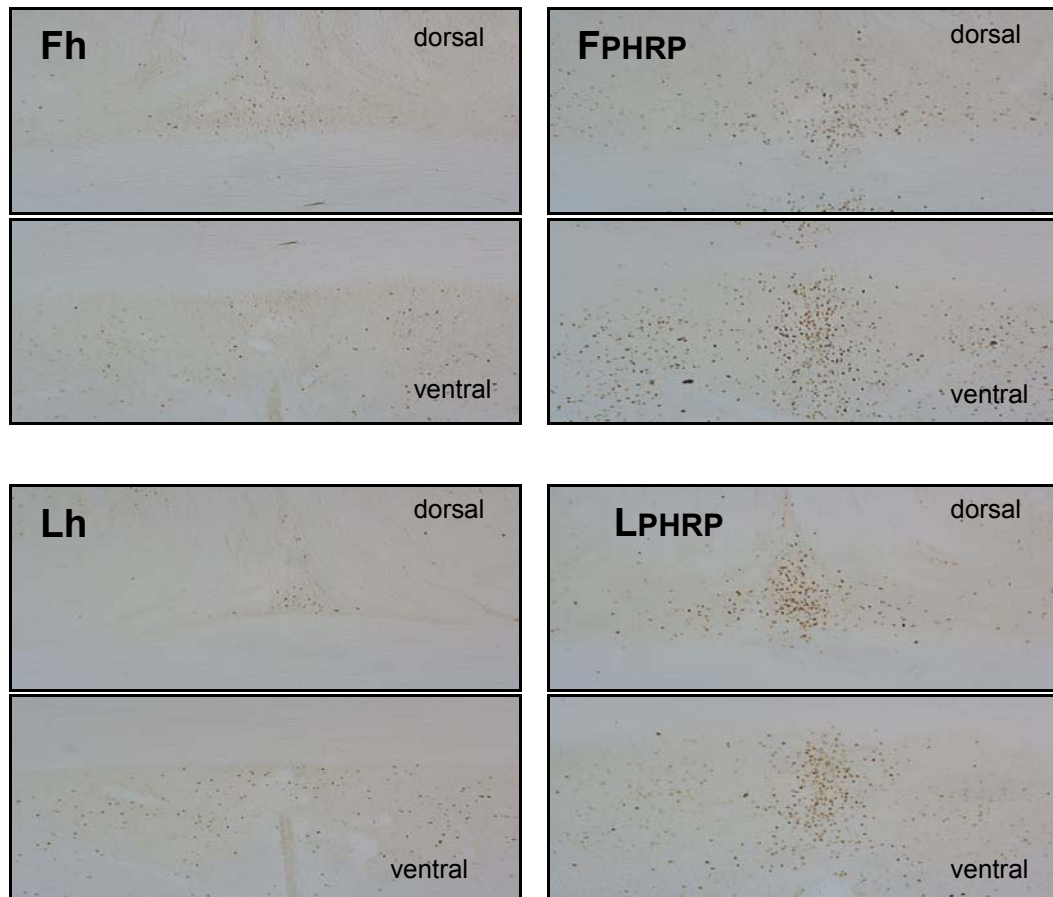


FIGURA 28 – Fotomicrografias (aumento de 10 x) de secções coronais do núcleo pré-óptico mediano MnPO (dorsal superior e ventral inferior a comissura) mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína c-Fos representativa de um rato dos grupos: Fh (fictício hidratado), FPHRP (fictício submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas), Lh (lesão bilateral do NCEA hidratado e LPHRP (lesão bilateral do NCEA submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas).

### **4.7.3. Órgão Subfornicial (SFO)**

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh apresentou em média  $6,0 \pm 2,0$  células c-Fos positivas/ $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo FPHRP aumentou 1,8 vezes a expressão c-Fos ( $17,4 \pm 4,8$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh [ $F(23,69) = 9,97$ ,  $p < 0,05$ ].

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $4,7 \pm 1,2$  células c-Fos positivas /  $10$  mm<sup>2</sup>. O grupo LPHRP aumentou 1,8 vezes a expressão c-Fos ( $13,1 \pm 3,4$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh [ $F(23,69) = 9,97$ ,  $p < 0,05$ ].

Comparando-se os grupos Fh com Lh e grupos FPHRP com LPHRP não foram encontradas diferenças, portanto, no órgão subfornicial (SFO) o aumento da expressão c-Fos é resultado da condição de desidratação do modelo PH36hRP e não foi influenciado pela lesão bilateral do NCeA. Figuras 29 e 30.



## ÓRGÃO SUBFORNICIAL (SFO)

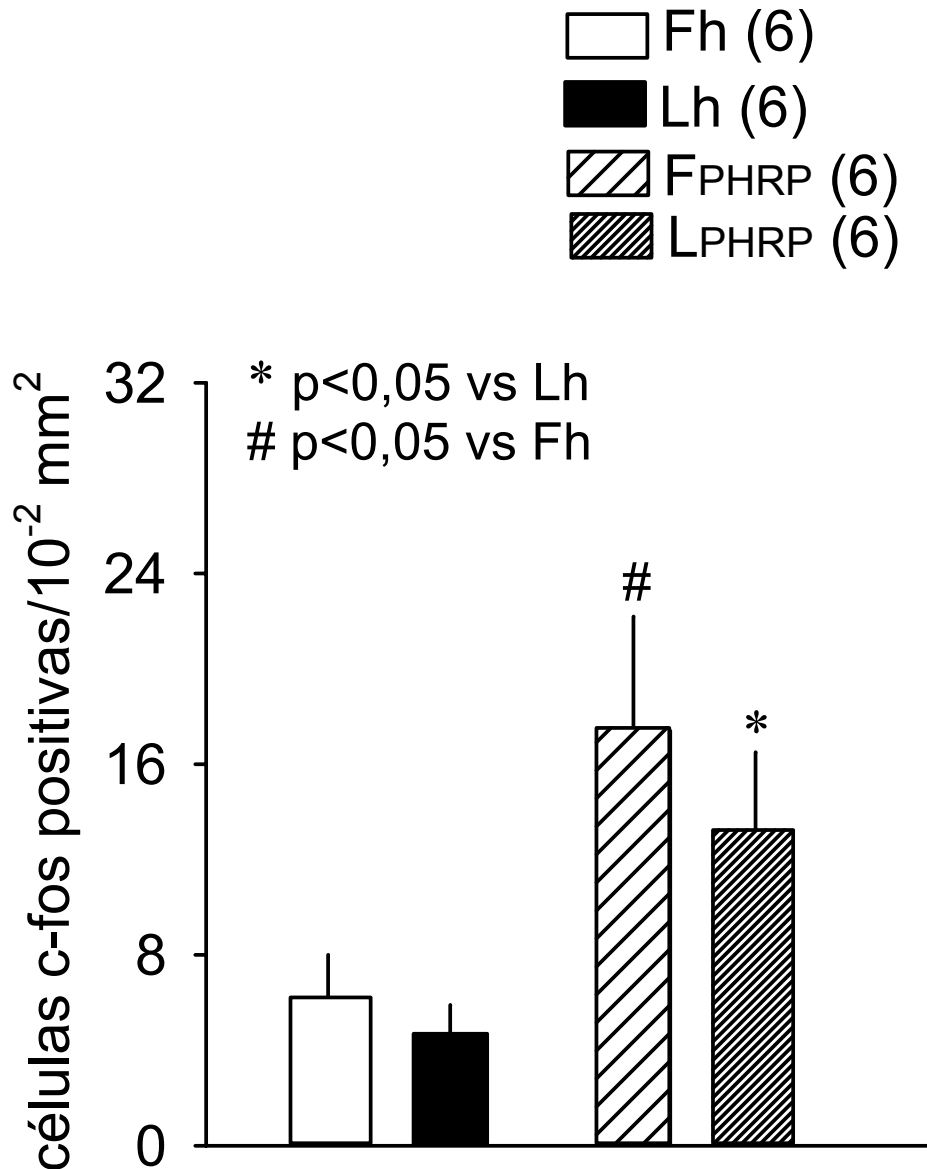


FIGURA 29 – Células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup> no SFO de ratos com lesão fictícia hidratados (Fh), lesão bilateral do NCeA hidratados (Lh), lesão fictícia submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (FPHRP) e lesão bilateral do NCeA submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (LPHRP). Os resultados estão expressos como média + erro padrão da média e o número de animais está demonstrado entre parênteses.

## ÓRGÃO SUBFORNICIAL (SFO)

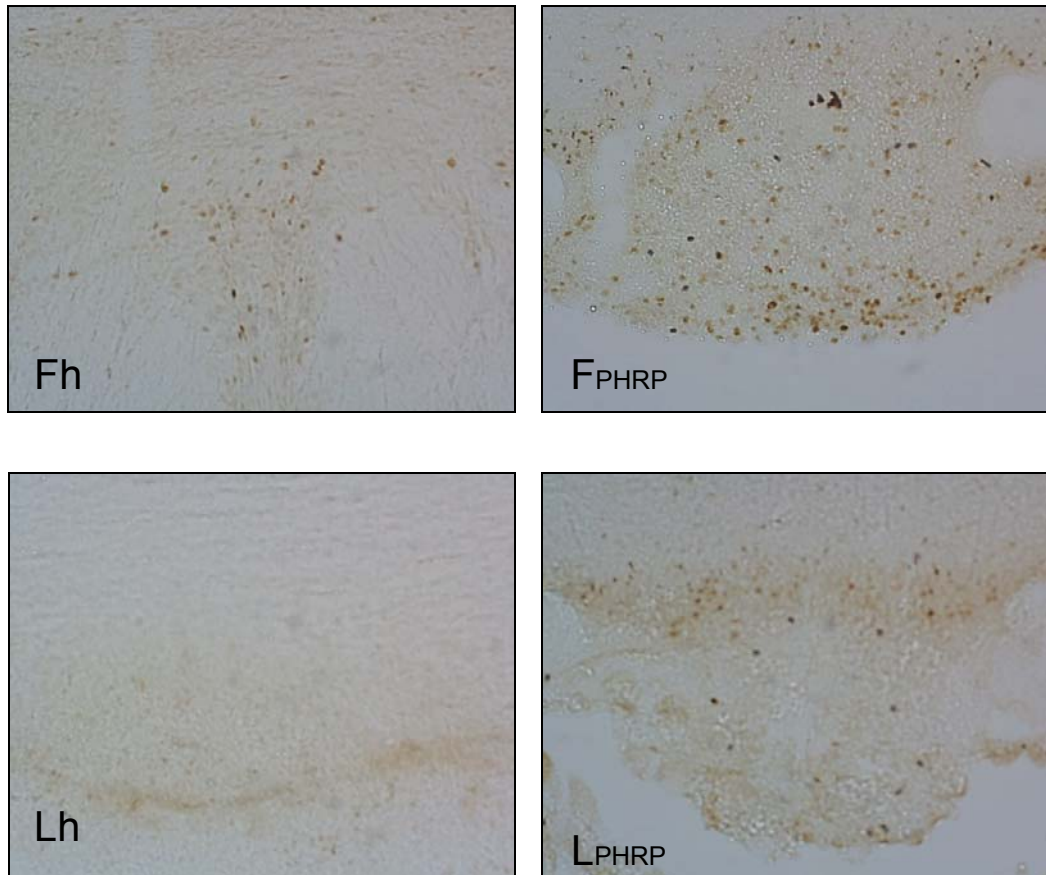


FIGURA 30 – Fotomicrografias (aumento de 10 x) de secções coronais do órgão subfornicial (SFO) mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína c-Fos representativa de um rato dos grupos: Fh (fictício hidratado), FPHRP (fictício submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas), Lh (lesão bilateral do NCeA hidratado e LPHRP (lesão bilateral do NCeA submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas).

#### **4.7.4. Núcleo Supra-Óptico (SON)**

Como área bilateral, as contagens do lado direito e esquerdo dos cortes foram feitas separadamente e apresentadas como total da somatória dos lados.

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh (média  $3,2 \pm 1,2$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) e o grupo FPHRP (média  $8,8 \pm 2,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>), não apresentaram diferenças quando comparados.

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh (média  $5,1 \pm 1,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) e o grupo LPHRP (média  $5,6 \pm 1,1$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>), não apresentaram diferenças quando comparados.

Comparando-se os grupos não foram verificadas diferenças, quer na condição do modelo PH36hRP ou com a lesão bilateral do NCeA. No SON, a condição de privação do modelo PHRP não alterou a expressão da proteína c-Fos. A lesão bilateral do NCeA não influenciou a expressão c-Fos. Figuras 31 e 32.

## NÚCLEO SUPRA-ÓPTICO (SON)

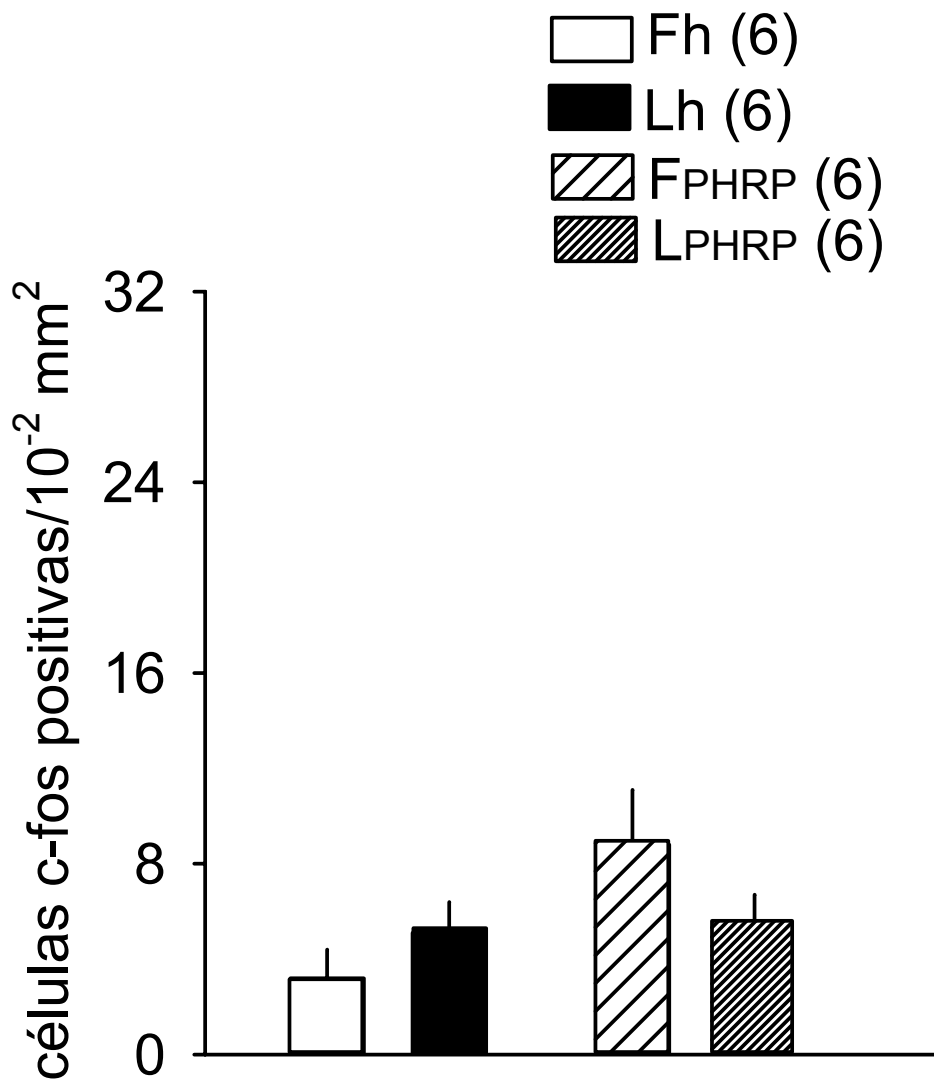


FIGURA 31 – Células c-Fos positivas /  $10^{-2} \text{ mm}^2$  no SON de ratos com lesão fictícia hidratados (Fh), lesão bilateral do NCEA hidratados (Lh), lesão fictícia submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (FPHRP) e lesão bilateral do NCEA submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (LPHRP). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e o número de animais está demonstrado entre parênteses.

## NÚCLEO SUPRA-ÓPTICO (SON)

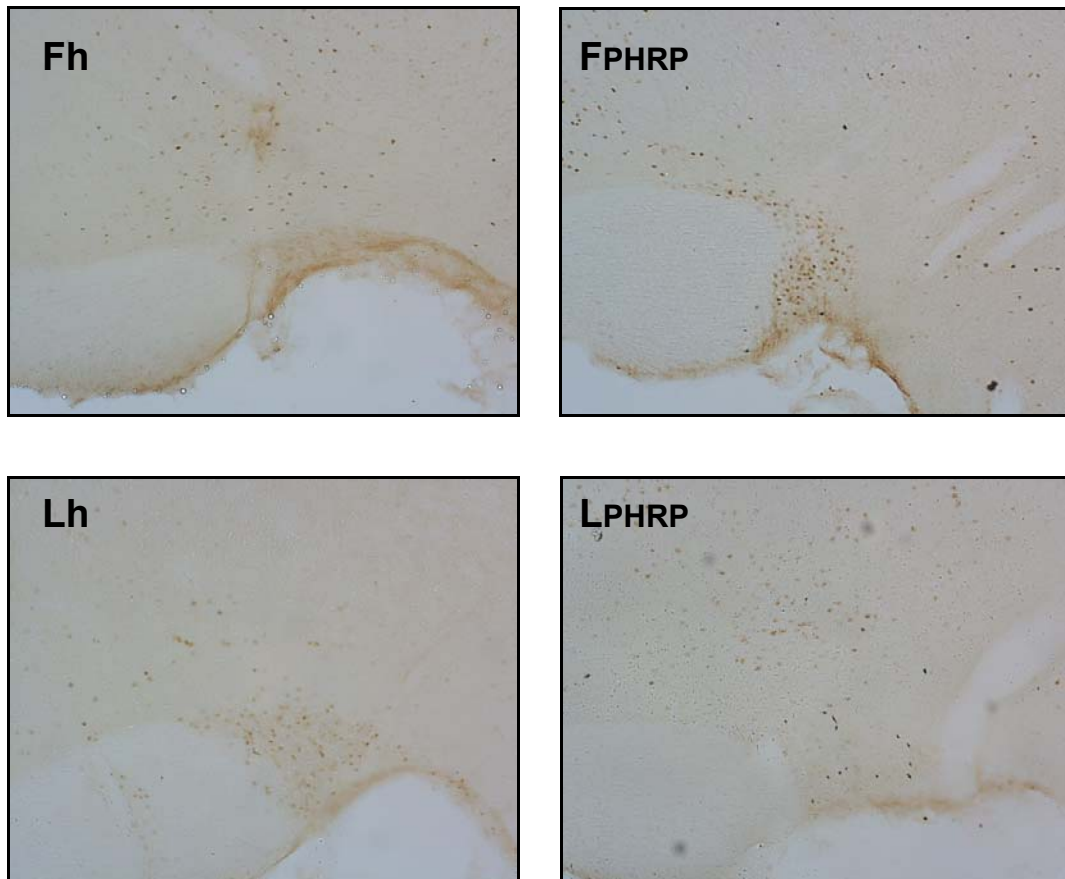


FIGURA 32 – Fotomicrografias (aumento de 10 x) de secções coronais de um dos lados do núcleo supra-óptico (SON) mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína c-Fos representativa de um rato dos grupos: Fh (fictício hidratado), FPHRP (fictício submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas), Lh (lesão bilateral do NCeA hidratado) e LPHRP (lesão bilateral do NCeA submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas).

#### **4.7.5. Núcleo Paraventricular (PVN)**

As contagens do núcleo paraventricular – porção parvocelular e magnocelular foram contadas do lado esquerdo e direito dos cortes, separadamente, e apresentadas como total da somatória dos lados.

##### ***PVNp – Porção Parvocelular***

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh (média  $6,4 \pm 1,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) e o grupo F<sub>PHRP</sub> (média  $10,2 \pm 2,7$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>), não apresentaram diferenças quando comparados.

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $7,6 \pm 1,5$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo L<sub>PHRP</sub> apresentou em média  $14,8 \pm 3,2$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>, representando um aumento de duas vezes comparado com ao grupo Lh [F(23,69) = 6,36, p < 0,05].

Comparando-se o grupo lesão fictícia com o grupo lesão bilateral do NCeA não foram diferentes na expressão c-Fos.

O aumento da expressão c-Fos na porção parvocelular do núcleo paraventricular (PVNp) em animais com lesão do NCeA é resultante da condição de privação hídrica do modelo PH36hRP e a lesão bilateral do

NCeA produziu alterações na expressão da proteína c-Fos neste modelo. Figuras 33 e 34.

### ***PVPm – porção magnocelular***

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh (média  $8,2 \pm 1,4$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) e o grupo FPHRP (média  $10,1 \pm 2,9$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>), não apresentaram diferenças quando comparados.

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh (média  $13,6 \pm 3,8$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) e o grupo LPHRP (média  $15,5 \pm 3,7$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) não apresentaram diferenças quando comparados.

No núcleo paraventricular – porção magnocelular (PVNm) a condição de privação hídrica por 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas não alterou a expressão c-Fos e a lesão bilateral do NCeA não influenciou a expressão da proteína c-Fos. Figuras 33 e 34.

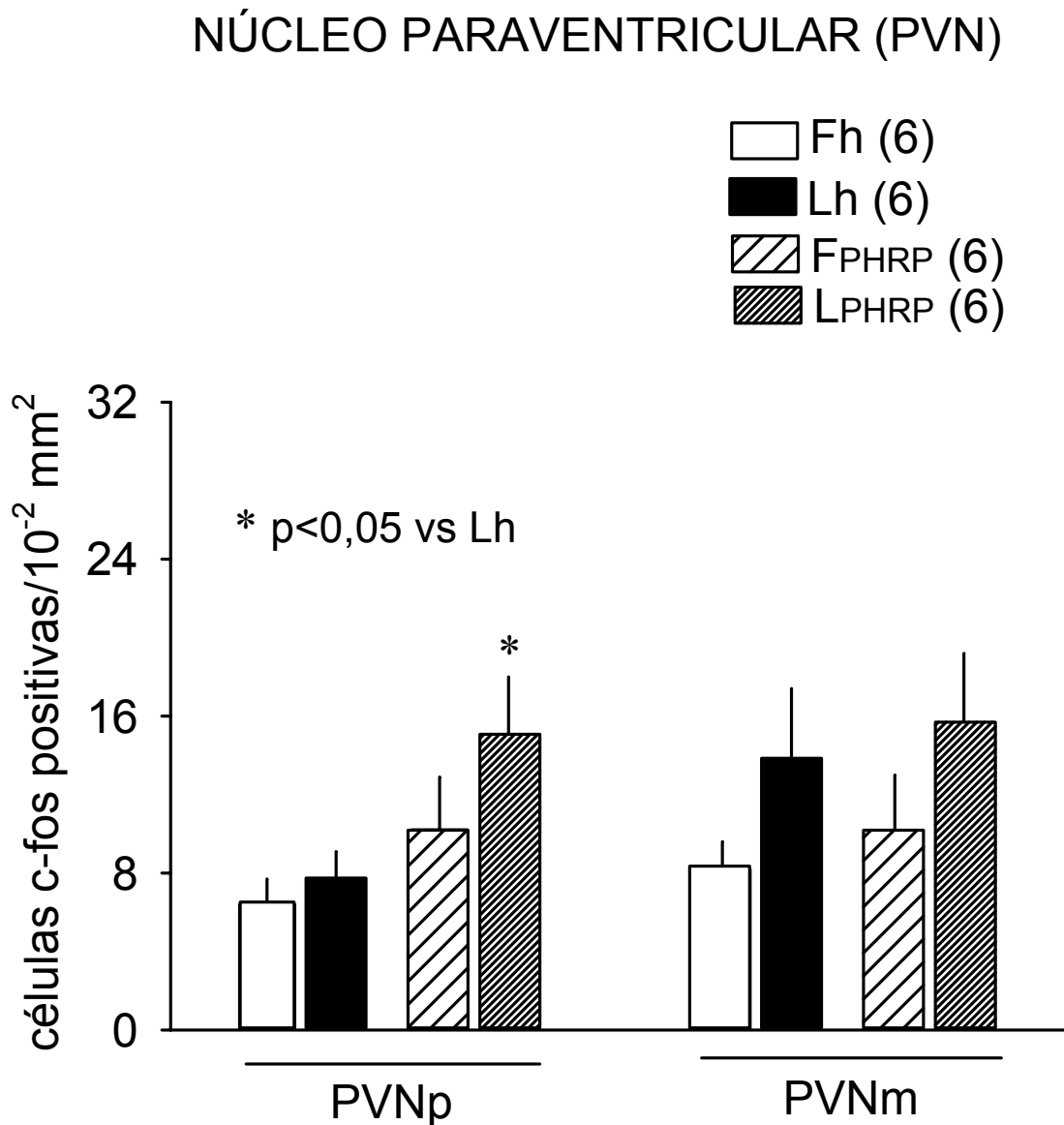


FIGURA 33 – Células c-Fos positivas /  $10^{-2} \text{ mm}^2$  no PVN porção parvocelular (PVNp) e porção magnocelular (PVNm) de ratos com lesão fictícia hidratados (Fh), lesão bilateral do NCeA hidratados (Lh), lesão fictícia submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (FPHRP) e lesão bilateral do NCeA submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (LPHRP). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e o número de animais está demonstrado entre parênteses.



## NÚCLEO PARAVENTRICULAR (PVN)

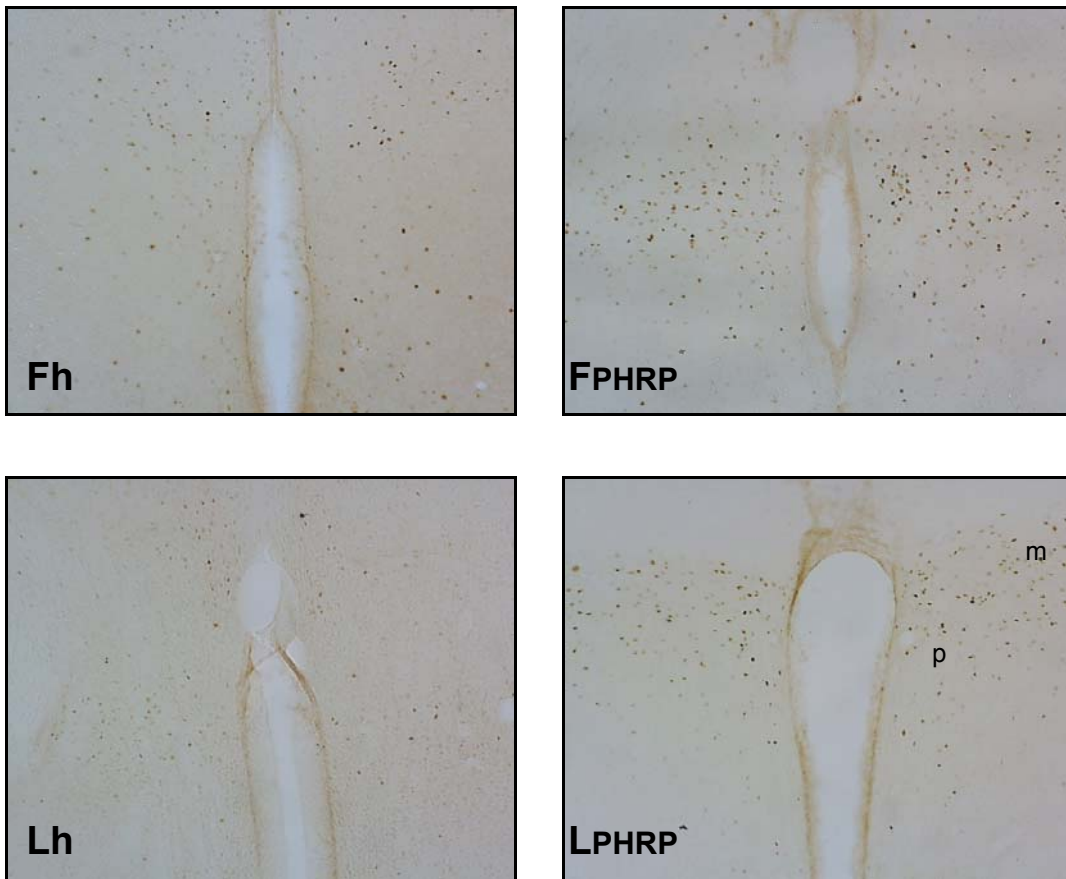


FIGURA 34 – Fotomicrografias (aumento de 10 x) de secções coronais do núcleo paraventricular, porção parvocelular (PVNp) e porção magnocelular (PVNm), mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína c-Fos representativa de um rato dos grupos: Fh (fictício hidratado), FPHRP (fictício submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas), Lh (lesão bilateral do NCEA hidratado e LPHRP (lesão bilateral do NCEA submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas).

#### **4.7.6. Núcleo Parabraquial (NPB)**

As contagens do núcleo parabraquial – lateral e medial foram contadas do lado esquerdo e direito dos cortes, separadamente, e apresentadas como total da somatória dos lados.

##### ***Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL)***

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh apresentou em média  $0,5 \pm 0,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo FPHRP aumentou 14 vezes a expressão c-Fos ( $8,7 \pm 3,1$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Fh [ $F(23,69) = 30,19, p < 0,05$ ].

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $0,03 \pm 0,03$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo LPHRP aumentou 12 vezes a expressão c-Fos ( $10,5 \pm 1,6$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh [ $F(23,69) = 30,19, p < 0,05$ ].

Comparando-se os grupos Fh com Lh e FPHRP com LPHRP não foram encontradas diferenças, portanto no núcleo parabraquial lateral o aumento da expressão c-Fos é resultado da condição de desidratação do modelo PH36hRP e não foi influenciado pela lesão bilateral do NCeA. Figuras 35 e 36.

### ***Núcleo Parabraquial Medial (NPBM)***

Nos animais com lesão fictícia, o grupo Fh (média  $1,0 \pm 0,6$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) e o grupo F<sub>PHRP</sub> ( $3,9 \pm 1,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>), não apresentaram diferenças quando comparados entre si.

Nos animais com lesão bilateral do NCeA, o grupo Lh apresentou em média  $0,6 \pm 0,2$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. O grupo L<sub>PHRP</sub> aumentou 16 vezes a expressão c-Fos ( $10,2 \pm 3,5$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>) comparado ao grupo Lh [ $F(23,69) = 11,18, p < 0,05$ ].

Comparando-se os grupos fictício e lesão bilateral do NCeA submetidos a privação hídrica por 36 horas e reidratação parcial, o grupo L<sub>PHRP</sub> apresentou em média  $10,2 \pm 3,5$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>, duplicando a expressão c-Fos comparado ao grupo fictício (F<sub>PHRP</sub>) submetido ao modelo PH36hRP que apresentou em média  $3,9 \pm 1,3$  células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup>. [ $F(23,29) = 2,45, p < 0,05$ ].

No núcleo parabraquial medial (NPBM), a expressão da proteína c-Fos aumentou em ratos com lesão bilateral do NCeA após serem submetidos ao modelo PH36hRP. Figuras 35 e 36.

## NÚCLEO PARABRAQUIAL (NPB)

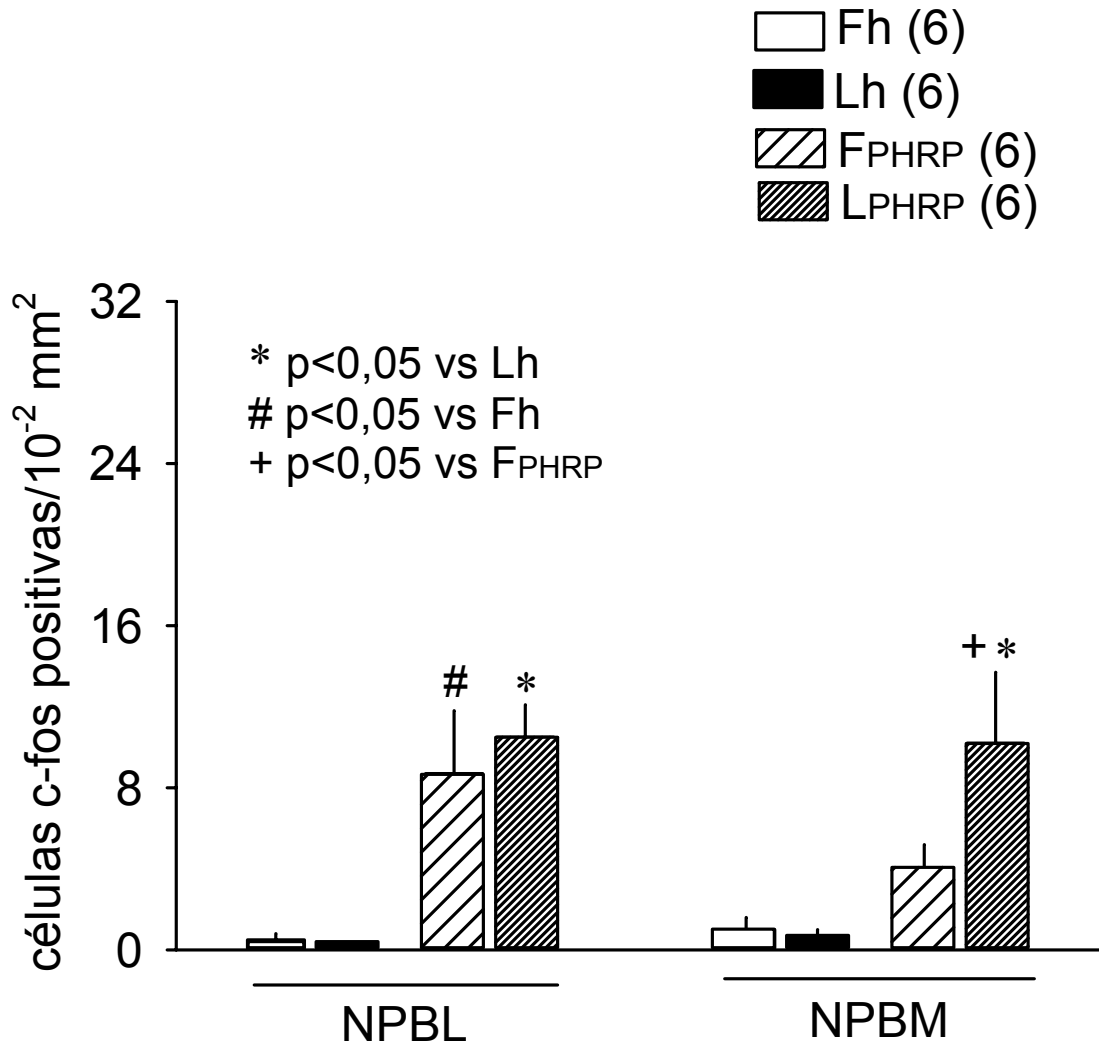


FIGURA 35 – Células c-Fos positivas /  $10^{-2}$  mm<sup>2</sup> no núcleo parabraquial lateral (NPBL) e núcleo parabraquial medial (NPBM) de ratos com lesão fictícia hidratados (Fh), lesão bilateral do NCeA hidratados (Lh), lesão fictícia submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (FPHRP) e lesão bilateral do NCeA submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas (LPHRP). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e o número de animais está demonstrado entre parênteses.

## NÚCLEO PARABRAQUIAL (NPB)

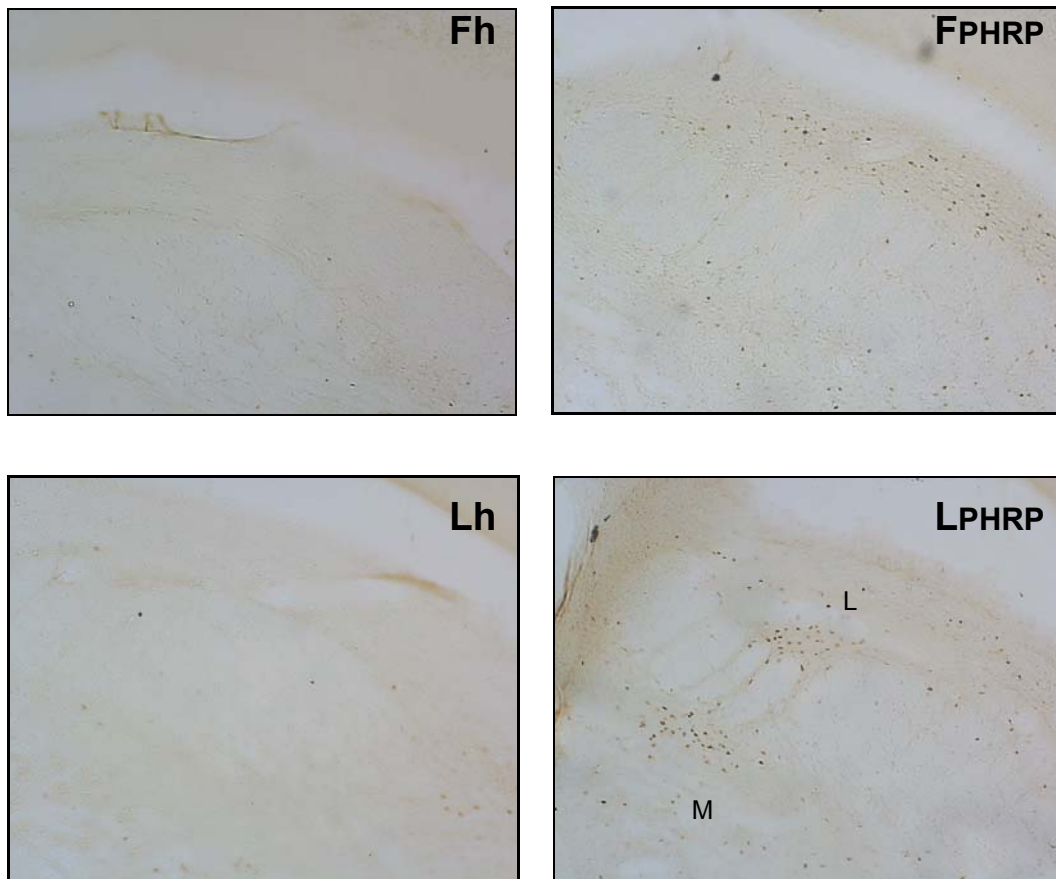


FIGURA 36 – Fotomicrografias (aumento de 10 x) de secções coronais de um dos lados do núcleo parabraquial NPB (L = lateral e M = medial) mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína c-Fos representativa de um rato dos grupos: Fh (fictício hidratado), FPHRP (fictício submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas), Lh (lesão bilateral do NCeA hidratado e LPHRP (lesão bilateral do NCeA submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial com água por 2 horas).

## **5. DISCUSSÃO**

### ***5.1. Ingestão diária de NaCl 1,8% e água***

Lesões eletrolíticas bilaterais ou unilaterais do NCeA reduziram persistentemente a ingestão diária de NaCl 1,8% e transitoriamente a ingestão diária de água, conforme esperado (GALAVERNA e cols., 1992; SEELEY e cols., 1993). Além disso, a lesão unilateral do NCeA foi suficiente para a redução da ingestão diária de NaCl 1,8%, reforçando a importância do NCeA no processamento de informações para o comportamento ingestivo, não regulatório de sódio.

### ***5.2. Efeito de lesões eletrolíticas do NCeA no apetite ao sódio induzido por privação hídrica***

Lesões eletrolíticas bilaterais ou unilaterais do NCeA não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% ou água no teste do apetite ao sódio após PH24hRP.

Animais intactos e aqueles com lesão fictícia, privados de água por 24 horas, ingeriram em torno de 3-4 ml de NaCl 1,8% em 2 horas; quantidades muito inferiores aos demonstrados por Sato e cols. (1996), onde ratos ingeriram em torno de 6-10 ml de NaCl 1,5% em 2 horas no teste do

apetite ao sódio após 24 horas de privação hídrica. Vimos então que, aumentando o período de privação para 36 horas, surgiu um pronunciado apetite ao sódio; talvez por isso não tenha sido observada redução na ingestão de sódio quando a privação hídrica foi de 24 horas. Nesse caso os animais lesados já estariam ingerindo o mínimo permitido pela lesão.

Assim, verificamos a influência de lesões eletrolíticas do NCeA aplicando o modelo PH36hRP. Lesões bilaterais e unilaterais do NCeA, em ratos submetidos a privação hídrica por 36 horas e reidratados parcialmente, reduziram a ingestão de NaCl 1,8% nos testes de apetite ao sódio: na primeira privação hídrica de 36 horas, a lesão bilateral do NCeA reduziu 51% e a lesão unilateral do NCeA reduziu 33% a ingestão de NaCl 1,8%, sem alterarem a ingestão de água e diante da segunda privação hídrica de 36 horas, nos mesmos animais, a lesão bilateral do NCeA reduziu 44% a ingestão de NaCl 1,8%, reduzindo a ingestão de água no período de reidratação e no teste do apetite ao sódio. Os efeitos da lesão permaneceram por pelo menos duas semanas, quando se fez primeiramente a segunda privação hídrica e a depleção de sódio com furosemida uma semana depois. A lesão bilateral do NCeA reduziu 25% a ingestão de NaCl 1,8% e reduziu pela metade a ingestão de água no teste do apetite ao sódio após 24 horas da depleção de sódio induzida por furosemida. É provável que a menor ingestão de sódio quando a privação foi de 24 horas seja devida a uma menor hipovolemia e, portanto, menor quantidade de angiotensina II,

facilitadora do apetite ao sódio, conforme sugerido pela determinação das proteínas totais no sangue.

A lesão eletrolítica bilateral do NCeA não influenciou os parâmetros sanguíneos no modelo PHRP, porém, analisando ratos com lesão fictícia ou lesão bilateral do NCeA reidratados parcialmente, verificamos que continuam com um grau de hipovolemia em torno de 6%, como na privação hídrica de 36 horas. A reidratação parcial corrige a osmolalidade, mas a correção da hipovolemia só se completa após a ingestão de NaCl (DE LUCA JR. e cols., 2002a). Enquanto isso não ocorre, animais submetidos à privação hídrica e reidratação parcial, permanecem hipovolêmicos e com persistente elevação de atividade de renina plasmática em relação a ratos hidratados ou privados de água (DE LUCA JR. e cols., 2002a).

No modelo PH36hRP, analisado neste trabalho, após a reidratação parcial, a hipovolemia residual foi de 6%, podendo gerar uma quantidade maior de angiotensina II e justificar o maior consumo de NaCl 1,8% após PH36hRP comparado a PH24hRP, onde a hipovolemia após 24 horas de privação hídrica foi menor e com a reidratação parcial, poderia estar corrigida, gerando menores quantidades de angiotensina II como sinal facilitatório para a indução do apetite ao sódio. O grau de hipovolemia presente diante da duração da privação hídrica poderia estar influenciando a demanda de ingestão do sódio para sua correção, dependente de angiotensina II, sendo mais acentuado no modelo PH36hRP.



No presente trabalho, lesões bilaterais do NCeA reduziram 50% a ingestão regulatória de sódio induzida por privação hídrica (modelo PH36hRP). A redução verificada foi menor do que aquelas observadas em outros protocolos de indução de apetite ao sódio, onde lesões bilaterais do NCeA abolem a ingestão de NaCl 3% na indução do apetite ao sódio por furosemida (GALAVERNA e cols., 1992) e reduzem em 70% a ingestão de NaCl 2% induzida por administração sistêmica de ioimbina ou furosemida (ZARDETTO-SMITH e cols., 1994). Não há uma explicação para essas diferenças porque as lesões produzidas no presente trabalho não são essencialmente diferentes daquelas produzidas nos demais.

Diante da depleção de sódio induzida por furosemida, ratos dos grupos de lesão fictícia e lesão unilateral ou bilateral do NCeA beberam três vezes mais NaCl 1,8% no teste do apetite ao sódio quando comparados ao teste do apetite ao sódio após privação hídrica de 36 horas. É possível que o efeito adicional da aldosterona na depleção de sódio induzida por furosemida, aliada às ações da angiotensina II, justifique o maior consumo de NaCl 1,8% verificado em todos os grupos de animais.

As concentrações séricas de glicose e triglicerídeos não foram diferentes na privação hídrica de 24 ou 36 horas, comparadas a controles hidratados. Resultados de trabalho anterior mostram que, no modelo de depleção de sódio induzida por furosemida, há hipovolemia de 4% e aumento da glicemia e trigliceridemia, que acompanham a volemia (VENDRAMINI, 1998). No modelo de privação hídrica há hipovolemia sem aumento na

glicemia e trigliceridemia. A lesão eletrolítica bilateral do NCEA não influenciou a glicemia e trigliceridemia em animais submetidos à privação hídrica de 36 horas.

### ***5.3. Incremento da ingestão de sódio após múltiplas privações hídricas***

Ratos intactos submetidos a quatro privações hídricas sucessivas de 36 horas apresentaram aumentos na ingestão de NaCl 1,8% já no segundo teste, seguido por aumentos no terceiro e quarto testes de apetite ao sódio, após privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial.

Privações hídricas de 36 horas aumentaram a ingestão regulatória de NaCl 1,8%, caracterizando o incremento, como dado inédito.

Trabalho anterior em nosso laboratório, utilizando o modelo PHRP, verificou incremento na ingestão diária de NaCl (não regulatória) na segunda privação hídrica de 24 horas, porém a ingestão regulatória não foi incrementada (PEREIRA e cols., 2002), fato demonstrado por este trabalho, utilizando o modelo PH36hRP em quatro privações hídricas sucessivas.

O incremento é uma propriedade do apetite ao sódio, seletiva para o sódio e não para a água após prévios episódios de desidratação extracelular, tanto na fase gestacional, pós-natal ou adulta, onde há aumentos na ingestão de sódio, devido a experiências prévias, num futuro episódio de desidratação. A angiotensina II, mineralo e glicocorticóides, que

interferem com a síntese de proteínas, parecem ter um efeito na organização dos circuitos neurais responsáveis por este comportamento de incrementar a ingestão de sódio após múltiplas depleções de sódio (FRANKMAN e cols., 1986; SAKAI e cols., 1987, 1989; EPSTEIN, 1991; GALAVERNA e cols., 1995; LESHEM e cols., 1999).

No modelo de desidratação extracelular, o incremento aparece, mesmo que enfraquecido em ratos com lesão bilateral do NCeA na terceira depleção de sódio induzida por furosemida, na ingestão de NaCl 3% e na ingestão diária em animais com lesão fictícia após a segunda depleção (GALAVERNA e cols., 1992).

Neste nosso trabalho, privações hídricas sucessivas de 36 horas incrementaram a ingestão de NaCl 1,8% já no segundo teste do apetite ao sódio em ratos intactos, porém em ratos submetidos à lesões eletrolíticas do NCeA não foi observado incremento na ingestão de NaCl 1,8% ou água comparando-se o primeiro e segundo testes de apetite ao sódio após privações hídricas de 36 horas.

Não foram verificados aumentos na ingestão diária de NaCl 1,8% no intervalo entre as privações hídricas.

Fica evidente que os danos do NCeA, que prejudicaram o comportamento ingestivo não regulatório e regulatório de sódio não foram revertidos no período compreendido entre a primeira e segunda privações hídricas de 36 horas.

#### **5.4. Efeito de lesões do NCeA na expressão da proteína c-Fos em áreas prosencefálicas e pontinas**

A expressão da proteína c-Fos, como marcador de atividade neuronal, obtida neste trabalho em ratos com lesão bilateral do NCeA, submetidos à privação hídrica de 36 horas e reidratados parcialmente com água, em estruturas da lâmina terminal (OVLT, MnPO e SFO) e SON, foram semelhantes aos dados da literatura, mostrando que a expressão c-Fos na lâmina terminal, induzida por privação hídrica, aparece parcialmente reduzida no OVLT e MnPO, e permanece alta no SFO após a reidratação parcial (DE LUCA Jr. e cols., 2002; JI e cols., 2005). Estes mesmos autores demonstraram que a privação hídrica ativa o sistema neurohipofisário, aumentando a expressão c-Fos no SON e PVN, núcleos que recebem projeções angiotensinérgicas da lâmina terminal e que, no modelo PHRP, a expressão desaparece no SON. Esta diminuição de expressão c-Fos no SON após reidratação parcial, pode ser estar relacionada a uma rápida inibição da vasopressina por ativação de aferentes orofaríngeos e correção da osmolalidade (HUANG e cols., 2000).

No modelo PHRP, a correção da osmolalidade contribuiu para a retirada de sinais inibitórios, tais como vasopressina e ocitocina (BLACKBURN e cols., 1993), para a ingestão de sódio e a angiotensina II continua presente como sinal facilitatório desta ingestão, uma vez que a atividade de renina plasmática permanece alta e a expressão de c-Fos

persiste em estruturas da lâmina terminal (DE LUCA e cols., 2002a e presentes resultados).

Em outro modelo de indução de ingestão de sódio e água, através da infusão i.c.v. de angiotensina II, a expressão c-Fos induzida no SON é influenciada pela viabilidade de água. Neste modelo animais mantidos sem água expressam c-Fos no OVLT, MnPO e SON e, quando mantidos com água disponível, a expressão c-Fos permanece no OVLT e MnPO e desaparece no SON (HERBERT e cols., 1992), semelhante ao que acontece no modelo PHRP (DE LUCA Jr. e cols., 2002a; JI e cols., 2005).

No presente trabalho, a lesão bilateral do NCeA, não influenciou a expressão da proteína c-Fos induzida pelo modelo PHRP em estruturas da lâmina terminal (OVLT, SFO e MnPO) e SON.

No núcleo paraventricular do hipotálamo, porção parvocelular (PVNp), a lesão bilateral do NCeA influenciou um aumento de duas vezes na expressão c-Fos em ratos submetidos a PH36hRP comparados com lesados hidratados (Figura 33).

Estudos de Morien e cols. (1999), demonstraram que, após 5 horas de privação hídrica, ratos apresentaram aumento da atividade de renina plasmática, hipovolemia e hiperosmolalidade e estas variações permanecem até 24 ou 48 horas de privação hídrica, e a expressão c-Fos aparece aumentada em áreas ocitocinérgicas como o SON e PVN, evidenciando a ocitocina como mediador da anorexia e sinal inibitório da ingestão de sódio na fase inicial da privação hídrica. Nesta fase os animais já

apresentaram hiperosmolalidade e o comportamento ingestivo de sódio contribuiria para maiores elevações desta condição. Na fase inicial da privação hídrica há aumento da expressão de c-Fos em áreas ocitocinérgicas como SON e PVN, além das estruturas da lâmina terminal como OVLT e MnPO, sendo que no SFO o aumento da expressão ocorre após 24 ou 48 horas da privação hídrica (VERBALIS e cols., 1993; MORIEN e cols., 1999).

No modelo PHRP, a reidratação parcial com água corrigiu a osmolalidade, isso explica o desaparecimento de c-Fos no SON e PVN, mas em animais com lesão bilateral do NCeA, submetidos a PH36hRP, a expressão da proteína c-Fos, aumentou especificamente na porção parvocelular do PVN, o que pode indicar que a ocitocina de origem central possa estar causando os efeitos inibitórios no apetite ao sódio apresentados por ratos com lesão do NCeA neste modelo. A distensão gástrica e mecanismos colecistocinérgicos constituem estímulos para a secreção de ocitocina (RENAUD e cols., 1987). Nos animais com lesão do NCeA submetidos ao modelo PHRP, não podemos descartar essa hipótese, uma vez que durante o período de reidratação parcial, em duas horas, o animal ingeriu de 20 a 25 ml de água, o que poderia distender o estômago e assim gerar sinais viscerais para a área postrema (AP), núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo parabraquial (NPB) e daí ativar vias inibitórias da ingestão de sódio que estariam facilitadas pela lesão do NCeA. A AP, NTS e NPB recebem sinais viscerais por aferências vagais, glossofaríngeas e gástricas, captadas por barorreceptores, osmossodiodiureceptores gástricos e hepáticos e

possuem eferências bidirecionais com o PVN, NCeA, SFO e MnPO, áreas envolvidas no apetite ao sódio e balanço hidroeletrólítico. O núcleo parabraquial, composto de neurônios que circundam o pedúnculo cerebelar na região pontina, recebe aferências do NTS medial e AP e fazem sinapses que se projetam para várias estruturas cerebrais prosencefálicas, mantendo conexões recíprocas com estruturas importantes para o controle do apetite ao sódio e da sede, como a estria terminal e neurônios dos núcleos medial e central da amígdala (ALHEID e cols., 1995; JOHNSON e cols., 1999; LUNDY & NORGREN, 2001). Resultados da ativação destas áreas em ratos saciados de sódio após diálise peritoneal, suportam a participação de neurônios ocitocinérgicos do PVN parvocelular na inibição de circuitos neuronais para a ingestão de sódio e da porção magnocelular do PVN, participando da excreção renal de sódio, verificados com dupla marcação de ocitocina e expressão c-Fos, sugerindo também que a ativação de neurônios não ocitocinérgicos, de SON e PVN devem envolver outros neuropeptídeos com o peptídeo natriurético atrial, a angiotensina II e vasopressina nas respostas comportamentais do apetite ao sódio (FRANCHINI & VIVAS, 1999). Em animais com lesão do NCeA, para confirmar se a ocitocina de origem central pode estar contribuindo para este efeito inibitório do apetite ao sódio no modelo PHRP, seriam necessários outros experimentos, por exemplo com o uso de peptídeos opióides, que favorecem o apetite ao sódio inibindo o sistema ocitocinérgico (BLACKBURN-MUNRO e cols., 2000; FRANCHINI e cols., 2003).

Apesar de possuírem conexões recíprocas, a lesão bilateral do NCeA não influenciou a expressão c-Fos no NPBL após privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial. Entretanto, no núcleo parabraquial medial (NPBm) o grupo com lesão do NCeA aumentou 16 vezes a expressão c-Fos quando submetido à privação hídrica de 36 horas e reidratação parcial, comparada ao grupo lesado que permaneceu hidratado e duplicou a expressão em relação à animais com lesão fictícia (Figura 35).

No modelo de privação hídrica e reidratação parcial, a osmolalidade foi corrigida, a hipovolemia persiste e a angiotensina II poderia estar ativando aferências do NTS, AP e DNR como sinal facilitatório angiotensinérgico para a ingestão sódio. O NTS projeta-se diretamente para o NCeA ou para o NPBL, removendo temporariamente vias inibitórias serotoninérgicas expressando o comportamento ingestivo de sódio (REIS e cols., 1994; MENANI e cols., 2000; FRANCHINI e VIVAS, 2002; DE LUCA Jr. e cols., 2003). O NCeA, danificado por lesões eletrolíticas, não integraria as conexões recíprocas com o NTS e NPBL, não sendo capaz de responder ao comportamento ingestivo de NaCl 1,8% neste modelo e reduzindo em 60% a ingestão diária e em 50% a ingestão de NaCl no teste do apetite ao sódio após PH36hRP.

Em suma, é possível que as alterações na quantidade de neurônios do PVNp e NPBM expressando a proteína c-Fos estejam relacionadas ao efeito da lesão do NCeA sobre o apetite ao sódio. Ainda que na Figura 33 não tenha havido diferença entre o grupo lesado e lesão fictícia,



é nítido que no primeiro é maior a expressão de c-Fos no PVNp após reidratação do que nos animais hidratados, enquanto que não houve diferença entre reidratados e hidratados no grupo de lesão fictícia. Esse resultado é coerente com a inibição da ingestão de sódio no teste do apetite ao sódio pois o PVNp é considerado uma fonte de ocitocina encefálica que participa de circuitos que inibem a ingestão de sódio (STRICKER & VERBALIS, 1990; VERBALIS e cols., 1995) O inequívoco aumento na expressão de c-fos no NPBM de animais lesados reidratados (Figura 35) também sugere que esse núcleo possa participar da inibição produzida pela lesão sobre o apetite ao sódio.

Alteração na expressão de c-Fos no NPBM não seria de certa maneira esperada nos animais lesados considerando que esse núcleo constitui um relé para as vias gustatórias (NORGREN, 1995) e que estudos comportamentais não detectaram alterações na reatividade gustatória ao sódio em animais com lesão do NCeA (GALAVERNA e cols., 1993; SEELEY e cols., 1993). Entretanto, é possível que justamente a conexão da via gustatória com as vias que controlam a parte motora e motivacional do apetite ao sódio é que estejam comprometidas sendo assim sinalizadas pelo aumento da atividade de neurônios no NPBM.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

Os resultados do presente estudo confirmam a importância do NCeA para o controle da ingestão de sódio. Mostramos que a lesão desse núcleo inibe o apetite ao sódio no modelo de privação hídrica-reidratação parcial, um modelo que envolve essencialmente a angiotensina II como fator facilitador, conforme seria previsto pela inibição que essa lesão causa sobre a ingestão de NaCl hipertônico induzido por angiotensina II (GALAVERNA e cols., 1992; DE LUCA e cols., 2002a). A integridade do NCeA é necessária para a expressão completa do apetite ao sódio no modelo PHRP em ratos.

A lesão bilateral do NCeA produziu alterações na expressão da proteína c-Fos em núcleos anteriores e pontinos, PVNp e NPBM, alterações estas que poderiam estar relacionadas aos efeitos inibitórios da lesão sobre o apetite ao sódio neste modelo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, D., HELLNER, K., WALTHER, T., VON-BOHLEN UND HALBACH, O. Angiotensin II and amygdala. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 985, p. 498-500, 2003.

ALHEID G, DE OLMOS J, BELTRAMINO C. Amygdala and extended amygdala. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System**, 2 ed., San Diego: Academic Press, 1995. p. 495-578.

ANTUNES-RODRIGUES, J., McCAN, S.M., SAMSON, W.K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. **Endocrinol.**, v. 118, p. 1726-1728, 1986.

ANTUNES-RODRIGUES, J., RAMALHO, M.J., REIS, L.C., MENANI, J.V., TURRIN, Q., GUTKOWSKA, J., McCANN, S.M. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 2956-2960, 1991.

AVRITH, D.B., FITZSIMONS, J.T. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. **J. Physiol.**, v. 301, p. 349-364, 1980.

AZUMA, S., YAMAMOTO, T., KAWAMURA, Y. Studies on gustatory responses of amygdaloid neurons in rats. **Exp. Brain. Res.**, v. 56, p. 12-22, 1984.

BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3 ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1985. v. 8, p. 444-449.

BLACKBURN, R.E., SAMSON, W.K., FULTON, R.J., STRICKER, E.M., VERBALIS, J.G. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 10380-10384, 1993.

BLACKBURN-MUNRO, G., BROWN, C.H., NEUMANN, I.D., LANDGRAF, R., RUSSELL, J.A. Verapamil prevents withdrawal excitation of oxytocin neurones in morphine-dependent rats. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1596-1607, 2000.

BOLLES, R.C. **Theory of motivation**. New York: Harper & Row, 1975.

BAIN, B.J., BATES, I. Basic haematological techniques. In: DACIE, S.J.V., LEWIS, B.J. (Eds.) **Practical Haematology**. 9 ed. London: Churchill Livingstone, 2001. p. 24.

BUGGY, J., JONKLAAS, J. Sodium appetite is decreased by angiotensin blockade. **Physiol. Behav.**, v. 32, p. 737-42, 1984.

- BUNEMANN, B., FUXE, K., GANTEN, D. The renin-angiotensin system in the brain: an update 1993. **Reg. Pept.**, v. 46, p. 487-509, 1993.
- CANNON, W.B. **The wisdom of the body**. New York: W.W. Norton, 1932.
- CARLSON, N.R. **Fisiologia do comportamento**. 1ª ed., São Paulo: Manole, 2002.
- COLOMBARI, D.S.A., MENANI, J.V., JOHNSON, A.K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. R1470-R1476, 1996
- COVIAN, M.R, ANTUNES-RODRIGUES, J. Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 205, p. 922-6, 1963.
- DE GOBBI, J.I.F., DE LUCA JR., L.A., MENANI, J.V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Res.**, v. 880, p. 131-138, 2000
- DE LUCA JR., L.A, GALAVERNA, O., SCHULKIN, J., YAO, S.-Z, EPSTEIN, A.N., The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 28, p. 73-87, 1992.

- DE LUCA Jr., L.A., BARBOSA, S.P., SUGAWARA, A.M., MENANI, J.V. Effects of intracerebroventricular injection of losartan or PD 123319 on arterial pressure and heart rate of sodium replete and sodium deplete rats. **Reg. Pept.**, v. 66, p. 31-5, 1996.
- DE LUCA JR., L.A., XU, Z., SCHOORLEMMER, G.H.M., THUNHORST, R.L., BELTZ, T.G. MENANI, J.V., JOHNSON, A.K. Brain immediate early gene expression, humoral and cardiovascular antecedents of water deprivation-induced salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 282, p. R552-R559, 2002a.
- DE LUCA Jr., L.A., SUGAWARA, A.M., PEREIRA, D.T.B., DAVID, R.B., MENANI, J.V. Interaction between brain L-type calcium channels and  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the inhibition of sodium appetite. **Brain Research**, v. 931, p. 1-4, 2002b.
- DE LUCA JR., L.A, BARBOSA, S.P., MENANI, J.V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neurosc.**, v. 121, p. 1055-1061, 2003.
- DENTON, D. **The hunger for salt: an antropological, physiological and medical analysis.** 2 ed. London: Springer-Verlag, 1984.
- DeOLMOS, J., ALHEID, G.F., BELATRIMINO, C.A. Amygdala. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The rat nervous system.** v. 1. Orlando: Academic Press, 1985. p. 223-334.

- EPSTEIN, A.N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Res Bull.** v. 27, p. 315-320, 1991.
- FALK, J.L. Water intake and NaCl appetite in sodium depletion. **Physiology Reports.**, v. 16, p. 315-325, 1965.
- FERRARIO, C.M. The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 15, suppl. 3, S1-S5, 1990.
- FITTS, D.A., MASSON, D.B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav. Neurosci.**, v. 103, p. 865-872, 1989.
- FITZSIMONS, J.T. Thirst. **Physiol. Rev.**, v. 52, p. 468-5611, 1972.
- FITZSIMONS J.T. Physiology and pathology of thirst and sodium appetite. In: SELDIN, D.W. & GIEBISCH, G. (Eds.) **The Kidney: Physiology and Pathophysiology**. New York: Raven Press, 1985. p. 885-901.
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 78:583-686, 1998.
- FOSSATI, P., PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produce hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v. 28, p. 2077-80, 1982.

FRANCHINI, L., VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 276, p. R1180-R1187, 1999.

FRANCHINI, L., JOHNSON, A.K., DE OLMOS, J., VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **Am. J. Physiol.**v. 282, p. R235-R243, 2002.

FRANCHINI, L., RUBINSTEIN, M., VIVAS, L. Reduced sodium appetite and increased oxytocin gene expression in mutant mice lacking beta-endorphin. **Neuroscience**, V. 121, P. 875-881, 2003.

FRANKMAN, S.P., DORSA, D.M., SAKAI, R.R., SIMPSON, J.B. A single experience with hyperoncotic colloid dialysis persistently alters water and sodium intake. In: **Physiology and thirst and sodium appetite**. CARO, G., EPSTEIN, A.N., MASSI, M. (Eds.). v. 105. New York: Plenum Press, 1986. p. 115-121.

FULWILER, C.E., SAPER, C.B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res. Rev.**, v. 7, p. 229-259, 1984

GALAVERNA, O.G., DE LUCA JR., L.A., SCHULKIN, J., YAO S-Z., EPSTEIN, A.N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central



nucleus of the amygdala in the rat. **Brain. Res. Bull.**, v. 28, p. 89-98, 1992.

GALAVERNA, O.G., SEELEY, R.J., BERRIDGE, K.C., GRILL, H.J., EPSTEIN, A.N., SCHULKIN, J. Lesions of the central nucleus of the amygdala I: effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. **Behav. Brain. Res.**, v. 59, p. 11-7, 1993.

GALAVERNA, O.G., NICOLAIDIS, S., YAO, S.Z., SAKAI, R.R., EPSTEIN, A.N. Endocrine consequences of prenatal sodium depletion prepare rats for high need-free NaCl intake in adulthood. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. R578-R583, 1995.

GENTIL, C.G., ANTUNES-RODRIGUES, J., NEGRO-VILAR, A., COVIAN, M.R. Role of amygdaloid complex in sodium chloride and water intake in the rat. **Physiol. Behav.**, v. 3, p. 981-5, 1968.

HANDAL, P.J. Formalin induced sodium appetite: dose-response relationships. **Psychonomic Science**, v. 3, p. 511-512, 1965.

HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de roedores**. 3 ed. São Paulo: Roca, 1993.

HERBERT, H., FORSLING, M.L., HOWES, S.R., STACEY, P.M., SHIERS, H.M. Regional expression of c-fos antigen in the basal forebrain following

intracerebrocentricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline. **Neurosc.**, v. 51, p. 867-882, 1992.

HOCHSTENBACH, S.L. CIRIELLO, J. Effect of lesions of forebrain circumventricular organs on c-fos expression in the central nervous system to plasma. **Brain Res.**, v. 713, p. 17-28, 1996.

HUANG, W., SVED, A.F., STRICKER, E.M. Water ingestion provides an early signal inhibiting osmotically stimulated vasopressin secretion in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, p. R756-R760, 2000.

HUGHES, P., DRAGUNOW, M., Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. **Pharmacol. Rev.**, v. 47, n.1, p. 133-178, 1995.

JALOWIEC, J.E., STRICKER, E.M. Restoration of body fluid balance following acute sodium deficiency in rats. **J. Comp. Physiol. Phys.**, Washington, v 70, p 94-102, 1970.

JALOWIEC, J.E. Sodium appetite induced by furosemide: effects of differential dietary maintenance. **Behav. Biol.**, v. 10, 313-25, 1974.

JEFFRIES, W.B., PETTINGER, W.A. Adrenergic signal transduction in the kidney. **Miner. Electrolyte Metab. Basel**, v. 15, p. 5-15, 1989.

- JI, L.L., FLEMING, T., PENNY, M.L., TONEY, G.M., CUNNINGHAM, J.T.  
Effects of water deprivation and rehydration on c-Fos and FosB staining  
in the rat supraoptic nucleus and lamina terminalis region. **Am. J.  
Physiol. Regul. Comp. Physiol.**, v. 288, p. R311-R321, 2005.
- JOHNSON, A.K., THUNHORST, R.L., The neuroendocrinology of thirst and  
salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central  
integration. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 18, p. 292-353, 1997
- JOHNSON, A.K., DE OLMOS, J., PASTUSKOVAS, C., ZARDETTO-SMITH,  
A., VIVAS, L. The extended amygdala and salt appetite. In: Annals of the  
New York Academy of Sciences, Vol. 887, pag. 258-280 of Part III:  
Organization and Functions of the Extended Amygdala: advancing from  
the ventral striatum to the extended amygdala, McGINTY, J.F. (Ed). New  
York, 1999.
- KLEINER, S.M. Water: an essential but overlooked nutrient. **J. Am. Diet.  
Assoc.**, v. 99, p. 200-6, 1999.
- LANÇA, A.J., van der KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the  
area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neurosc.**, v. 14, p.  
1117-1126, 1985.

- LEITE, A.S., PEREIRA, D.T.B., MENANI, J.V., DE LUCA Jr., L.A. Privação hídrica induz aumento seletivo na ingestão de sódio. Resumo 1.05.038 – XIX Reunião Anual da FeSBE, Águas de Lindóia, 2004.
- LESHEM, M. The ontogeny of salt hunger in the rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 649-659, 1999.
- LIND, R.W., SWANSON, L.W., GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. **Neuroendocrinol.**, v. 40, p. 2-24, 1985.
- LUKE, R.G. Natriuresis and chloruresis during hydropenia in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 224, p. 13-20, 1973.
- LUNDY, R.F., NORGRÉN, R. Pontine gustatory activity is altered by electrical stimulation in the central nucleus of the amygdala. **J. Neurophysiol.**, v. 85, p. 770-783, 2001.
- MAAS, A.H.R., KOFSTAD, J., SIGGARD-ANDERSEN, O. et al. Eds. Ionized calcium, sodium and potassium by ion selective electrodes. In: INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY WORKSHOP. **Proceedings of the first meeting of the European Working Group on ion - selective electrodes.** 1983. Oslo Copenhagen: Private Press, 1984.

- McKINLEY, M.J., DENTON, D.A., NELSON, J.F., WEISINGER, R.S. Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits and sheeps. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 245, p. R287-R292, 1983.
- McKINLEY, M.J., HARDS, D.K., OLDFIELD, B.J. Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. **Brain Res.**, v. 653, p. 305-314, 1994.
- McKINLEY, M.J., ALLEN, A.M., MAY, C.N., McALLEN, R.M., OLDFIELD, B.J., SLY, D, MENDELSON FA. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 28, p. 990-992, 2001a.
- McKINLEY, M.J., ALLEN, A.M., MATHAI, M.L., MAY, C., McALLEN, R.M., OLDFIELD, B.J., WEISINGER, R.S. Brain angiotensin and body fluid homeostasis. **Jap. J. Physiol.**, v. 51, n. 3, p. 281-289, 2001b.
- MENANI, J.V., JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. R1044-R1049, 1995.
- MENANI, J.V., THUNHORST, R.L., JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. R162-R168, 1996.

- MENANI, J.V., JOHNSON, A.K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 275, p. R1431-R1437, 1998a.
- MENANI, J.V., COLOMBARI, D.S.A., BELTZ, T.G., THUNHORST, R.L., JOHNSON, A.K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, v. 801, p. 29-35, 1998b.
- MENANI, J.V., DE LUCA Jr., L.A., THUNHORST, R.L., JOHNSON, A.K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. R126-R131, 2000.
- MENANI, J.V., BARBOSA, S.P., DE LUCA Jr., L.A., DE GOBBI, J.I.F., JOHNSON, A.K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 282, p. R837-R841, 2002.
- MENDELSON, F.A.O., QUIRION, R., SAAVEDRA, J.M., AGUILERA, G., CATT, K.J. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 1575-9, 1984.
- MITRUKA, B.M., RAMSLEY, H.M. **Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals.** 2 ed. New York: Masson Pub, 1977.

- MORIEN, A., GARRARD, L., ROWLAND, N.E. Expression of Fos immunoreactivity in rat brain during dehydration: effect of duration and timing of water deprivation. **Brain Res.** v. 816, p. 1-7, 1999.
- NORGREN, R. The central organization of the gustatory and visceral afferents systems in the nucleus of the solitary tract. In: KATSUKI, Y., NORNGREN, R., SATO, M. (Eds.) **Brain mechanism of sensation.** New York : Wiley, 1981. p. 143-160
- NORNGREN R. Gustatory system. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The rat nervous system**, 2 ed., San Diego: Academic Press, 1995. p. 751-771.
- OLDFIELD, B.J., MCKINLEY, M.J. Circunventricular organs. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The rat nervous system**, 2 ed., San Diego: Academic Press, 1995, p. 391-403.
- PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2 ed., New York: Academic Press, 1986.
- PEREIRA, D.T.B., DAVID, R.B., MENANI, J.V., DE LUCA Jr., L.A. Episodes of water deprivation enhance daily hypertonic NaCl intake in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 465-468, 2002.
- PHILLIPS, M.I. Functions of angiotensin in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 49, p. 413-31, 1987.

RAMSAY, D.J., THRASHER, T.N., BIE, P. Endocrine components of body fluid homeostasis. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 90, p. 777-780, 1988.

REIS, L.C., RAMALHO, M.J., FAVARETTO, A.L.V., ANTUNES-RODRIGUES, J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by water deprivation: effect of icv MK 212 administration. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 23, p. 135-138, 1990.

REIS, L.C., RAMALHO, M.J., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 12022-12026, 1994.

RENAUD, L.P., TANG, M., McCANN, M.J., STRICKER, E.M., VERBALIS, J.G. Cholecystokinin and gastric distension activate oxytocinergic cells in rat hypothalamus. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. R661-R665, 1987.

RICHTER, C.P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **Am. J. Physiol.**, v. 115, p. 155-161, 1936.

ROWLAND, N.E., FREGLY, M.J. Repletion of acute sodium deficit in rats drinking either low or high concentrations of sodium chloride solution. **Am. J. Physiol.**, v. 31, p. R419-5, 1992.



- SAAD, W.A., ANTUNES-RODRIGUES, J.A., GENTIL C.G., COVIAN, M.R. Interaction between hypothalamus, amygdala and septal area in the control of sodium chloride intake. **Physiol. Behav.**, v. 9, p. 629-36, 1972.
- SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., SILVA-NETTO, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J.A., COVIAN, M.R. The control of sodium chloride intake: functional relationship between hypothalamic inhibitory areas and amygdaloid complex stimulating areas. **Brain. Res. Bull.**, v. 6, p. 197-202, 1981.
- SAKAI, R.R., FINE, W.B., FRANKMANN, S.P., EPSTEIN, A.N., Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. **Behav. Neurosci.**, v. 101, p. 724-731, 1987.
- SAKAI, R.R., FRANKMAN, S.P., FINE, W.B., EPSTEIN, A.N. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake in the rat. **Behav. Neurosci.**, v. 103, p. 186-92, 1989.
- SATO, M.A., YADA, M.M., DE LUCA Jr., L.A. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiol. Behav.**, v. 60, p. 1099-104, 1996.
- SCHORLEMMER, G.H.M., EVERED, M.D. Water and solute balance in rats during 10 h water deprivation and rehydration. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p 379-86, 1993.

- SCHOORLEMMER, G.H.M., JOHNSON, A.K., THUNSHORT, R.L.  
Intravenous captopril blocks sodium appetite by sodium depletion but not by injection of ANG I in the brain. **Soc. Neurosc. Abstr.**, v. 23, P2, p. 1349, 1997.
- SCHULKIN J. **Sodium Hunger: the search for a salty taste**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- SEELEY, R.J., GALAVERNA, O.G., SCHULKIN, J., EPSTEIN, A.N., GRILL, H.J. Lesions of the central nucleus of the amygdala II: effects on intraoral NaCl intake. **Behav. Brain. Res.**, v. 59, p. 19-25, 1993.
- SHAPIRO, R.E., MISELIS, R.R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 234, p. 344-364, 1985.
- SIMPSON, J.B., ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: a dipsogenic site of action of angiotensin II. **Science**, v. 201, p. 379-381, 1978.
- SPECTOR, A.C., NORNGREN, R., GRILL, H.J. Parabrachial gustatory lesions impair taste aversion learning in rats. **Behav. Neurosc.**, v. 106, n. 1, p. 147-161, 1992.
- STRICKER, E.M., JALOWIEC, J.E. Restoration of intravascular fluid volume following acute hypovolemia in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 218, p. 191-6, 1970.

- STRICKER, E.M. Thirst and sodium appetite after colloid treatment in rats. **J. Comparative Physiological Psychology**, v. 95, p. 1-25, 1981.
- STRICKER, E.M., VERBALIS, J.G. Neurobiology of Food and Fluid Intake. IN: STRICKER, E.M. (Ed.). **Handbook of Behavioral Neurobiology**, New York: Plenum, 1990. Chapter 10, p. 387-419,
- STRICKER, E.M., GANNON, K.S., SMITH, J.C. Thirst and salt appetite induced by hypovolemia in rats: analysis of drinking behavior. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 27-37, 1992.
- TAKAMATA, A., MACK, G.W., GILLEN, C.M., NADEL, E.R. Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. R1493-R1502, 1994.
- THUNHORST, R.L., EHRLICH, K.J., SIMPSON, J.B. Subfornical organ participates in salt appetite. **Behav. Neurosci.**, v. 104, p. 637-642, 1990.
- THUNHORST, R.L., JOHNSON, A.K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. R458-R465, 1994.
- THUNHORST, R.L., XU, Z., CICHA, M. Z., ZARDETTO-SMITH, A.M., JOHNSON, A.K. Fos Expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. R1807-R1814, 1998.

- TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non carcinogenic chromogen. **J. Clin. Pathol.**, v. 22, p. 158-61, 1969.
- VEENING, J.G., SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: A combined retrograde transport-immunohistochemical study. **Brain. Res.**, v. 303, p. 337-57, 1984.
- VENDRAMINI, R.C. Respostas metabólicas à depleção de sódio induzida por furosemida em ratos. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – USP, dezembro de 1998.
- VERBALIS, J.G., BLACKBURN, R.E., OLSON, B.R., STRICKER, E.M. Central oxytocin inhibition of food and salt ingestion: a mechanism for intake regulation of solute homeostasis. **Regulatory Peptides**, v. 45, p. 149-154, 1993.
- VERBALIS, J.G., BLACKBURN, R.E., HOFFMAN, G.E., STRICKER, E.M. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 395, p. 209-225, 1995.

- VIVAS, L., PASTUSKOVAS, C.V., TONELLI, L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.**, v. 679, p. 34-41, 1995.
- WEISINGER, R.S., DENTON, D.A., MCKINLEY, M.J., NELSON, J.F. Dehydration-induced sodium appetite in rats. **Physiol. Behav.**, v. 34, p. 45-50, 1985.
- WEISINGER, R.S., DENTON, D.A., DI NICOLANTONIO, R., HARDS, D.K., MCKINLEY, M.J., OLDFIELD, B., OSBORNE, P.G. Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. **Brain Res.**, v. 526, p. 23-30, 1990.
- WRIGHT, J.W., HARDING, J.W. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavior responses. **Brain Res. Bull.**, v. 17, p. 227-50, 1992.
- XU, Z., HERBERT, J. Regional suppression by water intake of c-fos expression induced by intraventricular infusions of angiotensin II. **Brain Res.**, v. 659, n. 1-2, p. 157-68, 1994. (Erratum in: **Brain Res.**, v. 667, n. 2, p. 301-2, 1994).
- ZARDETTO-SMITH, A.M., BELTZ, T.G., JOHNSON, A.K. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in

experimentally-induced salt appetite. **Brain. Res.**, v. 654, p. 123-134, 1994.

ZIMMERMAN, B.G. Adrenergic facilitation by angiotensin: does it serve a physiological function. **Clin. Sci.**, v. 60, p. 343-8, 1981.

ZIMMERMAN, B.G., SYBERT, E.G., WONG, P.C. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin systems. **J. Hypertens.**, v. 2, p. 581-8, 1984.