

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

**"Efeitos da injeção central de moxonidina
no controle da ingestão de sódio
e regulação cardiovascular"**

Lisandra Brandino de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia.

São Carlos
2003

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

**"Efeitos da injeção central de moxonidina
no controle da ingestão de sódio
e regulação cardiovascular"**

Lisandra Brandino de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

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

O48ei

Oliveira, Lisandra Brandino de.

Efeitos da injeção de moxonidina no controle da ingestão de sódio e regulação cardiovascular / Lisandra Brandino de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2003.

138 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Neurofisiologia. 2. Equilíbrio hidro-eletrolítico (fisiologia). 3. Pressão arterial-regulação. 4. Receptores adrenérgicos cl2. 5. Imunohistoquímica. I. Título.

CDD: 612.8 (20^a)

*“Bem longe, lá na luz do sol,
estão minhas mais altas aspirações.
Talvez eu não as alcance,
mas posso olhar para cima e ver sua beleza,
acreditar nelas e tentar seguir para onde apontam.”*

Louisa May Alcott

Aos pais

OSVALDO E ANTONIA

E em memória de minha querida irmã

FABIANA

“A glória da amizade não é a mão estendida nem o sorriso bondoso nem a alegria do companheirismo. É a inspiração que vem a alguém quando descobre que outra pessoa acredita nele e está disposta a confiar nele.”

Ralph Waldo Emerson

**A VOCÊS, AGRADEÇO POR TODO CARINHO, AMOR,
DEDICAÇÃO E PRINCIPALMENTE PELA AMIZADE
INCONDICIONAL.**

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani, pela sua orientação e dedicação na realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Unesp - Araraquara e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas expresso meu respeito e gratidão.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório, aos estagiários, e em especial aos funcionários, Silas, Ana, Reginaldo, Sílvia, Silvana e D. Ofélia.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, Selma e Solange, obrigada pela atenção.

Aos órgãos de fomento *FAPESP*, *CAPES* e *CNPq* por tornarem possível a realização deste trabalho. Especialmente agradeço à *FAPESP*, pela concessão da bolsa.

Índice de abreviaturas e símbolos

4° V = quarto ventrículo

Amg = complexo amigdalóide

ANG = angiotensina

ANG I = angiotensina I

ANG II = angiotensina II

ANP = peptídeo natriurético atrial

AP = área postrema

ASL = área septal lateral

ASLcont = área septal lateral contralateral

ASLips = área septal lateral ipsilateral

ASM = área septal média

AV3V = região anteroventral do terceiro ventrículo

BRVL = bulbo rostroventrolateral

CDS = clonidine displacing substance (substância que promove o desligamento da clonidina)

DAB = diaminobenzidina

DOCA = acetato de desoxicorticosterona

ECA = enzima conversora de angiotensina

FC = frequência cardíaca

g = grama(s)

HL = hipotálamo lateral

h = hora(s)

icv = intracerebroventricular

IEGs = immediate early genes (genes de expressão imediata)

ip = intraperitoneal

iv = intravenosa

kg = quilograma

LC = locus coeruleus

M = molaridade

min = minutos

mg = miligrama(s)

mm = milímetro(s)

ml = mililitro(s)

MOXO = moxonidina

NA = núcleo ambiguos

NaCl = cloreto de sódio

NBA = núcleo basal da amígdala

NBLA = núcleo basolateral da amígdala

NCA = núcleo central da amígdala

NPB = núcleo parabraquial

NPBL = núcleo parabraquial lateral

NPM = núcleo preóptico mediano

NPMd = núcleo preóptico mediano dorsal

NPMv = núcleo preóptico mediano ventral

NPV = núcleo paraventricular

NSH = núcleo septo-hipotalâmico

NSO = núcleo supraóptico

NTS = núcleo do trato solitário

NTSm = porção medial do núcleo do trato solitário

OCVs = órgãos circunventriculares

OSF = órgão subfornical

OVLT = órgão vasculoso da lamina terminal

PAM = pressão arterial média

RX = RX 821002

sc = subcutâneo

SKF = SKF 86466

SNC = sistema nervoso central

VL = ventrículo lateral

α = alfa

μg = micrograma(s)

μl = microlitro(s)

μm = micrometro(s)

\pm = mais ou menos

% = por cento

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	39
MÉTODOS	40
1. Animais	40
2. Cirurgia cerebral	40
3. Injeção das drogas no cérebro	41
4. Drogas injetadas	41
5. Medida da ingestão de água e de NaCl	41
6. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca	42
7. Determinação da expressão de c-fos	42
8. Histologia cerebral	43
9. Apresentação dos resultados e análise estatística	44
PROCOLOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS	45
RESULTADOS	50
1. Análise histológica	50

2. Efeitos da injeção de moxonidina no VL e 4º V sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	51
3. Efeitos de injeções unilaterais e bilaterais de moxonidina no complexo amigdalóide sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	55
4. Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no núcleo central da amígdala sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	58
5. Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no núcleo basal da amígdala sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	60
6. Efeitos da injeção de moxonidina no HL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	62
7. Efeitos da associação de ioimbina e moxonidina injetadas no VL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	64
8. Efeitos da associação de RX 821002 (RX) e moxonidina injetados no VL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	67
9. Efeitos da associação de SKF 86466 (SKF) e moxonidina injetados no VL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio	70
10. Efeitos da injeção de moxonidina no VL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados	73
11. Efeitos da associação de ioimbina e moxonidina injetadas no VL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II no VL em ratos acordados	78
12. Efeitos da injeção de moxonidina no 4º V sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados	80
13. Efeitos da injeção de moxonidina no HL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados	83
14. Expressão de c-fos após administração de moxonidina no VL em ratos normalmente hidratados e saciados	86

15. Expressão de c-fos após associação de moxonidina e ANG II injetadas no VL	89
16. Estudo da expressão de c-fos após administração de moxonidina no VL em ratos depletados de sódio	93
DISCUSSÃO	96
Efeitos de injeções centrais de moxonidina na ingestão de NaCl	95
a) Ventrículo lateral e 4º ventrículo	95
b) Complexo amigdalóide, núcleo central da amígdala e núcleo basal da amígdala	96
c) Hipotálamo lateral	99
d) Envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 no controle da ingestão de sódio	100
Efeitos da injeção central de moxonidina na resposta pressora produzida pela ativação angiotensinérgica e colinérgica central	103
a) Efeito da injeção de moxonidina no VL sobre a resposta pressora produzida pela ANG II e carbacol	104
b) Efeito da injeção de moxonidina no 4º V sobre a resposta pressora produzida pela ANG II e carbacol	105
c) Efeito da injeção de moxonidina no HL sobre a resposta pressora produzida pela ANG II e carbacol	106
Efeitos da moxonidina injetada centralmente na expressão da proteína c-fos em diferentes tratamentos	107
SUMÁRIO	112
CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

RESUMO

Em situações em que a água e/ou sódio estão em falta no organismo, receptores localizados em diversas partes do organismo ou hormônios produzidos sinalizam para algumas regiões específicas do cérebro, que uma vez ativadas, desencadeiam respostas renais e/ou o comportamento de busca pela água e sódio. Entre essas áreas destacam-se: o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), o órgão subfornical (OSF), a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), o hipotálamo, a amígdala, a área septal (AS), o núcleo do trato solitário (NTS), a área postrema (AP) e o núcleo parabraquial lateral (NPBL). Além de participarem do controle do equilíbrio hidroeletrólítico, essas áreas também estão envolvidas com o controle cardiovascular.

A angiotensina II (ANG II) é um peptídeo que ativa a ingestão de água e de sódio, além de participar da regulação cardiovascular. Outros neurotransmissores podem inibir a ingestão de água e sódio, como serotonina, colecistocinina e peptídeo natriurético atrial. Um mecanismo inibitório da ingestão de água e de sódio também muito estudado está relacionado com receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos centrais. A moxonidina, assim como a clonidina, agonistas de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, são drogas anti-hipertensivas que administradas centralmente reduzem a ingestão de água e de sódio induzida por diferentes protocolos (privação hídrica, depleção de sódio de 24 h, administração de ANG II). Portanto, foram objetivos deste trabalho:

a) estudar os efeitos da injeção de moxonidina nos ventrículos cerebrais (ventrículo lateral – VL e 4º ventrículo – 4º V), no complexo amigdalóide, no núcleo central da amígdala (NCA), no núcleo basal da amígdala (NBA) e no hipotálamo lateral (HL) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio (tratamento com o diurético furosemide + dieta deficiente de sódio por 24 h);

b) verificar os efeitos da moxonidina injetada no VL, 4º V e HL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL;

c) investigar o papel dos receptores adrenérgicos α_2 nos efeitos da moxonidina injetada no VL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 h

de depleção de sódio e respostas pressoras produzidas pela ANG II injetada centralmente;

d) analisar a ativação de áreas prosencefálicas após a administração de moxonidina no VL em ratos normovolêmicos, depletados de sódio ou tratados com ANG II centralmente com a utilização da marcação por imuno-histoquímica da proteína c-fos.

Para tanto, foram utilizados ratos com cânulas de aço inoxidável implantadas nos ventrículos cerebrais: VL (volume de injeção de 1 a 3 μ l) e 4^o V (volume de injeção 1 μ l); unilateralmente no HL (volume de injeção 0,5 μ l); e bilateralmente no complexo amigdalóide (volume de injeção de 1 μ l), NCA (volume de injeção de 0,2 - 0,4 μ l) e NBA (volume de injeção de 0,2 - 0,4 μ l).

A injeção de moxonidina (20 nmol) no VL promoveu a redução da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio durante todo o experimento, enquanto que moxonidina injetada no 4^o V reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M apenas nos 60 min de experimento. Injeções bilaterais de moxonidina no complexo amigdalóide (5, 10 e 20 nmol/1 μ l) e no NBA (20 nmol/0,4 μ l) reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M, enquanto que injeções bilaterais dessa droga no NCA não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M no protocolo utilizado. Moxonidina (20 nmol/0,5 μ l) injetada unilateralmente no HL não afetou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio. Esses resultados mostram que a inibição da ingestão de NaCl hipertônico decorre da ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos produzida pela injeção de moxonidina no VL, 4^o V e complexo amigdalóide (em especial no NBA), mas não no HL e NCA.

Para se aprofundar no estudo do papel dos receptores adrenérgicos α_2 no efeito inibitório da moxonidina na ingestão de NaCl 0,3 M foram utilizados diferentes antagonistas específicos de receptores adrenérgicos α_2 , como o RX 821002, ioimbina e SKF 86466 em associação com a moxonidina. Os resultados mostraram que a injeção icv de RX 821002 (40 e 80 nmol) e SKF 86466 (640 nmol) aboliram o efeito inibitório da moxonidina (20 nmol) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M durante todo o período experimental, enquanto, a ioimbina (320 nmol) aboliu o efeito antinatriorexigênico da moxonidina apenas nos períodos finais do experimento (60 e 120 min). Esses dados demonstram o

envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 centrais no papel inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio. Além disso, foi observado um aumento da ingestão de NaCl 0,3 M após o tratamento apenas com os antagonistas RX 821002 (40 nmol) e ioimbina (320 nmol), sugerindo um possível papel tônico dos receptores adrenérgicos α_2 centrais no controle da ingestão de NaCl hipertônico.

Apenas a administração de moxonidina (respectivamente, 20 e 80 nmol) no HL e VL não promoveu alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC). Por outro lado, quando administrada no 4º V, a moxonidina (20 nmol) promoveu hipotensão e bradicardia. A administração de moxonidina no VL na dose de 80 nmol reduziu as respostas pressoras produzidas pela injeção central de ANG II (50 ng) e de carbacol (4 nmol). Moxonidina (20 nmol) injetada no HL e no 4º V reduziu as respostas pressoras produzidas pela injeção central de ANG II, mas não as do carbacol. Assim, demonstrou-se que a injeção central de moxonidina inibe respostas pressoras produzidas pela ativação angiotensinérgica (principalmente) e colinérgica (em menor grau). A administração de ioimbina (320 nmol) no VL aboliu o efeito inibitório da moxonidina (80 nmol) no VL sobre a resposta pressora à ANG II icv, sugerindo que a moxonidina atuaria em receptores adrenérgicos α_2 centrais inibindo a resposta pressora à ANG II.

Em animais normovolêmicos e saciados, a injeção de moxonidina no VL promoveu a expressão da proteína c-fos nas seguintes áreas: OVLT, área septal lateral ipsilateral (ASLips), núcleo preóptico mediano ventral (NPMv), núcleo paraventricular (NPV) e núcleo supraóptico (NSO), que são estruturas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular.

O tratamento com ANG II (50 ng) icv aumentou a expressão de c-fos nas seguintes áreas: ASLips, núcleo preóptico mediano dorsal (NPMd), NPV e núcleo septo-hipotalâmico (NSH) e reduziu a expressão de c-fos na ASLcont (área septal lateral contralateral). O tratamento prévio com moxonidina não alterou a expressão de c-fos produzida pela ANG II central. Como os dois tratamentos isoladamente aumentam a expressão de c-fos em áreas cerebrais semelhantes, é difícil saber qual tratamento é o responsável pela expressão de c-fos após a combinação dos dois tratamentos. Talvez, a moxonidina esteja

inibindo a expressão de c-fos desencadeada pela ANG II e a expressão de c-fos que se observa após os dois tratamentos seja efeito apenas da moxonidina.

Em animais depletados de sódio, verificou-se que houve aumento da marcação para c-fos no NPMd e na ASLips e redução no OVLT após a injeção de moxonidina, sugerindo que modificação na atividade dessas áreas possa estar relacionada ao efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.

Em resumo, os resultados mostraram que:

- a) injeção de moxonidina no VL, 4° V, complexo amigdalóide e NBA, mas não no HL e NCA, inibe a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo protocolo de depleção de sódio;
- b) RX 821002, ioimbina e SKF 86466, antagonistas específicos de receptores adrenérgicos α_2 , aboliram o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, sugerindo que este efeito inibitório da moxonidina seria mediado pelos receptores adrenérgicos α_2 centrais. RX 821002 (40 nmol) e ioimbina (320 nmol) aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio, sugerindo um possível papel tônico dos receptores adrenérgicos α_2 centrais na inibição da ingestão de NaCl;
- c) moxonidina injetada no VL, 4° V e HL reduziu as respostas pressoras decorrente da ativação angiotensinérgica central, enquanto que somente a dose de 80 nmol de moxonidina injetada no VL foi capaz de reduzir o efeito pressor do carbacol (4 nmol), mostrando que a injeção central de moxonidina é capaz de inibir principalmente a resposta pressora da ANG II (50 ng) e em menor grau, o efeito pressor do carbacol. A redução do efeito pressor da ANG II promovido pela injeção de moxonidina (80 nmol) no VL foi abolido pela injeção icv de ioimbina (320 nmol), sugerindo uma participação dos receptores adrenérgicos α_2 centrais no efeito inibitório da moxonidina sobre a resposta pressora produzida pela ativação angiotensinérgica;
- d) em ratos normovolêmicos e saciados, a injeção de moxonidina (20 nmol) no VL promoveu expressão da proteína c-fos em várias áreas cerebrais: OVLT, ASLips, NPMv, NPV e NSO. A injeção de ANG II (50 ng) no VL aumentou a expressão de c-fos na ASLips, NPMd, NPV e NSH e reduziu na ASLcont. A

injeção icv de moxonidina não alterou a expressão de c-fos produzida pela associação veículo + ANG II.

e) em animais depletados de sódio, a injeção icv de moxonidina (20 nmol) aumentou a marcação para a proteína c-fos na ASLips e NPMd e reduziu no OVLT, sugerindo que modificação na atividade dessas áreas possa ser responsável pelo efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.

ABSTRACT

Deficit of water and sodium in the body is detected by receptors located in different parts of the body. These receptors or hormones signalize to specific areas in the brain that control renal responses and water and sodium intake. Among these areas are: organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), subfornical organ (SFO), anteroventral third ventricle (AV3V) region, hypothalamus, amygdala, septal area (SA), nucleus of the solitary tract (NTS), area postrema (AP) and lateral parabrachial nucleus (LPBN). Besides the regulation of fluid and electrolytic balance, these areas are also involved in cardiovascular control.

Angiotensin II (ANG II) is a peptide that induces water and sodium ingestion and participates in cardiovascular regulation. Other neurotransmitters, like serotonin, cholecystokinin and atrial natriuretic peptide, can inhibit water and sodium intake. Another important inhibitory mechanism for water and sodium intake is related to central α_2 -adrenergic/imidazoline receptors. Central injection of the anti-hypertensive drugs, moxonidine and clonidine (α_2 -adrenergic/imidazoline receptor agonists), reduces water and sodium intake in different protocols (water dehydration, 24 h sodium depletion and administration of ANG II). So, the goals of this study were:

a) to study the effects of moxonidine injected into the cerebral ventricles (lateral ventricle - LV and 4th ventricle - 4th V), amygdaloid complex, central nucleus of amygdala (CNA), basal nucleus of amygdala (BNA) and lateral hypothalamus (LH) on 0.3 M NaCl intake induced by sodium depletion (treatment combining subcutaneous injection of furosemide + sodium deficient food for 24 h);

b) to test the effects of moxonidine injected into LV, 4th V and LH on the pressor response produced by the injection of ANG II and carbachol (cholinergic agonist) into the LV;

c) to investigate the participation of α_2 -adrenergic receptors on the effects of moxonidine, injected into LV, on sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake and ANG II-induced pressor response;

d) using immunohistochemical technique, to detect c-fos protein in forebrain areas after moxonidine injection into LV in normovolemic rats, sodium depleted rats or rats that were treated with central injection of ANG II.

Male Holtzman rats with a stainless steel guide-cannulas implanted into the cerebral ventricles: LV (volume of injection: 1-3 μ l) and 4th V (volume of injection: 1 μ l); unilaterally into LH (volume of injection: 0.5 μ l) and bilaterally into the amygdaloid complex (volume of injection: 1 μ l), CNA (volume of injection: 0.2-0.4 μ l) and BNA (volume of injection: 0.2-0.4 μ l) were used.

Moxonidine (20 nmol) injected into LV reduced sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake during all the period of the experiment (120 min), while moxonidine injected into 4th V, reduced 0.3 M NaCl intake only in the first 60 min. Bilateral injections of moxonidine (5, 10 and 20 nmol/1 μ l) into amygdaloid complex and BNA (20 nmol/0.4 μ l), but not into CNA, reduced sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake. Unilateral injection of moxonidine into LH did not change sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake. These results show that the activation of α_2 -adrenergic/imidazoline receptors produced by the injection of moxonidine into LV, 4th V and amygdaloid complex (especially into the BNA), but not into LH and CNA, reduce hypertonic NaCl intake.

To investigate the role of the α_2 -adrenergic receptors on the inhibitory effect of moxonidine on 0.3 M NaCl intake, specific α_2 -adrenergic receptor antagonists, such as RX 821002, yohimbine and SKF 86466, were combined with moxonidine. The results show that icv injection of RX 821002 (40 and 80 nmol) and SKF 86466 (640 nmol) abolished the inhibitory effect of moxonidine (20 nmol) on 0.3 M NaCl intake during all the period of the experiment, while yohimbine (320 nmol) abolished the antinatriorexigenic effect of moxonidine only in the last hour of the experiment (60 to 120 min). These results suggest the involvement of central α_2 -adrenergic receptors on the inhibitory effect of moxonidine on sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake. Besides, we observed an increase on sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake following the treatment with RX 821002 (40 nmol) and yohimbine (320 nmol) alone, that suggests a possible tonic function to the central α_2 -adrenergic receptors on the control of hypertonic NaCl intake.

The injection of moxonidine alone (respectively, 20 and 80 nmol) into LH and VL did not change mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR), while moxonidine administered into 4th V produced hypotension and bradycardia. The 80 nmol dose of moxonidine injected into LV reduced the pressor response produced by central injections of ANG II (50 ng) and carbachol (4 nmol). Moxonidine (20 nmol) injected into LH and 4th V reduced the ANG II-induced pressor response, but not carbachol-induced pressor response. So, it was demonstrated that central injection of moxonidine reduces the pressor responses produced by angiotensinergic (mainly) and cholinergic activation (in a minor degree). The injection of yohimbine (320 nmol) into the LV abolished the inhibitory effect of moxonidine (80 nmol), also injected into LV, on the pressor response produced by icv injection of ANG II, suggesting that moxonidine acting through central α_2 -adrenergic receptors inhibits ANG II-induced pressor response.

The injection of moxonidine into LV in normovolemic and satiated rats induced the expression of c-fos protein in the following areas: OVLT, ipsilateral lateral septal area (ipsLSA), ventral median preoptic nucleus (vMPN), paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON). These areas are involved in the fluid and electrolytic balance and cardiovascular regulation.

ANG II injected into LV produced c-fos expression in the following areas: ipsLSA, dorsal median preoptic nucleus (dMPN), PVN and SHN and reduced c-fos expression in contLSA (contra lateral lateral septal area). Previous injection of moxonidine did not change the c-fos protein expression induced by central injection of ANG II. Separated treatments with moxonidine and ANG II produce c-fos expression in similar areas, so it is difficult to know which treatment is responsible to c-fos protein expression observed after the combination of the two treatments. Maybe, moxonidine could be inhibiting the c-fos expression induced by ANG II and the c-fos expression noted after the combined treatment could be produced only by moxonidine.

In sodium depleted rats, icv injection of moxonidine induced an increase on c-fos expression in ipsLSA and dMPN, and a decrease in OVLT, suggesting that changes in the activity of these areas could be responsible to the inhibitory effect of moxonidine on 0.3 M NaCl intake.

In summary, the results showed:

- a) moxonidine injected into LV, 4th V, amygdaloid complex and BNA, but not into LH and CNA, inhibits sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake;
- b) RX 821002, yohimbine and SKF 86466 (specific α_2 -adrenergic receptor antagonists) abolished the inhibitory effect of moxonidine on 0.3 M NaCl intake, suggesting that the inhibitory effect of moxonidine is mediated through α_2 -adrenergic receptors. RX 821002 and yohimbine increased sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake, suggesting a possible tonic role of α_2 -adrenergic receptors on the inhibition of NaCl intake;
- c) moxonidine injected into LV, 4th V and LH reduced the pressor response produced by central angiotensinergic activation, while moxonidine injected only into LV was able to reduce the pressor effect of carbachol. Therefore central injection of moxonidine can inhibit mainly the ANG II-induced pressor response and only partially carbachol-induced pressor response. The reduction on ANG II-induced pressor response produced by moxonidine injected into LV was abolished by the pre treatment with yohimbine, suggesting the involvement of central α_2 -adrenergic receptors on the inhibitory effect of moxonidine on the pressor response produced by angiotensinergic activation;
- d) in normovolemic and satiated rats, moxonidine injected into LV induced c-fos expression in several cerebral areas: OVLT, ipsLSA, vMPN, PVN and SON. ANG II (50 ng) injected into LV increased c-fos expression in the following areas: ipsLSA, dMPN, PVN and SHN and reduced c-fos expression in contLSA. The icv injection of moxonidine did not change de c-fos expression induced by ANG II.
- e) in sodium depleted animals, the icv injection of moxonidine induced an increase in c-fos expression in ipsLSA and dMPN and a reduction in OVLT, suggesting that changes in the activity of these areas could be responsible to the inhibitory effect of moxonidine on 0.3 M NaCl intake in this protocol.

INTRODUÇÃO

Diariamente através do suor, respiração e principalmente pela excreção urinária há perda de água e/ou eletrólitos, em especial o sódio. Mecanismos são acionados no organismo para controlar e/ou repor a perda dessas substâncias, pois o controle da osmolaridade é importante para a manutenção do volume normal das células em todos os tecidos e o controle do volume dos líquidos é necessário para o funcionamento normal do sistema cardiovascular. Os rins têm um papel importante na regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos graças a sua capacidade de variar a excreção de água e solutos durante o processo de formação de urina. A regulação da osmolaridade dos líquidos corporais exige que a entrada de água e eletrólitos seja igual à perda pelo corpo e para tanto, a regulação envolve a ação integrada dos centros da sede e secretores de hormônio antidiurético do hipotálamo e a capacidade dos rins de excretar uma urina hiposmótica ou hiperosmótica. A excreção do íon sódio é dependente da ação dos rins, sendo influenciada pelo sistema nervoso simpático, sistema cardiovascular e hormônios. Os sensores espalhados por todo corpo, principalmente os sensores de volume vascular no território de baixa e alta pressão, controlam o volume circulante efetivo. Os sinais hormonais e neurais modulam a excreção renal de sódio para que ela se iguale a sua entrada (Berne e cols., 2000).

Em situações em que a água e/ou sódio estão em falta no organismo, a ação dos rins sozinhos não é suficiente para normalizar o quadro. Assim sendo, a recuperação da normalidade só pode ser obtida com as ingestões de água e de sódio reguladas por mecanismos ativados pelas situações de hipovolemia ou alterações de osmolaridade. Nestas situações, receptores localizados em diversas partes do organismo sinalizam, por meio de impulsos nervosos ou hormônios, para algumas regiões específicas do cérebro que, uma vez ativadas, desencadeiam respostas renais e/ou o comportamento de busca pela água e sódio (Johnson e Edwards, 1990; Thunhorst e Johnson, 1994).

A desidratação intra e extracelular (hipovolemia) são as principais causas de ingestão induzida por déficit. A desidratação intracelular é o resultado da saída de água do compartimento celular decorrente do aumento

da osmolaridade plasmática. A perda de água pela célula é detectada pelos osmorreceptores que são sensores especializados em detectar pequenas variações na osmolaridade, sendo ativados pela redução de seu volume, gerando sinais para o sistema nervoso central (SNC) e ativando, assim, os mecanismos que desencadeiam a sede (Johnson e Edwards, 1990).

A hipovolemia, por sua vez, é detectada por receptores de pressão (ou estiramento) localizados nos vasos. Há dois tipos de receptores de estiramento, os de baixa pressão ou receptores cardiopulmonares localizados nas paredes das grandes veias, átrio e circulação pulmonar; e os receptores de alta pressão localizados no arco da aorta e seio carotídeo. O relaxamento desses receptores de estiramento induzido pela redução de volume e/ou pressão sanguínea ativa a ingestão de água e de sódio. A hipovolemia também reduz a pressão de perfusão renal que é detectada por pressorreceptores localizados nesses órgãos ativando o sistema renina-angiotensina e estimulando a ingestão de água e sódio (Johnson e Edwards, 1990).

No SNC, mecanismos excitatórios e inibitórios podem ser ativados para se controlar a ingestão de água e sódio. As influências excitatórias de áreas prosencefálicas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico têm sido bem estudadas, enquanto que os mecanismos centrais inibitórios não são bem compreendidos e têm sido demonstrados tanto em áreas anteriores quanto posteriores do cérebro (Johnson e Edwards, 1990; Ferrari e cols., 1990; Ferrari e cols., 1991; Edwards e cols., 1993; Menani e Johnson, 1995; De Paula e cols., 1996; Menani e cols., 1996; De Luca Jr. e Menani, 1997).

Dentre as áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular merecem destaque o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornical (OSF) e a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V). Lesão do OVLT em cachorros reduziu a ingestão de líquidos induzida tanto pela infusão intravenosa (iv) de ANG II quanto pela administração sistêmica de solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl) (Thrasher e cols., 1982; Thrasher e Keil, 1987; Fitzsimons, 1998). A lesão do OSF reduziu a resposta dipsogênica à ANG II administrada iv no rato (Abdelaal e cols., 1974; Simpson e Routtenberg, 1975; Fitzsimons, 1998). A região AV3V tem sido considerada como um centro de integração das informações cardiovasculares e do equilíbrio hidroeletrólítico, sendo que lesões

desta região reduzem a ingestão de água induzida pela administração intracerebroventricular (icv) de ANG II, isoproterenol iv, ativação colinérgica central, salina hipertônica iv e colóide hiperoncótico intraperitoneal (ip) (Brody e Johnson, 1980; Johnson, 1985; Menani e cols., 1990; Colombari e cols., 1992a). A lesão da região AV3V também reduz a resposta pressora produzida pela ANG II (Johnson, 1985).

Há ainda um circuito cerebral fundamental para o controle da ingestão de água e sódio compreendendo o hipotálamo, a amígdala e a área septal, sendo o hipotálamo responsável pela regulação, enquanto que as outras duas estruturas estariam relacionadas com a modulação da atividade hipotalâmica (Covian e cols., 1975). O hipotálamo e a amígdala compreendem regiões estimulatórias e inibitórias do apetite ao sódio (Covian e cols., 1975). Estudo eletrofisiológico realizado em gato mostrou que estruturas presentes no hipotálamo medial e anterior na região do núcleo supraquiasmático funcionariam como um centro de recepção e integração para a regulação cardiovascular e dos líquidos corporais (Fitzsimons, 1998). Há evidências que o hipotálamo anterior também é importante para o comportamento da ingestão de líquidos (Andersson, 1978; Fitzsimons, 1998). Lesão no hipotálamo lateral (HL) pode reduzir ou abolir a ingestão de sódio induzida por uma deficiência de sódio ou tratamento por mineralocorticoide (Wolf, 1967; Schulkin e Fluharty, 1985). A amígdala central também é uma área importante na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, porque possui receptores para aldosterona (Stumpf e Sar, 1979; Sakai e cols., 1990) e também uma considerável concentração de terminais angiotensinérgicos (Lind e cols., 1985), substâncias que participam da regulação da ingestão de sódio. Estudos demonstraram que lesão do núcleo central da amígdala (NCA) prejudica a ingestão de sódio normal diária dos animais, bem como a ingestão de sódio induzida pelos tratamentos com o acetato de desoxicorticosterona (DOCA) ou pela ANG II cerebral produzida pela injeção icv de renina (Galaverna e cols., 1991), enquanto que a região medial da amígdala é importante para a ingestão de sódio induzida por aldosterona, mas não por depleção de sódio ou adrenalectomia (Schulkin e cols., 1989).

Em relação às áreas do tronco cerebral destacam-se a área postrema (AP), o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo parabraquial lateral (NPBL). A

AP é uma estrutura mediana que está localizada na terminação caudal do 4º ventrículo (4º V), sendo limitada lateralmente pelo NTS. Estudos mostraram que lesão da AP, bem como da AP + porção adjacente do NTS, aumenta o consumo de solução de NaCl (Contreras e Stetson, 1981; Kosten e cols., 1983; Hyde e Mirelis, 1984; Watson, 1985; Edwards e cols., 1993) sugerindo um papel dessas áreas no controle da ingestão de sódio. A AP e a porção medial do NTS (NTSm) enviam projeções para o NPBL (estrutura pontina) que, por sua vez, envia projeções eferentes para áreas prosencefálicas envolvidas no balanço hidroeletrolítico, como núcleos específicos do hipotálamo e amígdala (Ciriello e cols., 1984; Herbert e cols., 1990; Jhamandas e cols., 1996; Krukoff e cols., 1993; Shapiro e Miselis, 1985). Assim, um papel importante do NPBL seria integrar as informações provenientes do NTSm e AP que, por sua vez, poderiam influenciar a atividade de áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrolítico. Além disso, importantes mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio, envolvendo mecanismos serotoninérgicos e colecistocinérgicos, foram recentemente descobertos no NPBL (Menani e Johnson, 1995; Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Menani e Johnson, 1998; De Gobbi e cols., 2000).

Dentre as substâncias que ativam a ingestão de água e sódio, uma das principais é o peptídeo ANG II, cuja produção está aumentada em situações de hipovolemia e hipotensão. A ANG II atua tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona) como pela ação em algumas áreas do cérebro como a região AV3V e OSF (Simpson e Routtenberg, 1973; Brody e Johnson, 1980; Mangiapane e Simpson, 1980). Há ainda outras substâncias envolvidas no controle da ingestão de água e sódio, exercendo um papel inibitório como o peptídeo natriurético atrial (ANP), cuja injeção central inibe a ingestão de sódio induzida tanto pela depleção de sódio como pela ANG II (Antunes-Rodrigues e cols., 1986). Além do ANP, noradrenalina, agonistas e antagonistas adrenérgicos α_2 também participam do controle da ingestão de água e solução de NaCl (Ferrari e cols., 1990; Ferrari e cols., 1991; De Luca e cols., 1994; Barbosa e cols., 1995; De Paula e cols., 1996; De Luca e Menani, 1997; Yada e cols., 1997a; Yada e cols., 1997b).

Percebe-se, portanto, que a regulação da ingestão de água e sódio é complexa, envolvendo uma série de áreas e substâncias, que interagem entre si, para desencadear o comportamento ingestivo final.

Ingestão de sódio

A regulação do equilíbrio hidroeletrólítico é mantida por um sistema complexo de conservação, excreção e ingestão, havendo uma contribuição conjunta da ingestão de água e de sódio na regulação do volume corporal (Stricker, 1980).

A ingestão de água pode ser estimulada pela hipovolemia, alteração da concentração osmótica dos líquidos corporais e ANG II (Stricker, 1980). Estímulos semelhantes aos utilizados para induzir a sede, podem induzir também à ingestão de sódio, portanto, hipovolemia, alterações da osmolaridade dos líquidos corporais e hormônios envolvidos no metabolismo de sódio (sistema renina-angiotensina-aldosterona) poderiam promover a ingestão desse íon (Stricker, 1980).

Há diferentes protocolos experimentais que induzem à ingestão de sódio, como o tratamento com colóides (polietilenoglicol), formalina e diálise ip (solução de glicose isosmótica) (Stricker e Wolf, 1966; Jalowiec e Stricker, 1970; Ferreyra e Chiaraviglio, 1977; Falk e Tang; 1980) que levam o animal a uma situação de desidratação extracelular, desencadeando a ingestão de sódio. Outros métodos que promovem a ingestão de sódio englobam o estresse, a adrenalectomia, a administração de mineralocorticóides, ANG II e renina (Richter, 1936; Braun-Menendez e Brandt, 1952; Avrith e Fitzsimons, 1980; Avrith e cols., 1980; Coghlan e cols, 1981; Elfont e cols., 1984; Weiss e cols., 1986; Fitzsimons, 1998).

A ingestão de sódio pode ser induzida ainda pela privação hídrica e pela depleção de sódio por 24 h. A privação hídrica de 24 h leva o animal a uma condição de desidratação que resulta em uma redução do volume (hipovolemia) e aumento da osmolalidade dos líquidos corporais, alterando, assim, tanto o balanço hídrico, quanto o balanço de eletrólitos (McKinley e cols., 1983; Weisinger e cols., 1985). O estado de hipovolemia desencadeado pela privação hídrica levaria à produção de ANG II que estaria envolvida no

aumento da ingestão de sódio induzida por esse tratamento (Sato e cols., 1996).

A depleção de sódio de 24 h, por sua vez, é produzida pela combinação de uma natriurese e diurese farmacológicas (injeção subcutânea - sc - de furosemide) associada a uma dieta deficiente em sódio, tendo os animais livre acesso à água (Sakai e cols., 1986; Weiss e cols., 1986; Sakai e cols., 1987). Neste protocolo ocorre a perda de sódio, mas em virtude do acesso livre à água, resulta em redução do volume e da osmolalidade do líquido extracelular com elevação das concentrações plasmáticas de ANG II e aldosterona (Fluharty e Epstein, 1983; Sakai e cols., 1986). Dessa forma, a ingestão de sódio seria acionada não pela deficiência de sódio em si, mas pelas consequências hormonais da perda do sódio, ou seja, por um aumento sustentado nos níveis plasmáticos tanto de ANG II quanto da aldosterona (Fluharty e Epstein, 1983; Sakai e cols., 1986). Além disso, para a expressão completa do quadro da ingestão de sódio que é induzida tanto pela privação hídrica quanto pela depleção de sódio de 24 h, é necessária a ação da ANG II no cérebro (Weiss e cols., 1986; Sato e cols., 1996).

É interessante ressaltar que nos procedimentos mencionados anteriormente, diferentemente da ingestão de água, a ingestão de sódio só se manifesta várias horas após a manipulação experimental, sugerindo que o mecanismo responsável pela ingestão de sódio precisa de mais tempo para ser acionado completamente. Todavia, o tratamento combinado de injeções sc de furosemide associada a doses baixas de captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina - ECA) promove uma ingestão de água e de soluções concentradas de NaCl em ratos sem que haja uma dissociação temporal desses comportamentos (Fitts e Masson, 1989; Masson e Fitts, 1989). Esses autores mostraram que os ratos que receberam injeções de furosemide para produzir diurese e natriurese seguida por injeções de captopril (inibidor da ECA) numa dose suficientemente baixa para inibir a conversão de angiotensina I (ANG I) em ANG II nos tecidos periféricos, mas não no cérebro, apresentavam uma rápida ingestão de água e sódio (1 hora após as injeções) que era dependente da ação da ANG II formada dentro do SNC. Verifica-se, assim, um papel característico da ANG II na ingestão de sódio.

Angiotensina II

A ANG II faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona que é um sistema importante tanto para o controle do equilíbrio hidroeletrolítico quanto para a regulação cardiovascular e é produzida em situações em que há reduções da osmolalidade plasmática, do volume sanguíneo ou da pressão arterial.

a) Formação da ANG II

Células mioepiteliais modificadas, denominadas de células granulares ou de células justaglomerulares, presentes na arteríola aferente renal, armazenam uma protease ácida, chamada renina, em numerosos grânulos secretores citoplasmáticos (Ganong, 1998; Johnson, 2000). Diminuição da pressão de perfusão sanguínea para os rins (hipotensão e hipovolemia), ativação das fibras nervosas simpáticas que inervam os rins e redução da concentração do íon sódio para a mácula densa promovem a secreção de renina (Fitzsimons, 1998, Ganong, 1998; Berne e cols., 2000; Johnson, 2000). A renina é uma enzima proteolítica cuja função é clivar o angiotensinogênio (proteína circulante produzida pelo fígado) dando origem à ANG I.

A ANG I (decapeptídeo), por sua vez, é clivada pela ECA formando a ANG II. A maior parte de enzima de conversão, que forma ANG II na circulação, está localizada nas células endoteliais, sendo que grande parte da clivagem da ANG I à ANG II ocorre nos pulmões, porém também há conversão em outras partes do corpo. A ANG II apresenta várias funções fisiológicas como a regulação da pressão arterial (vasoconstrição), controle da secreção de aldosterona (principal mineralocorticoide secretado pelo córtex da adrenal, cujos principais efeitos envolvem o metabolismo dos íons sódio e potássio, regulando, conseqüentemente, o volume do líquido extracelular) e da excreção de sódio (ação direta no túbulo renal conservando sódio), controle da ingestão de água e sódio, secreção de vasopressina e além disso, pode participar do aprendizado e memória (Fitzsimons, 1998, Ganong, 1998; Berne e cols., 2000; Johnson, 2000).

b) ANG II e o sistema nervoso central

As estruturas que constituem os órgãos circumventriculares (OCVs), núcleo preóptico mediano (NPM) e a região AV3V fazem parte de uma rede que participa do controle da ingestão de água e sódio e da regulação cardiovascular.

Os OCVs são ricamente vascularizados com capilares fenestrados que permitem que substâncias presentes no sangue, como ANG II alcancem e estimulem terminações nervosas aferentes adjacentes. O OVLT, OSF e AP, áreas ricas em receptores de ANG II, fazem parte dos OCVs, e exercem um papel importante no controle da ingestão de água e sódio, função renal e pressão sanguínea (Mosqueda-Garcia, 1996; Fitzsimons, 1998). A AP recebe aferências do nervo do seio carotídeo, nervo vago e núcleo hipotalâmico, e se projeta para o NTS, NPBL, núcleos ambíguos (NA) e bulbo rostroventrolateral (BRVL). Importantes eferências do OSF se projetam para o núcleo paraventricular (NPV), núcleo supraóptico (NSO), região AV3V, HL e estruturas límbicas. O OVLT, por sua vez, recebe aferências do OSF, hipotálamo anterior e posterior, núcleo arqueado e locus coeruleus (LC) (Mosqueda-Garcia, 1996).

A região AV3V corresponde ao tecido que circunda a parede anteroventral do terceiro ventrículo no hipotálamo anterior e porção ventral da lâmina terminal englobando o OVLT, a porção ventral do NPM (que faz conexões com o OSF, OVLT, hipotálamo anterior, região preóptica periventricular e as áreas preópticas medial e lateral) e o núcleo preóptico periventricular, que são sensíveis às ações da ANG II e exercem função importante na homeostasia dos líquidos corporais. A região AV3V e principalmente o NPM recebem aferências noradrenérgicas e outras informações de grupos celulares presentes no NTS e em várias estruturas do tronco cerebral que estão relacionadas com a monitoração da pressão arterial e volume sanguíneo (Fitzsimons, 1998).

Além dos OCVs, várias evidências sugerem que a amígdala tem um papel importante no controle da ingestão de sódio, incluindo a induzida pela ANG II. A amígdala apresenta imunorreatividade para ANG II, e, além disso, o NCA contém terminações angiotensinérgicas e receptores de ANG II e para mineralocorticóides. É proposto que a amígdala seria um possível sítio de

interação entre ANG II e mineralocorticóides para o aumento da ingestão de sódio (Schulkin, 1991; Fitzsimons, 1998).

c) ANG II e a ingestão de água e sódio

Estudos mostraram que a administração central e periférica de ANG II estimulava tanto a ingestão de água, que ocorria em minutos, como a ingestão de soluções hipertônicas de NaCl, a qual, por sua vez, ocorria mais tardiamente (horas ou dias) (Fitzsimons, 1971; Fitzsimons, 1972; Simpson e cols., 1978; Avrith e Fitzsimons, 1980; Avrith, e cols., 1980; Coghlan e cols., 1981; Elfont e cols., 1984; Weisinger e cols., 1996; Fitzsimons, 1998; Phillips e Sumners, 1998).

A utilização de antagonistas não peptídicos de receptores da ANG II permitiu estudar o papel da ANG II na sede, especialmente na que ocorre durante a estimulação osmótica ou privação hídrica. A ingestão de água produzida pela injeção icv de solução hipertônica de NaCl foi reduzida ou abolida quando estudada em animais tratados com injeção icv de losartan (antagonista dos receptores AT₁ da ANG II). Na privação hídrica, dois componentes seriam responsáveis por promover a sede, a desidratação celular e a extracelular, sendo que, em ambos, a ANG II central teria função importante (Fitzsimons, 1980; Fitzsimons, 1981; Blair-West e cols., 1994; Weisinger e cols., 1996; Fitzsimons, 1998).

Antagonistas do sistema renina-angiotensina têm sido administrados periféricamente, centralmente ou ambos para se verificar o papel da ANG II na ingestão de sódio. Administração periférica e icv de inibidores da ECA diminuem a ingestão de sódio em diferentes espécies animais depletadas deste íon (Moe e cols., 1984; Weisinger e cols., 1987; Weisinger e cols., 1996; Fitzsimons, 1998). Animais tratados periféricamente com o inibidor da enzima conversora de ANG (captopril) ou centralmente com losartan (antagonista de receptores AT₁) ou PD123319 (antagonista de receptores AT₂) ingeriram menos solução hipertônica de NaCl induzida por privação hídrica, sugerindo que a ANG II também é importante para ativar o comportamento de ingestão de sódio (Sato e cols., 1996).

d) ANG II e controle cardiovascular

A ANG II cerebral além de participar da regulação da ingestão de água e sódio, balanço de líquidos e participar de possíveis funções cognitivas, também regula a pressão sanguínea. Os receptores da ANG II estão localizados em núcleos e áreas que estão associados com o sistema nervoso autonômico e que são conhecidos por estarem envolvidos no controle cardiovascular (Phillips, 1987; Ferguson e Washburn, 1998; Phillips e Sumners, 1998; Fitts e cols., 2000).

Injeção central de ANG II promove aumento da pressão arterial, envolvendo a ativação do sistema nervoso simpático, liberação de vasopressina e inibição do barorreflexo (Hoffman e cols., 1977; Phillips, 1987; Imai e cols., 1989; Phillips e Sumners, 1998; Bishop e Sanderford, 2000).

Estudos com lesão e microinjeção sugerem que a AP e o OSF são sítios importantes para a ação central da ANG II na regulação cardiovascular. Além disso, ANG II injetada em diferentes áreas cerebrais como NTS, NPV, LC, entre outros, também é capaz de modificar a função cardiovascular (Ferguson e Washburn, 1998).

e) ANG II e sistema noradrenérgico

A ação dipsogênica central da ANG II poderia envolver uma interação com catecolaminas que seriam liberadas pela ANG II (Fitzsimons, 1998). Foi observado utilizando microdiálise que a injeção icv de ANG II promove liberação de noradrenalina no hipotálamo anterior de ratos acordados (Qudri e cols., 1991). Além disso, injeção icv de 6-hidroxidopamina (neurotoxina de neurônios catecolaminérgicos) e de clonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, atenuou a ingestão de água induzida por ANG II central (Fitzsimons e Setler, 1975; Colombari e cols., 1990; Fitzsimons, 1998).

O sistema noradrenérgico parece não interagir só com a resposta dipsogênica da ANG II, mas também com a sua resposta pressora. Fentolamina (antagonista de receptores adrenérgicos α) e clonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos) reduziram o efeito pressor produzido pela ANG II, sugerindo que esta resposta possa ser mediada por

uma estimulação noradrenérgica de receptores adrenérgicos α (Camacho e Phillips; 1981; Colombari e cols., 1990).

Agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular

Moxonidina e a clonidina, agonistas de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, são fármacos utilizados na clínica médica para o tratamento da hipertensão (Ernsberger e cols., 1993a; Buccafusco e cols., 1995).

Várias evidências têm sugerido que o efeito anti-hipertensivo da moxonidina e da clonidina é mediado pelo menos, parcialmente, pela ativação dos receptores imidazólicos. A ação anti-hipertensiva desses fármacos seria decorrente da ação deles em receptores imidazólicos do tipo I_1 presentes no BRVL que, quando ativados, diminuiriam a atividade neuronal deste núcleo, suprimindo a atividade simpática eferente, e conseqüentemente, reduzindo a resistência vascular periférica total e a pressão sanguínea. A frequência cardíaca é menos afetada pelos agonistas de receptores I_1 do que pelos agonistas α_2 (Ernsberger e cols., 1987; Ernsberger e cols., 1993a; Ernsberger e cols., 1993b; Ernsberger e cols., 1994; Haxhiu e cols., 1994; Buccafusco e cols., 1995; Chan e Head, 1996).

Vários estudos foram realizados para verificar o papel da moxonidina e da clonidina no controle do equilíbrio hidroeletrólítico, mostrando que essas drogas inibem a ingestão de água e sódio induzida por diferentes protocolos experimentais, além de também apresentarem efeitos renais (Fregly e Kelleher, 1980; Fregly e cols., 1981; Fregly e cols., 1984a; Fregly e cols., 1984b; Ferrari e cols., 1990; Ferrari e cols., 1991; Callera e cols., 1993; Callera e cols., 1994; Smyth e Penner, 1995; Hohage e cols., 1997; Yada e cols., 1997a; Yada e cols., 1997b; De Oliveira e cols., 1998; Menani e cols., 1999; Sugawara e cols., 1999; De Oliveira e cols., 2000).

a) Receptores imidazólicos

Os receptores imidazólicos apresentam bem definidas duas subpopulações: os receptores imidazólicos do tipo I_1 e os do tipo I_2 (Michel e

Ernsberger, 1992), sendo uma diferença entre eles, o fato dos receptores I_1 se ligarem tanto à clonidina quanto ao idazoxan, enquanto que os I_2 se ligam apenas ao idazoxan (Farsang e Kapocsi, 1999; Bousquet e cols., 2000; Brasili, 2000).

Os receptores imidazólicos I_1 estão localizados nas membranas celulares (Piletz e cols., 1991; Ernsberger e cols., 1995) e podem estar acoplados à proteína G (Brasili, 2000) ou a ativação desses receptores pode levar à produção de segundos mensageiros diacilglicerol e fosfocolina, formando, em seguida, ácido aracdônico o qual poderia ser convertido em prostaglandina e eicosanóides (Ernsberger e cols., 1995; Ernsberger e cols., 1997). Já os receptores I_2 estão primariamente localizados na mitocôndria, podendo estar envolvidos na regulação das monoaminooxidases (Tesson e cols., 1995) e na regulação de canais de potássio (Okumara e cols., 1992).

Vários extratos cerebrais têm sugerido possíveis ligantes endógenos a estes receptores (Meeley e cols., 1986; Ernsberger e cols., 1988; Farsang e Kapocsi, 1999; Bousquet e cols., 2000), porém a individualização de substâncias ativas presentes nesses extratos não foram identificadas. Alguns desses extratos administrados centralmente reduziram a pressão arterial, enquanto que outros apresentaram efeito hipertensor quando injetados diretamente no BRVL (Meeley e cols., 1986; Bousquet e cols., 1986; Bousquet e cols., 1995; Bousquet e cols., 2000). Dentre os possíveis ligantes endógenos merecem destaque as substâncias coletivamente denominadas de CDS (clonidine displacing substance – substância que promove o desligamento da clonidina) que foram parcialmente purificadas de alguns extratos. Há também a agmatina (arginina descarboxilada) que também parece ser um dos componentes desses extratos (Li e cols., 1994; Farsang e Kapocsi, 1999; Bousquet e cols., 2000; Brasili, 2000), porém há controvérsias, pois a administração icv de agmatina produz bradicardia, mas não hipotensão, diferentemente do que ocorre após a administração de agonista imidazólico I_1 (Head e cols., 1997; Farsang e Kapocsi, 1999; Bousquet e cols., 2000; Brasili, 2000). Além disso, há indicação de que a agmatina também poderia se ligar em receptores adrenérgicos α_2 (Pinthong e cols., 1995).

A estimulação dos receptores imidazólicos promove aumento do clearance osmótico, diurese e natriurese (Smyth e Penner, 1995; Hohage e

cols., 1997). Podem também contribuir para a regulação da pressão ocular e temperatura (Romanovsky e cols., 1993; Campbell e Potter, 1994; Farsang e Kapocsi, 1999). Além disso, apresentam efeitos metabólicos regulando o metabolismo da glicose, uma vez que a administração central de agmatina e moxonidina produz um efeito anti hiperglicêmico (Kaan e cols.; 1995; Farsang e Kapocsi, 1999).

a.1) Receptores imidazólicos e o controle cardiovascular

Os receptores I_1 participam do controle cardiovascular, sendo que a ativação deles no BRVL promove uma redução da atividade simpática e, conseqüentemente, diminuição da pressão arterial (Tibirica e cols., 1989; Tibirica e cols.; 1991; Farsang e Kapocsi, 1999; Bousquet e cols., 2000; Brasili, 2000).

A função dos receptores imidazólicos do tipo I_2 ainda não está bem definida (Farsang e Kapocsi, 1999; Bousquet e cols., 2000; Brasili, 2000).

a.2) Receptores imidazólicos e a ingestão de água e sódio

Uma relação entre os receptores imidazólicos e a ingestão de água e sódio não foi estabelecida, havendo poucos estudos a respeito. Foi mostrado que a injeção central de ligantes imidazólicos não adrenérgicos (ácido imidazol-4-acético e histamina) não promoveram alterações nas ingestões de água e sódio (Miguel e De Luca Jr., 1997; Sugawara e cols., 2001). É interessante considerar a possibilidade de que, embora estas drogas apresentem o radical imidazol, elas podem não apresentar afinidade pelos receptores imidazólicos, e que, além disso, não se sabe se elas atuariam como agonistas ou antagonistas dos receptores imidazólicos, permanecendo assim a dúvida sobre uma possível participação dos receptores imidazólicos no controle da ingestão de água e sódio.

b) Receptores adrenérgicos α_2

Os receptores adrenérgicos α_2 , localizados tanto pré (autorreceptores) quanto pós-sinapticamente, constituem uma subdivisão dos receptores adrenérgicos e podem ainda ser subdivididos em α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} e α_{2D} . Os

receptores adrenérgicos α_2 estão acoplados à proteína $G_{\text{inibitória}}$ reduzindo a formação do AMP_{cíclico}, exercendo, portanto, uma ação inibitória em muitas células. Os ligantes endógenos para estes receptores incluem a noradrenalina e a adrenalina, sendo que eles apresentam maior afinidade para a noradrenalina (Feldman e cols., 1997; Rang e cols., 1997).

A ativação dos receptores adrenérgicos α_2 promove inibição da liberação de neurotransmissores (inclusive liberação de noradrenalina e acetilcolina por nervos autônomos), agregação plaquetária e contração da musculatura lisa vascular (Rang e cols., 1997). Há ainda, estudos que sugerem a participação dos receptores adrenérgicos α_2 sobre a ingestão de alimento (Wellman e cols., 1993) e que a ativação desses receptores no LC pode ser importante para algumas atividades cognitivas (Feldman e cols., 1997).

b.1) Receptores adrenérgicos α_2 e o controle cardiovascular

O sistema adrenérgico α_2 participa do controle cardiovascular, regulando a descarga simpática do tronco cerebral e influenciando a frequência cardíaca, pressão arterial e respiração (McCrimmon e Lalley, 1982; Godwin e cols., 1998; Farsang e Kapocsi, 1999). Metildopa, guanfacina, guanabenz, e clonidina, ativam os receptores adrenérgicos α_2 presentes no SNC e a estimulação dos receptores adrenérgicos α_2 no NTS e LC promove hipotensão, bradicardia e sedação (De Sarro e cols., 1987; Hársing e cols., 1989; Ernsberger e cols., 1995; Buccafusco e cols., 1995; Guyenet, 1997; Farsang e Kapocsi, 1999).

b.2) Receptores adrenérgicos α_2 e ingestão de água e sódio

Noradrenalina inibe o comportamento ingestivo de água e de sódio induzido por diferentes protocolos (Leibowitz, 1972; Sugawara e cols., 1999; Yada e cols., 1997b). Antagonistas adrenérgicos α (iombina e prazosin) não alteraram a ingestão de água induzida por privação hídrica, porém reduziram a ingestão de água induzida pela ANG II, sendo que este efeito foi potencializado pela clonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos). Estes resultados sugerem que a noradrenalina poderia apresentar uma ação dual sobre a ingestão hidro-salina, ora inibindo ora estimulando a ingestão de água e sódio (Ferrari e cols., 1990; Ferrari e cols., 1991; De Luca e cols., 1994;

Barbosa e cols., 1995; De Paula e cols., 1996; De Luca e Menani, 1997; Yada e cols., 1997a).

Há pelo menos 20 anos, a clonidina é considerada uma típica droga antidipsogênica (Fregly e Kelleher, 1980; Fregly e cols., 1981; Fregly e cols., 1984a; Fregly e cols., 1984b; Ferrari e cols., 1990; Ferrari e cols., 1991; Callera e cols., 1993; Callera e cols., 1994), além de ter também um efeito inibitório sobre a ingestão de solução hipertônica de NaCl induzida nas seguintes condições: depleção de sódio; injeção icv de renina; ou injeção periférica de DOCA em ratos (De Paula e cols., 1996; Sato e cols., 1996; De Luca e Menani, 1997; Yada e cols., 1997a., Yada e cols., 1997b). O tratamento prévio central com ioimbina (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) reduziu o efeito inibitório da clonidina sobre a ingestão de água, enquanto que o idazoxan (antagonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos) e o SKF 86466 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2), reduziram o efeito da clonidina sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico, sugerindo a participação desses receptores na ação da clonidina (Fregly e cols., 1984b, Yada e cols., 1997a, Sugawara, 1999).

A administração prévia de ioimbina, considerada um antagonista específico de receptores adrenérgicos α_2 , foi capaz de reduzir o efeito inibitório da clonidina sobre a ingestão de água, mas não bloqueou seu efeito inibitório sobre a ingestão de NaCl hipertônico (Fregly e cols., 1984b; Yada e cols., 1997a) e o SKF 86466 (outro antagonista de receptores adrenérgicos α_2) reduziu apenas parcialmente o efeito da clonidina sobre a ingestão de sódio induzida por depleção desse íon (Sugawara, 1999). Esses resultados sugerem que talvez outro receptor no qual a ioimbina não se liga também possa participar do efeito inibitório da clonidina sobre a ingestão de sódio. Talvez esse receptor seja o imidazólico ou subtipos diferentes dos receptores adrenérgicos α_2 . A possibilidade de ação dessas drogas em diferentes tipos de receptores dificulta a interpretação dos resultados. Muitas drogas ligantes de receptores adrenérgicos α_2 estudadas no comportamento de ingestão de água e de sódio, são também ligantes de receptores imidazólicos, com exceção da ioimbina e SKF 86466 que apresentam diferenças nos seus efeitos de acordo com o agonista utilizado, devido talvez à possível heterogeneidade dos

receptores adrenérgicos α_2 (Brown e cols., 1990; Bylund, 1995; Yada e cols., 1997a; Sugawara, 1999). Entretanto, antagonistas que sejam específicos para receptores imidazólicos não são disponíveis.

Estudos do laboratório demonstraram que a moxonidina injetada centralmente em ratos tem efeitos muito semelhantes aos da clonidina em relação à inibição da ingestão de sódio induzida por depleção desse íon (De Oliveira e cols., 1998). A injeção central de moxonidina também inibe a ingestão de água. O tratamento prévio com ioimbina e RX 821002 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) aboliu a ação inibitória da moxonidina sobre a ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h e ANG II, respectivamente, o que sugere que receptores adrenérgicos α_2 estão envolvidos na ação antidipsogênica da moxonidina (Menani e cols., 1999; Martinez e cols., 2000). Foi demonstrado também que o idazoxan (antagonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos) reduziu apenas parcialmente o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de sódio induzida por depleção desse íon (Sugawara e cols., 1999), sugerindo que os receptores adrenérgicos α_2 devem estar também relacionados aos efeitos antinatriorexigênicos da moxonidina.

Em resumo, os estudos utilizando ioimbina (antagonista específico dos receptores adrenérgicos α_2) sugerem uma participação dos receptores adrenérgicos α_2 no comportamento ingestivo de água. Por outro lado, o papel dos receptores adrenérgicos α_2 sobre a ingestão de soluções hipertônicas de NaCl ainda não está bem definido, uma vez que, somente a injeção central de ioimbina não foi capaz de promover alterações sobre ingestão de sódio, nem afetou o efeito antinatriorexigênico da clonidina.

Marcadores de atividade celular: proteína c-fos

Estímulos podem modular a função celular de diferentes formas, podendo, por exemplo, afetar o funcionamento celular por meio da regulação da expressão gênica (Sheng e Greenberg, 1990; Herrera e Robertson, 1996). Genes que são ativados rapidamente após a estimulação celular e que não são

inibidos por inibidores de síntese proteica são denominados de genes de expressão imediata (IEGs: *immediate early genes*) e podem ser ativados em diversos sistemas neurais por diferentes estímulos fisiológicos ou farmacológicos (Morgan e Curran, 1989; Sheng e Greenberg, 1990). As proteínas codificadas pelos IEGs podem atuar como fatores de transcrição que se ligam em sequências específicas de genes alvos, modulando sua transcrição, e conseqüentemente a expressão destes genes alvos (Tsai e cols., 1988; Beato, 1989; Sheng e Greenberg, 1990), podendo promover alterações bioquímicas de longa duração envolvendo a síntese de novas proteínas. Assim, os genes alvos alterariam o fenótipo da célula e portanto, estímulos externos poderiam alterar a expressão fenotípica da célula (Sheng e Greenberg, 1990; Shen e cols., 1995; Herrera e Robertson, 1996). Dentre os IEGs conhecidos, os mais estudados são os proto-oncogenes c-fos e c-jun.

A indução da expressão do c-fos tem sido usada como uma ferramenta para se estudar a ativação neuronal e atualmente a ativação desse proto-oncogene pode ser considerada como a ponte de ligação entre estímulos externos e alterações fenotípicas em células cerebrais (Herrera e Robertson, 1996).

Vários tipos de protocolos experimentais têm sido empregados para se identificar as bases neurais dos mecanismos que controlam a sede e a ingestão de sódio. Uma das estratégias aplicadas é a avaliação imunohistoquímica da expressão da proteína c-fos para mapear áreas cerebrais que possam ser metabolicamente ativadas durante os tratamentos que produzem a ingestão de água e sódio. A infusão de salina hipertônica ativa estruturas prosencefálicas, como NPV e NSO hipotalâmicos, NPM e OVLT, levando à expressão de c-fos nessas estruturas e também em estruturas pontinas e bulbares como núcleo parabraquial (NPB), NTS e BRVL (Hochstenbach e Ciriello, 1996). O tratamento com furosemide + captopril induz a expressão para c-fos em estruturas como OSF, OVLT, NPM, NSO, NPV, AP, NPB, NTS rostral e caudal (Thunhorst e cols., 1998). Diálise ip ou injeção sc de furosemide + dieta deficiente de sódio promoveram expressão de c-fos no OSF e OVLT (Vivas e cols., 1995; Rowland e cols., 1996a). Nota-se que os tratamentos que promovem ingestão de água e sódio promovem a expressão de c-fos em áreas prosencefálicas (OSF, OVLT e NPM) conhecidas por

mediarem muitas das ações centrais da ANG II (Abdelaal e cols., 1974; Simpson e Routtenberg, 1975; Johnson e Edwards, 1991; Fitzsimons, 1998).

Além dos estímulos que promovem alterações do volume e/ou osmolaridade plasmática, ativação dos receptores de neurotransmissores, incluindo os relacionados no controle do equilíbrio hidroeletrolítico (por exemplo, o sistema noradrenérgico) levam à expressão da proteína c-fos (Hughes e Dragunow, 1995).

Expressão da proteína c-fos e ANG II

Injeções centrais ou periféricas (iv ou sc) de ANG II em ratos não anestesiados promove expressão da proteína c-fos na região AV3V, incluindo OVLT e o NPM; OSF; NSO; NPV; NCA e no núcleo do leito da estria terminal (Lind e cols., 1985; Herbert e cols., 1992; McKinley e cols., 1992; Rowland e cols., 1994a; Rowland e cols., 1994b; Rowland e cols., 1996b; Fitzsimons, 1998). Esses resultados sugerem que a expressão da proteína c-fos induzida pela injeção central de ANG II ocorre em áreas envolvidas na ingestão de líquidos e na resposta pressora produzidas pela ANG II.

Expressão da proteína c-fos e sistema noradrenérgico

Graças ao uso de agonistas e antagonistas adrenérgicos é possível se estudar o papel dos receptores adrenérgicos na ativação da proteína c-fos. Tratamentos que causam a liberação de noradrenalina no cérebro, como por exemplo o estresse, aumentam a expressão da proteína c-fos (Gubits e cols., 1989; Bing e cols., 1991; Hughes e Dragunow, 1995).

Administração periférica de ioimbina (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) produz um aumento na quantidade de RNAm para c-fos no cérebro (Gubits e cols., 1989) e na imunorreatividade para c-fos que é observada no LC, NCA, núcleo do leito da estria terminal, NTS, BRVL, NPV, neocortex, córtex piriforme e NSO (Tsujinjo e cols., 1992; Bing e cols., 1992). A expressão da imunorreatividade para c-fos ocorre em áreas cerebrais conhecidas por possuírem alta densidade de receptores α_2 . A expressão de c-fos induzida pela ioimbina é parcialmente bloqueada pelo tratamento com os antagonistas adrenérgicos β (propranolol) e α_1 (prazosin) e o agonista de

receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos (clonidina) (Gubits e cols., 1989; Bing e cols., 1992; Hughes e Dragunow, 1995; Herrera e Robertson; 1996). Administração periférica de clonidina induziu a imunorreatividade para c-fos em neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO do hipotálamo (Tsujinjo e cols., 1992; Herrera e Robertson; 1996). Estes resultados sugerem que os receptores adrenérgicos α_2 participariam da regulação da expressão de c-fos em áreas envolvidas com o controle autonômico.

OBJETIVOS

Sabendo-se do envolvimento do mecanismo dependente de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos centrais e de várias áreas prosencefálicas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e na regulação cardiovascular, constituem-se objetivos deste trabalho:

1) analisar os efeitos da injeção de moxonidina nos ventrículos cerebrais (ventrículo lateral - VL e 4º V), no complexo amigdalóide, no núcleo central da amígdala (NCA), no núcleo basal da amígdala (NBA) e no hipotálamo lateral (HL) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio por 24 h;

2) investigar os efeitos da injeção de moxonidina no VL, 4º V e HL sobre as respostas pressoras produzidas pela ativação central angiotensinérgica e colinérgica;

3) verificar a participação dos receptores adrenérgicos α_2 centrais na resposta à moxonidina injetada no VL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio e respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II no VL;

4) analisar a ativação de áreas prosencefálicas após a administração de moxonidina no VL em ratos normovolêmicos, depletados de sódio ou tratados com ANG II icv, por meio de marcação imuno-histoquímica.

MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com pesos em torno de 300 g.

2. Cirurgia cerebral

Para o implante de cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados por ketamina (100 mg/kg) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nesses pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para o ventrículo lateral (VL), cânulas de 10 x 0,5 mm d.i. foram posicionadas, orientando-se de acordo com as seguintes coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,8 mm abaixo da dura-máter. Para o HL cânulas de 14 x 0,5 mm d.i. foram posicionadas de acordo com as coordenadas: 2,1 mm caudal ao bregma, 1,3 mm lateral à linha mediana e 7 mm abaixo da dura-máter. Para o 4º V cânulas de 12 x 0,5 mm d.i. foram posicionadas de acordo com as coordenadas 13,3 mm caudal ao bregma, sob a linha mediana e 6,4 mm abaixo da dura-máter. Para o complexo amigdalóide, cânulas bilaterais de 12 x 0,5 mm d.i. foram colocadas nas seguintes coordenadas: 2,2 mm caudal ao bregma, 4,5 mm lateral à linha mediana e 6,4 mm abaixo da dura-máter. Para o NCA, as cânulas (12 x 0,5 mm d.i.) bilaterais foram posicionadas nas seguintes coordenadas: 2,2 mm caudal ao bregma, 4,7 mm lateral à linha mediana e 5,4 mm abaixo da dura-máter. Para o NBA, foram implantadas bilateralmente cânulas (12 x 0,5 mm d.i.) nas seguintes coordenadas: 2,2 mm caudal ao bregma, 4,7 mm lateral à linha mediana e 6,4 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica.

Após a cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde

Animal Ltda.) e permaneceram em recuperação em suas gaiolas por, pelo menos, 5 dias antes de serem iniciados os experimentos.

3. Injeções das drogas no cérebro

As drogas dissolvidas em solução salina fisiológica, solução salina acidificada (moxonidina nas doses de 5, 10 e 20 nmol/1 μ l e 20 nmol/0,5 μ l) ou propilenoglicol/água 2:1 (para ioimbina e moxonidina nas doses de 10 nmol/0,2 μ l, 20 nmol/0,4 μ l, 40 nmol/1 μ l e 80 nmol/2 μ l) foram injetadas no cérebro dos ratos num volume de 0,2; 0,4; 1; 2 ou 3 μ l. Para tanto, foi utilizada seringa Hamilton (10 μ l) conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia.

4. Drogas injetadas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- angiotensina II (Sigma, 50 ng/1 μ l);
- cloridrato de carbacol (Sigma, 4 nmol/1 μ l);
- cloridrato de moxonidina (Solvay Pharma, 5, 10, 20, 40 e 80 nmol/0,2; 0,4; 1 ou 2 μ l);
- RX 821002 (RBI, 20, 40 e 80 nmol/1 μ l) icv;
- SKF 86466 (Smith Kline and French, 160, 320 e 640 nmol/1 μ l);
- cloridrato de ioimbina (Sigma, 80, 160 e 320 nmol/1, 2 ou 3 μ l);
- furosemide (Sigma, 20 mg/kg de peso corporal) sc;

Soluções de salina fisiológica (ou solução salina acidificada, pH = 4) ou propilenoglicol/água 2:1 foram injetados nos experimentos controles.

5. Medida da ingestão de água e de NaCl

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M induzidas pela depleção de sódio foram registradas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min. A depleção de sódio foi feita pelo tratamento com o diurético furosemide (20 mg/kg de peso corporal) administrado subcutaneamente, seguido de manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciarem

as medidas de ingestão de água e de NaCl 0,3 M. Para o registro das ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram utilizados tubos graduados (divisão de 0,1 ml).

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de NaCl, os ratos não tiveram acesso à ração.

Os animais que foram utilizados para o estudo da ingestão de NaCl, além de água, tiveram à disposição NaCl 0,3 M, desde, pelo menos, 5 dias antes do início dos experimentos.

6. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) foi registrada em ratos não anestesiados submetidos à canulação prévia (1 dia) da artéria femoral com um tubo de polietileno PE 10, o qual foi conectado a um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizado no dorso do animal. O tubo PE 50 foi conectado com um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) acoplado a um polígrafo de registro (Narcotrace 40, Narco Bio Systems). A frequência foi registrada por um biotacômetro (Narco Bio Systems) acionado pelos pulsos da pressão arterial.

7. Determinação da expressão de c-fos

Animais normovolêmicos, submetidos à depleção de sódio por 24 h ou tratados com injeção icv de ANG II e que receberam injeção icv de moxonidina ou de veículo foram anestesiados com tiopental sódico 1 h após a última injeção central e em seguida perfundidos sob gravidade através da artéria aorta, com salina em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) por um período de 5 min antes da perfusão com paraformaldeído (PFA) 4% que foi de 8 min. O cérebro era removido e mantido numa solução de PFA 4% por 4 - 6 h na temperatura ambiente. Em seguida, o cérebro era transferido para uma solução de sacarose 20% (diluída em tampão fosfato) na qual permanecia por 12 h na geladeira. Após a execução de todas essas etapas, os cérebros eram cortados transversalmente (50 μ m de espessura) em micrótomo provido de criostato.

Os cortes obtidos eram lavados uma vez com salina tamponada 0,1 M, durante 5 min. Eram transportados para uma solução contendo o soro

bloqueador (Vector Laboratories), salina tamponada 0,1 M e o anticorpo c-fos (Santa Cruz Biotechnology), ficando sob agitação por um período de 22 horas na temperatura ambiente. Os cortes eram então lavados três vezes com salina tamponada 0,1 M. Em seguida, eram transportados para outra solução contendo soro bloqueador, salina tamponada 0,1 M e o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (Vector Laboratories), permanecendo sob agitação branda por 1 h na temperatura ambiente.

Eram realizadas novas lavagens dos cortes (três vezes) com salina tamponada 0,1 M. Após as lavagens, os cortes eram transferidos para a solução ABC (Vectastain Elite – ABC Kit, Vector Laboratories) ficando sob agitação suave por 1 h na temperatura ambiente. Após 1 h, os cortes eram novamente lavados em salina tamponada (três vezes), e então, colocados na solução de diaminobenzidina (DAB) por um período de 10 min. Após os 10 min, os cortes eram lavados duas vezes em salina tamponada 0,1 M para parar a reação de desenvolvimento de cor.

Os cortes eram montados em lâminas e deixados para secar 12 h. Eram, então, desidratados e cobertos com lamínulas.

Para a contagem das células com resposta positiva para a proteína c-fos nas áreas prosencefálicas estudadas (OVLT, área septal lateral - ASL, núcleo preóptico mediano dorsal - NPMd, núcleo preóptico mediano ventral - NPMv, núcleo septo-hipotalâmico - NSH, OSF, núcleo paraventricular - NPV, núcleo supraóptico - NSO, complexo amigdalóide - Amg e HL) foi utilizado o programa Image Pro Plus. Os resultados das áreas prosencefálicas bilaterais, NSH, NPV, NSO e Amg foram representados como a somatória de células positivas para a proteína c-fos presentes nos dois lados da área analisada. Já para ASL, devido a sua proximidade com o ponto de injeção (VL), os resultados foram dados como ASL ipsilateral (ASLips), lado da injeção, e ASL contralateral (ASLcont), lado oposto à injeção.

8. Histologia cerebral

Terminados os experimentos, os ratos eram profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml), seguida de solução de formalina 10% (50 ml). A seguir, os cérebros eram retirados e fixados em formalina 10%

por alguns dias. Cortes transversais (50 μm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um micrótomo provido de criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções no VL, HL, 4^o V, complexo amigdalóide, NCA e NBA.

9. Apresentação dos resultados e análise estatística

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

PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS

1. Efeitos da injeção de moxonidina no VL e no 4º V sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos submetidos à depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos normotensos submetidos à depleção de sódio obtida pelo tratamento com o diurético furosemide (20 mg/kg de peso corporal) seguido de manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum*. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de veículo ou moxonidina (20 nmol/1 µl) no VL ou no 4º V. Vinte minutos após essa injeção, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e de água foram medidas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos.

Cada animal foi submetido a dois experimentos. Em cada experimento, metade dos animais do grupo recebeu injeção de veículo e a outra metade recebeu moxonidina. No experimento seguinte, os mesmos tratamentos foram repetidos de maneira contrabalanceada.

2. Efeitos da injeção de moxonidina no complexo amigdalóide, no NCA e no NBA sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos submetidos à depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos normotensos submetidos à depleção de sódio como descrito no item 1. Após as 24 h, os ratos receberam injeções bilaterais de veículo (1 µl) ou moxonidina (5, 10 e 20 nmol/1 µl) no complexo amigdalóide. Vinte minutos após as injeções, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e de água foram medidas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos.

Cada animal foi submetido a quatro tratamentos: veículo (1 µl); moxonidina 5 nmol/1 µl; moxonidina 10 nmol/1 µl e moxonidina 20 nmol/1 µl. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A sequência de tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e, no final, todos os ratos de cada grupo receberam

todos os tratamentos. Foram considerados, para análise dos resultados, os ratos cuja histologia indicou pontos de injeção localizados unilateral ou bilateralmente na amígdala.

Para os estudos no NCA e NBA, foram realizadas injeções bilaterais e foi utilizado um protocolo semelhante ao descrito anteriormente, porém, na tentativa de restringir o espalhamento da droga dentro dos subnúcleos estudados, o volume de injeção neste experimento foi menor, sendo utilizado o volume de 0,2 µl para as doses de 5 e 10 nmol de moxonidina e de 0,4 µl para a dose de 20 nmol.

3. Efeitos da injeção de moxonidina no HL sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos submetidos à depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos normotensos submetidos à depleção de sódio como descrito no item 1. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de veículo ou moxonidina (20 nmol/0,5 µl) no HL. Vinte minutos após esta injeção, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e de água foram medidas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos.

Os animais foram submetidos a dois tratamentos como descrito no item 1.

4. Efeitos da associação de antagonistas adrenérgicos α_2 (ioimbina, RX 821002 ou SKF 86466) e moxonidina injetados no VL sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos submetidos à depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos normotensos submetidos à depleção de sódio como descrito no item 1. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de veículo ou ioimbina (80 nmol/1 µl, 160 nmol/2 µl ou 320 nmol/3 µl) no VL seguidas 20 minutos após, por outra injeção de salina acidificada (controle) ou moxonidina (20 nmol/1 µl) no VL. Vinte minutos após a injeção de moxonidina (ou salina acidificada), os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos.

Esse mesmo protocolo foi utilizado para se estudar os efeitos do RX 821002 (20, 40 e 80 nmol/1 μ l) e SKF 86466 (160, 320 e 640 nmol/1 μ l) associado com moxonidina (20 nmol/1 μ l) no VL sobre as ingestões de água e de sódio.

Para o antagonista SKF 86466 (SKF), cada grupo de ratos foi submetido a seis tratamentos: veículo + salina acidificada; veículo + moxonidina; SKF 160 nmol + moxonidina; SKF 320 nmol + moxonidina; SKF 640 nmol + moxonidina e SKF 640 nmol + salina. Para os estudos com o antagonista ioimbina e RX 821002 (RX), para cada dose de antagonista estudada foi utilizado um grupo diferente de animais, sendo que cada grupo de animais foi submetido a quatro tratamentos: veículo + salina acidificada; veículo + moxonidina; antagonista + salina acidificada; antagonista + moxonidina. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A sequência de tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e, no final, todos os ratos receberam todos os tratamentos.

5. Efeitos da injeção de moxonidina no VL, no 4° V e no HL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados.

Ratos normotensos foram submetidos à canulação prévia da artéria femoral. No dia seguinte à canulação da artéria, foi realizado o registro da pressão arterial e frequência cardíaca. Veículo ou moxonidina (20, 40 e 80 nmol/1 ou 2 μ l) foram injetados no VL 20 minutos antes da injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) ou carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL. Para os experimentos de injeção no 4° V e HL utilizou-se somente a dose de 20 nmol de moxonidina, sendo os volumes de injeção, 1 μ l e 0,5 μ l, respectivamente.

Cada grupo de animais foi submetido a dois períodos de registro da pressão arterial e frequência cardíaca com um intervalo de 1 dia entre eles. No primeiro período de registro, metade dos animais recebeu injeção de veículo + ANG II (ou carbacol) e a outra metade recebeu injeção de moxonidina + ANG II (ou carbacol). O mesmo protocolo foi repetido no dia seguinte de maneira contrabalanceada.

O mesmo procedimento foi utilizado quando moxonidina foi injetada no HL ou no 4º V.

6. Efeitos da injeção prévia ioimbina no VL sobre o efeito inibitório da moxonidina no VL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de ANG II no VL em ratos acordados.

Ratos normotensos foram submetidos à canulação prévia da artéria femoral. No dia seguinte à canulação da artéria, foi realizado o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca. Ioimbina (320 nmol/3 µl) ou veículo (3 µl) foram injetados 20 minutos antes da moxonidina (80 nmol/2 µl) ou veículo (2 µl). Vinte minutos após a injeção de veículo ou moxonidina, ANG II (50 ng/1 µl) foi injetada no VL. O veículo da ioimbina e da moxonidina foi o propilenoglicol/água (2:1).

Foram utilizados dois grupos de animais: o grupo que recebeu moxonidina (grupo 1) e o grupo que recebeu veículo (grupo 2). Cada um destes grupos foi submetido a dois tratamentos. **Grupo 1:** ioimbina + moxonidina + ANG II ou veículo + moxonidina + ANG II; **Grupo 2:** ioimbina + veículo + ANG II ou veículo + veículo + ANG II. Cada grupo de animais foi submetido a dois períodos de registro da pressão arterial e da frequência cardíaca com um intervalo de 1 dia entre eles. No primeiro período de registro, metade dos animais recebeu um tratamento e a outra metade o outro. O mesmo protocolo foi repetido no dia seguinte de maneira contrabalanceada.

7. Estudo da expressão da proteína c-fos após administração de moxonidina no VL em ratos normalmente hidratados e saciados.

Em ratos normotensos, normovolêmicos e saciados, a expressão da proteína c-fos foi estudada nas seguintes áreas prosencefálicas: OVLT, ASLips, ASLcont, NPMd, NPMv, NSH, OSF, NPV, NSO, Amg e HL. No dia do experimento, retirou-se a água e ração dos animais que, então, receberam injeção no VL de moxonidina (20 nmol/1 µl) ou veículo (propilenoglicol/água 2:1). Após 60 min, os animais foram sacrificados, perfundidos e retirados os cérebros. Realizaram-se, em seguida, os procedimentos de imunohistoquímica, segundo a metodologia descrita anteriormente.

8. Estudo da expressão da proteína c-fos após associação de moxonidina com ANG II no VL em ratos normalmente hidratados e saciados.

Foi analisada a expressão da proteína c-fos em áreas prosencefálicas (OVLt, ASLips, ASLcont, NPMd, NPMv, NSH, OSF, NPV, NSO, Amg e HL) em ratos normotensos, normovolêmicos e saciados que receberam injeções de ANG II (50 ng/1 µl) no VL 20 min após injeções de veículo (propilenoglicol/água 2:1) ou moxonidina (20 nmol/1 µl) também no VL. Após a injeção de ANG II, esperou-se cerca de 60 min, para então sacrificar os animais, retirar os cérebros e realizar os procedimentos de imuno-histoquímica, segundo a metodologia descrita anteriormente.

Em um outro grupo de ratos normotensos, normovolêmicos e saciados, estudou-se também a expressão da proteína c-fos (nas mesmas áreas mencionadas anteriormente), após a injeção de salina ou ANG II (50 ng/1 µl) no VL.

9. Estudo da expressão da proteína c-fos após administração de moxonidina no VL em ratos normotensos depletados de sódio.

Estudou-se a expressão de c-fos em áreas prosencefálicas (OVLt, ASLips, ASLcont, NPMd, NPMv, NSH, OSF, NPV, NSO, Amg e HL) em ratos normotensos submetidos à depleção de sódio como descrito no item 1 dos protocolos experimentais realizados. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de veículo (propilenoglicol/água 2:1) ou moxonidina (20 nmol/1 µl) no VL. Aguardou-se cerca de 60 min, para então sacrificar os animais, retirar os cérebros e realizar os procedimentos de imuno-histoquímica, segundo a metodologia descrita anteriormente.

RESULTADOS

1. Análises histológicas

As figuras 1, 2, 3, 4 e 5 apresentam cortes histológicos mostrando os pontos de injeções nas diferentes áreas cerebrais estudadas: ventrículo lateral (VL), 4º ventrículo (4º V), hipotálamo lateral (HL), núcleo central da amígdala (NCA) e núcleo basal da amígdala (NBA) em ratos representativos dos diferentes grupos de animais estudados.

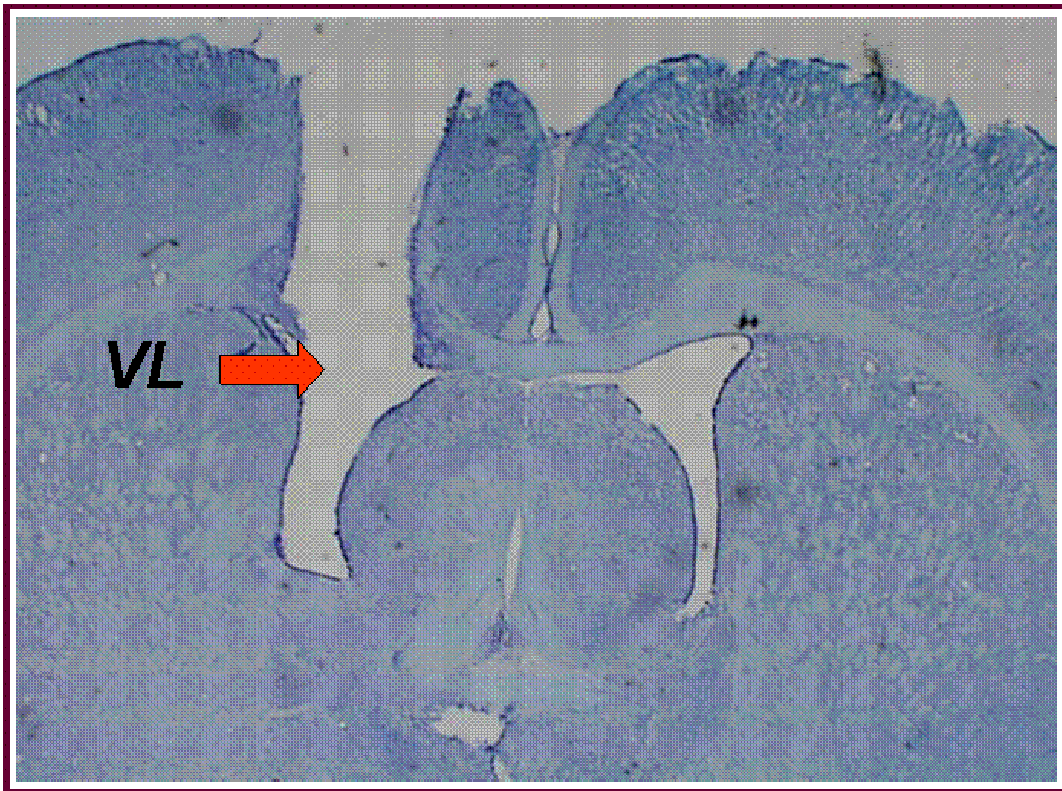


Figura 1. Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no ventrículo lateral (VL).

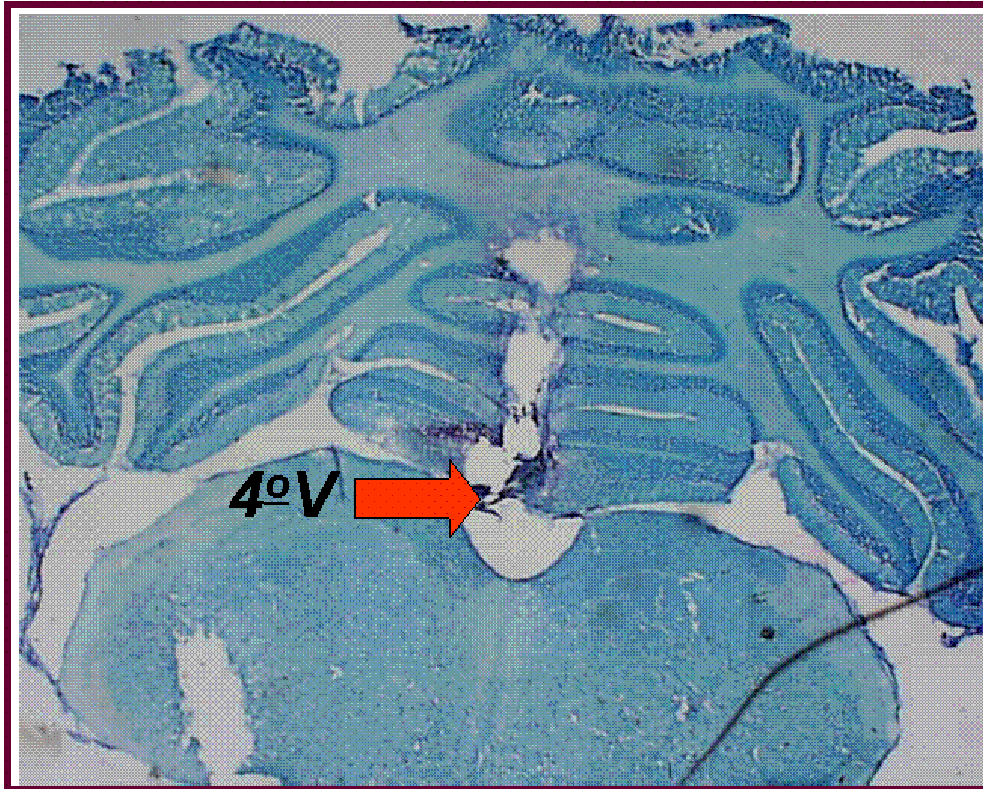


Figura 2. Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no 4º ventrículo (4º V).

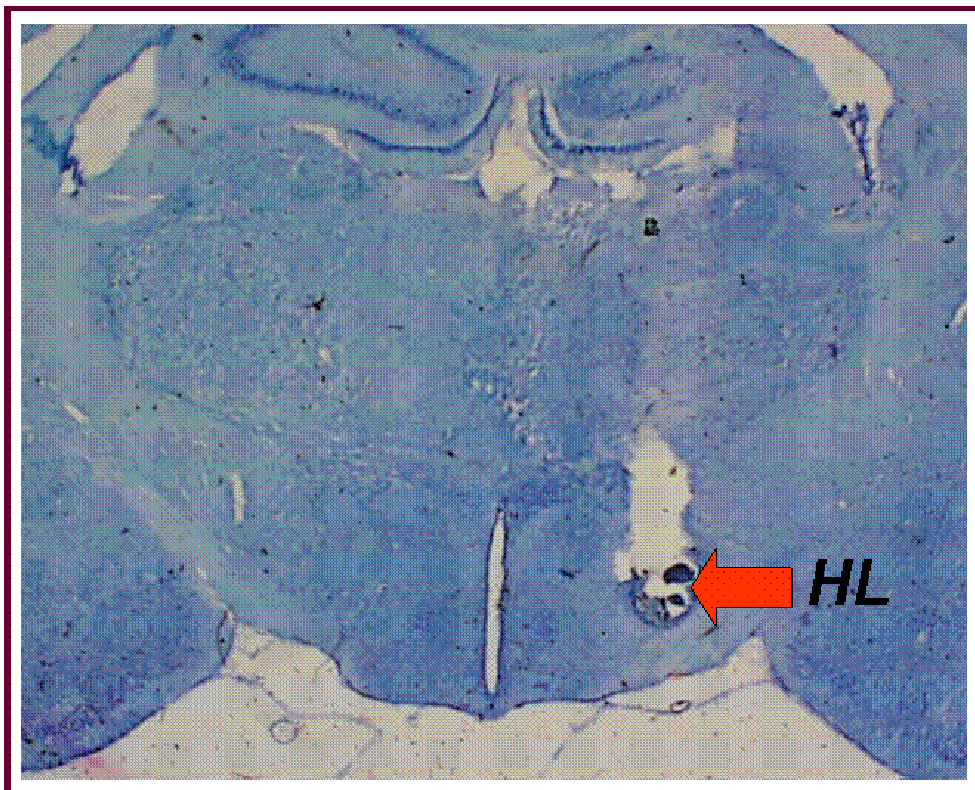


Figura 3. Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no hipotálamo lateral (HL).

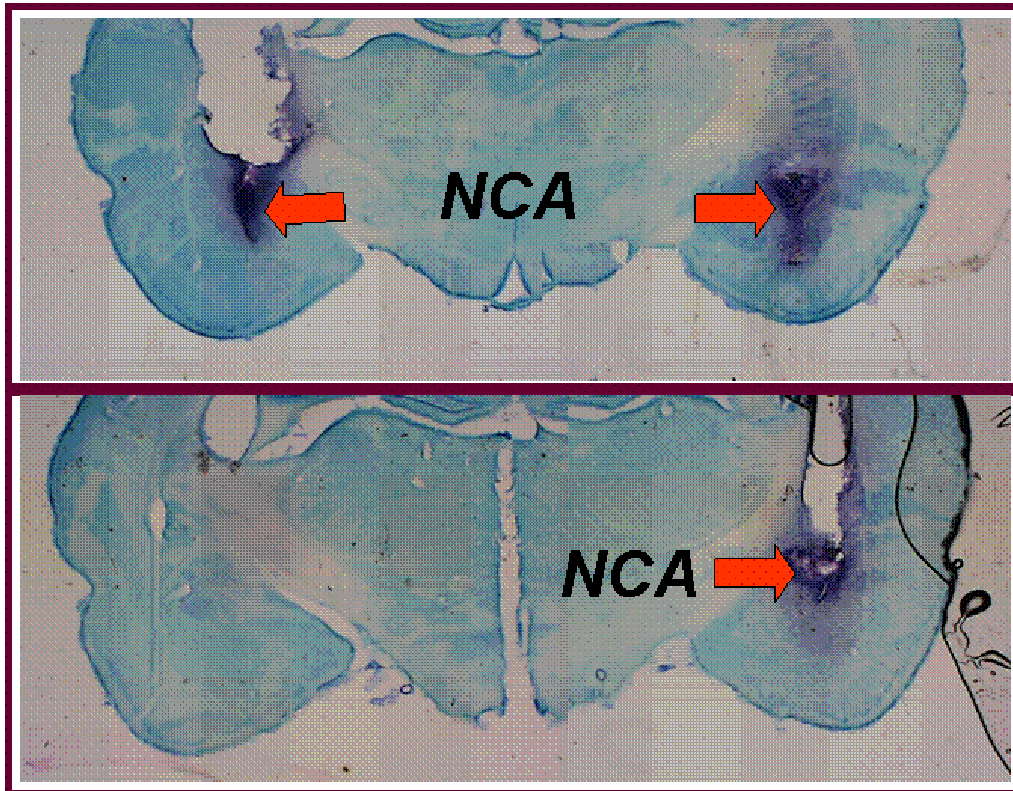


Figura 4. Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de um animal, indicando (setas) os locais de injeções bilaterais no núcleo central da amígdala (NCA).

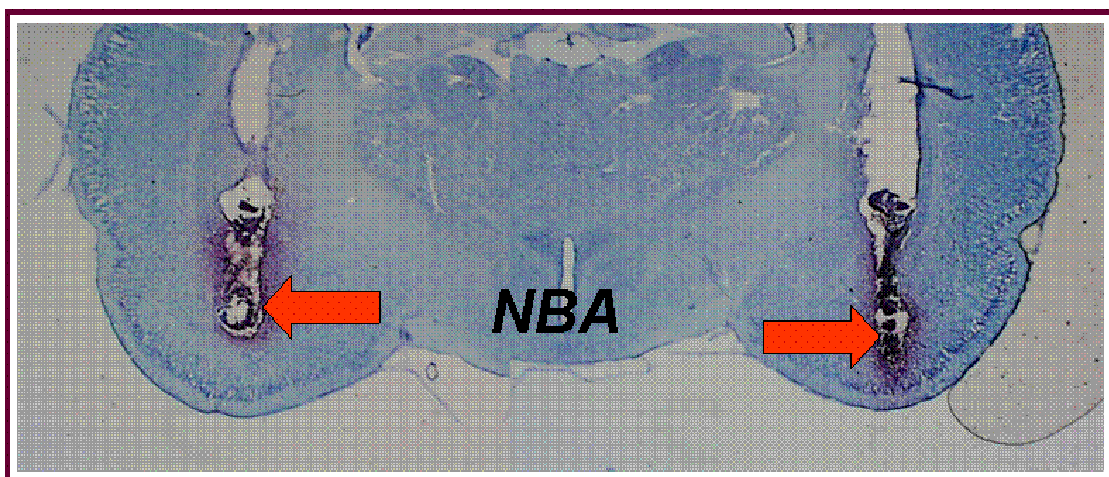
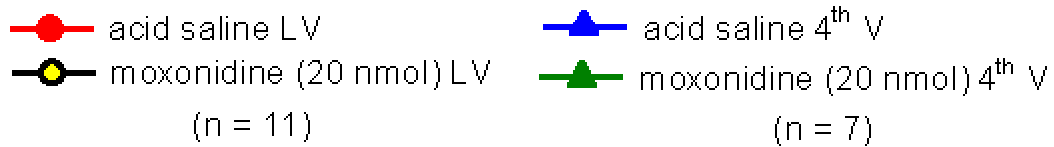


Figura 5. Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (setas) os locais de injeções bilaterais no núcleo basal da amígdala (NBA).

2. Efeitos da injeção de moxonidina no VL e 4° V sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

A injeção de moxonidina (20 nmol/1 μ l) tanto no VL quanto no 4° V reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio por 24 h [$F(3,9) = 37,51; p < 0,05$] (Figura 6A), sendo que o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl se manteve durante os 120 min de experimento quando injetada no VL, mas não quando injetada no 4° V. Até os 60 min, o efeito da moxonidina injetada no VL não foi diferente da injeção no 4° V (Figura 6A).

A ingestão de água que acompanha à ingestão de NaCl 0,3 M nos ratos depletados de sódio não foi modificada pelas injeções de moxonidina no VL ou 4° V [$F(3,9) = 1,81; p > 0,05$] (Figura 6B).



* different from vehicle into the LV

+ different from vehicle into the 4th V

§ different from moxonidine into the LV

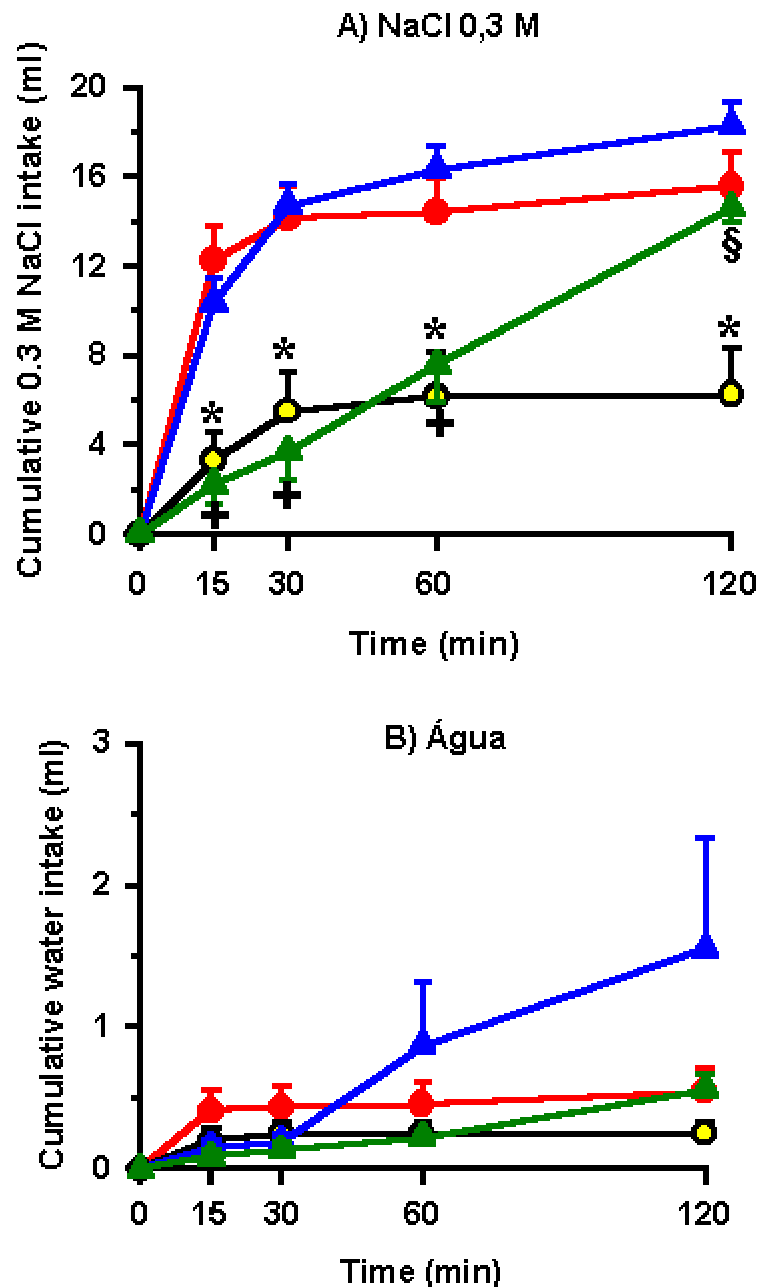


Figura 6: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio e B) água associada à ingestão de NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l) no VL ou 4^o V. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

3. Efeitos de injeções unilaterais e bilaterais de moxonidina no complexo amigdalóide sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

Moxonidina (5, 10 e 20 nmol/1 μ l) injetada bilateralmente no complexo amigdalóide reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio por 24 h durante todo o experimento [$F(3,60) = 15,30; p < 0,05$] (Figura 7A).

O efeito inibitório da moxonidina, quando injetada unilateralmente no complexo amigdalóide, foi menor do que quando injetada bilateralmente, sendo que a dose de 20 nmol de moxonidina injetada unilateralmente foi capaz de reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M nos tempos de 30, 60 e 120 min, enquanto que a dose de 10 nmol somente diminuiu a ingestão de NaCl 0,3 M nos tempos de 60 e 120 min [$F(3,24) = 3,998; p < 0,05$] (Figura 8A). Moxonidina na dose de 5 nmol injetada unilateralmente no complexo amigdalóide não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio (Figura 8A).

A ingestão de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M nos ratos depletados de sódio não apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos nos ratos cujas injeções foram uni ou bilaterais no complexo amigdalóide [$F(3, 24) = 0,57; p > 0,05$] (Figura 8B) e [$F(3, 60) = 0,71; p > 0,05$] (Figura 7B), respectivamente.



* different from vehicle
 (n = 16)

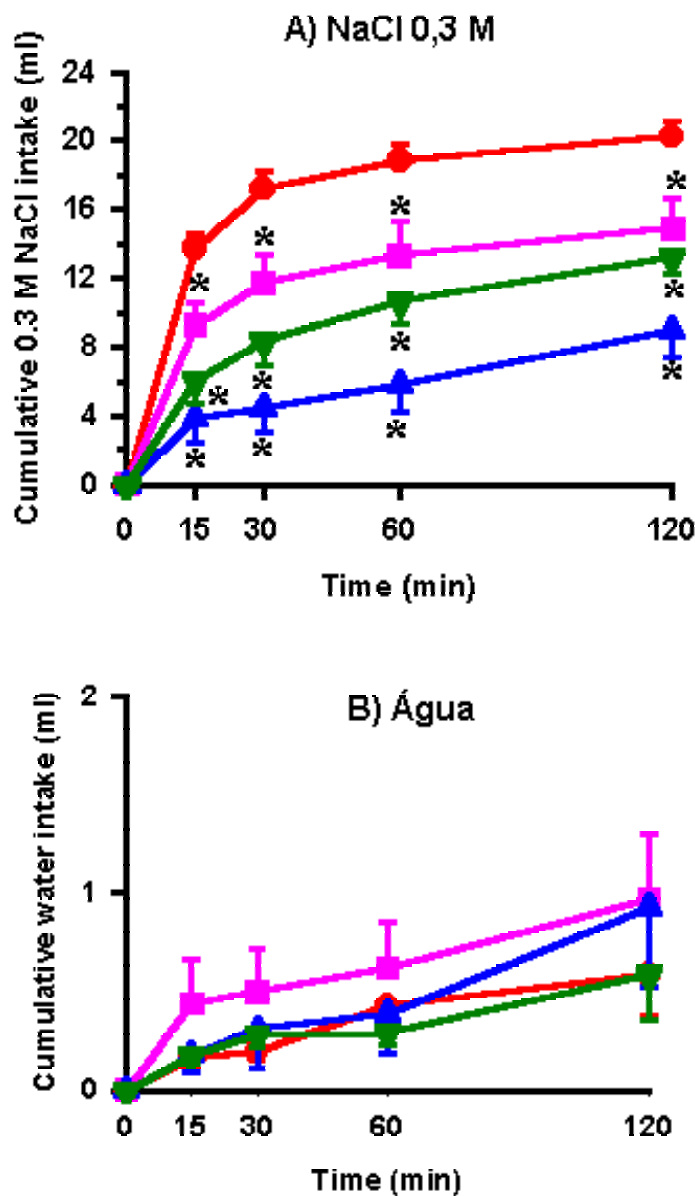
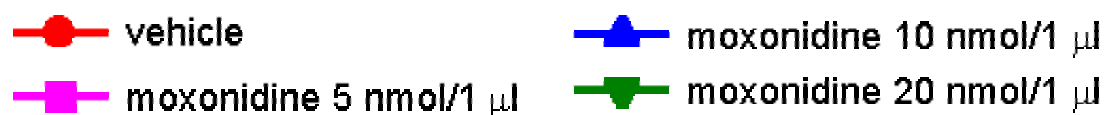


Figura 7: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio e B) água associada à ingestão de NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 , 10 e 20 nmol/1 μ l) no complexo amigdaloide. Os resultados são expressos como média \pm EPM.



* different from vehicle

(n = 9)

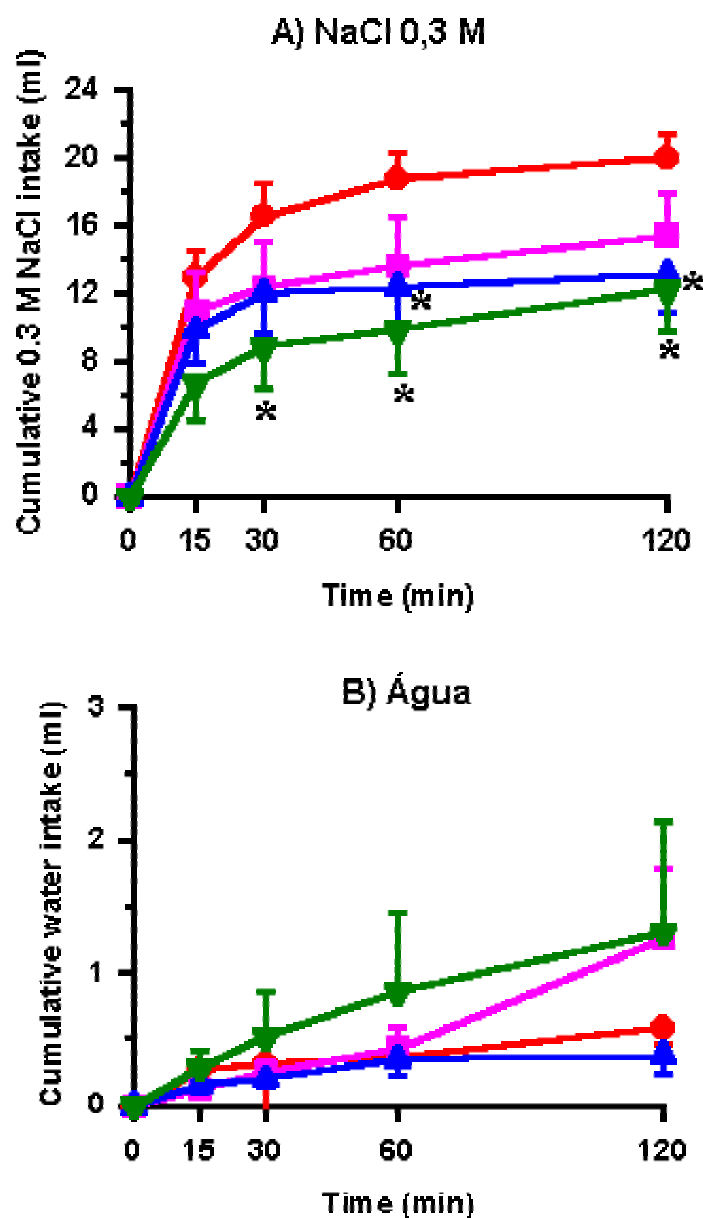
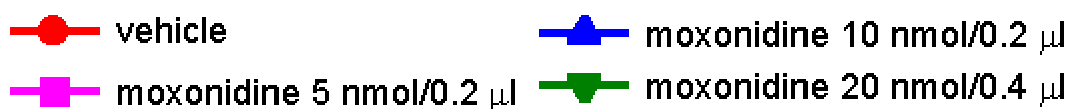


Figura 8: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio e B) água associada à ingestão de NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções unilaterais de veículo ou moxonidina (5 , 10 e 20 nmol/1 μl) no complexo amigdalóide. Os resultados são expressos como média ± EPM.

4. Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no núcleo central da amígdala (NCA) sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

As injeções de moxonidina no NCA em nenhuma das doses utilizadas (5 e 10 nmol/0,2 µl e 20 nmol/0,4 µl) foram capazes de inibir a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de 24 h de sódio [$F(3, 18) = 1,9; p > 0,05$] (Figura 9A).

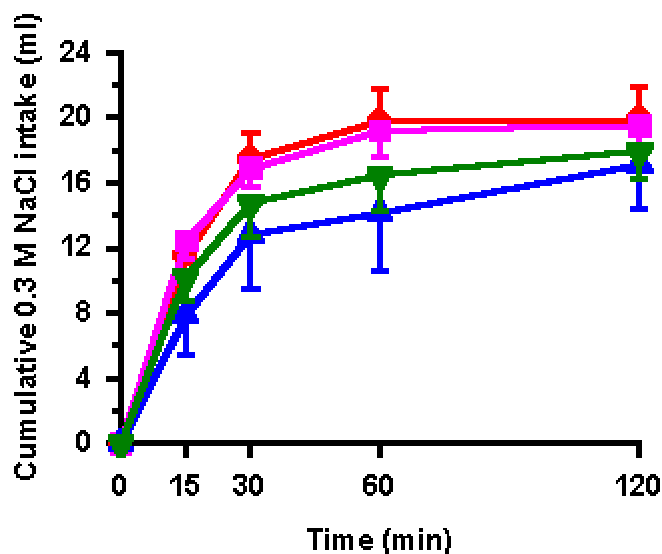
Em relação à ingestão de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M, as doses utilizadas de moxonidina reduziram a ingestão de água em relação ao controle nos tempos de 60 e 120 min [$F(3, 18) = 8,3; p < 0,05$] (Figura 9B).



* different from vehicle

(n = 7)

A) NaCl 0,3 M



B) Água

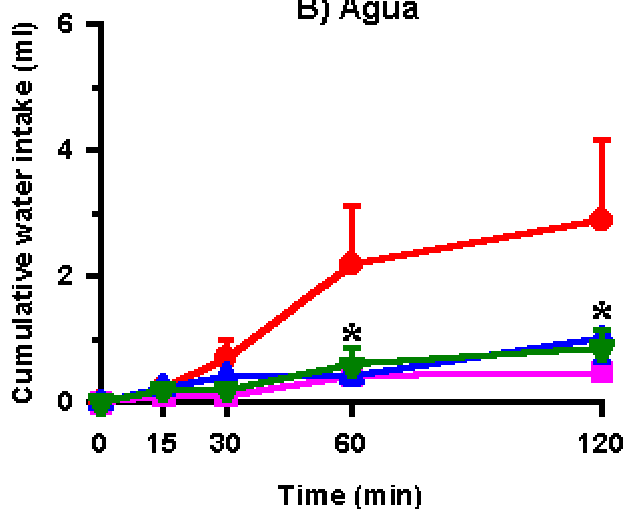


Figura 9: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio e B) água associada à ingestão de NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 e 10 nmol/0,2 μ l e 20 nmol/0,4 μ l) no núcleo central da amígdala. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

5. Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no núcleo basal da amígdala (NBA) sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

As administrações bilaterais de moxonidina (20 nmol/0,4 µl) no NBA reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo protocolo da depleção [$F(3, 12) = 8,9; p < 0,05$] (Figura 10A). Moxonidina nas doses de 5 e 10 nmol/0,2 µl não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M no protocolo estudado.

As injeções de moxonidina (20 nmol) promoveram um pequeno aumento da ingestão de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M no tempo de 120 min [$F(3, 12) = 6,3; p < 0,05$] (Figura 10B). Com as outras doses de moxonidina (5 e 10 nmol), a ingestão de água não foi diferente do controle em nenhum dos tempos estudados.

6. Efeitos da injeção de moxonidina no HL sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

A injeção unilateral de moxonidina (20 nmol/0,5 µl) no HL não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 h [$F(1,10) = 4,36$; $p > 0,05$] (Figura 11A), nem a ingestão de água associada a essa ingestão de NaCl 0,3 M [$F(1,10) = 2,85$; $p > 0,05$] (Figura 11B).

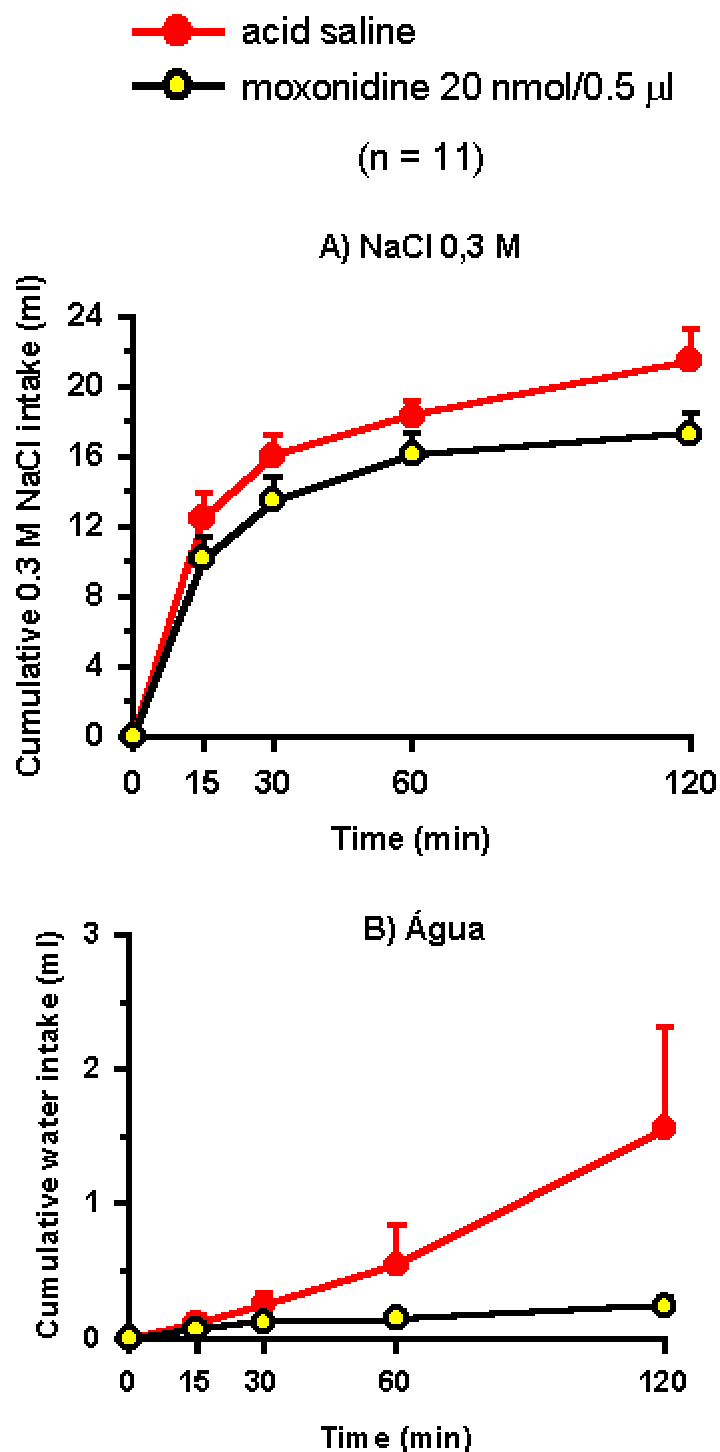


Figura 11: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio e B) água associada à ingestão de NaCl 0,3 M em ratos que receberam injeções de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/0,5 μ l) no HL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

7. Efeitos da associação de ioimbina e moxonidina injetadas no VL sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

A prévia administração icv do antagonista ioimbina na dose de 320 nmol/3 μ l aboliu o efeito inibitório da moxonidina (20 nmol/1 μ l) na ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,38) = 6,07; p < 0,05$] (Figura 12). As doses de 80 nmol/1 μ l e 160 nmol/2 μ l não afetaram a inibição da ingestão de NaCl 0,3 M produzida pela injeção icv de moxonidina, respectivamente, [$F(3,48) = 5,08; p < 0,05$] e [$F(3,32) = 8,10; p < 0,05$] (Figura 12A e 12B). A injeção icv de ioimbina na dose de 320 nmol associada com injeção de salina acidificada aumentou, em relação ao controle (veículo + salina acidificada), a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 h nos tempos de 60 e 120 min (Figura 12C). As outras doses de ioimbina (80 e 160 nmol) associados com salina acidificada não modificaram a ingestão de NaCl hipertônico (Figuras 12A e 12B).

Em relação à ingestão de água associada à ingestão de NaCl hipertônico nos ratos depletados de sódio não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos utilizados, [$F(3,48) = 1,11; p > 0,05$] (Figura 13).



* different from vehicle + acid saline
 + different from vehicle + moxonidine

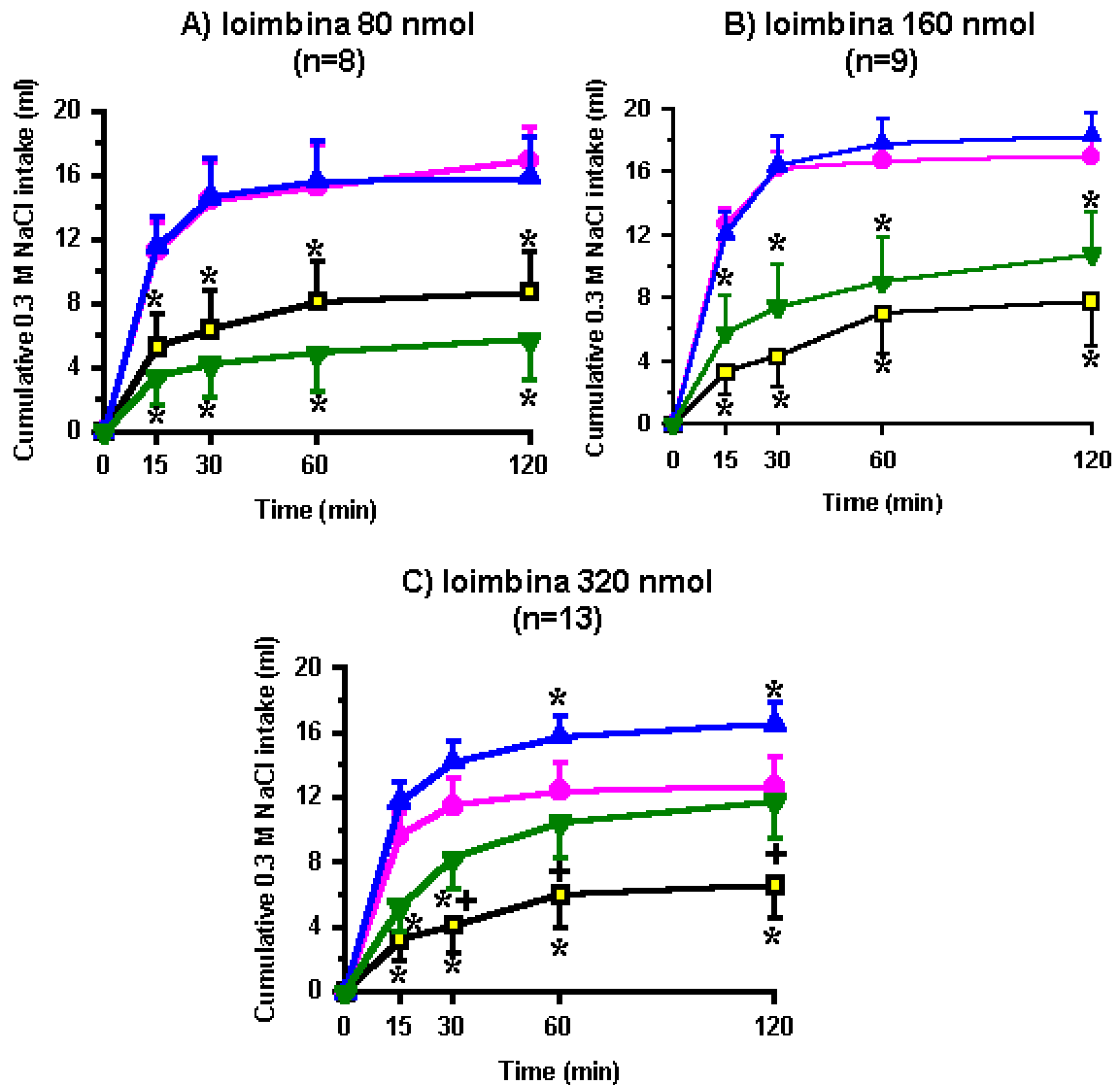


Figura 12: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de sódio em ratos tratados icv com veículo ou A) ioimbina 80 nmol/1 μ l, B) ioimbina 160 nmol/2 μ l e C) ioimbina 320 nmol/3 μ l previamente à injeção icv de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

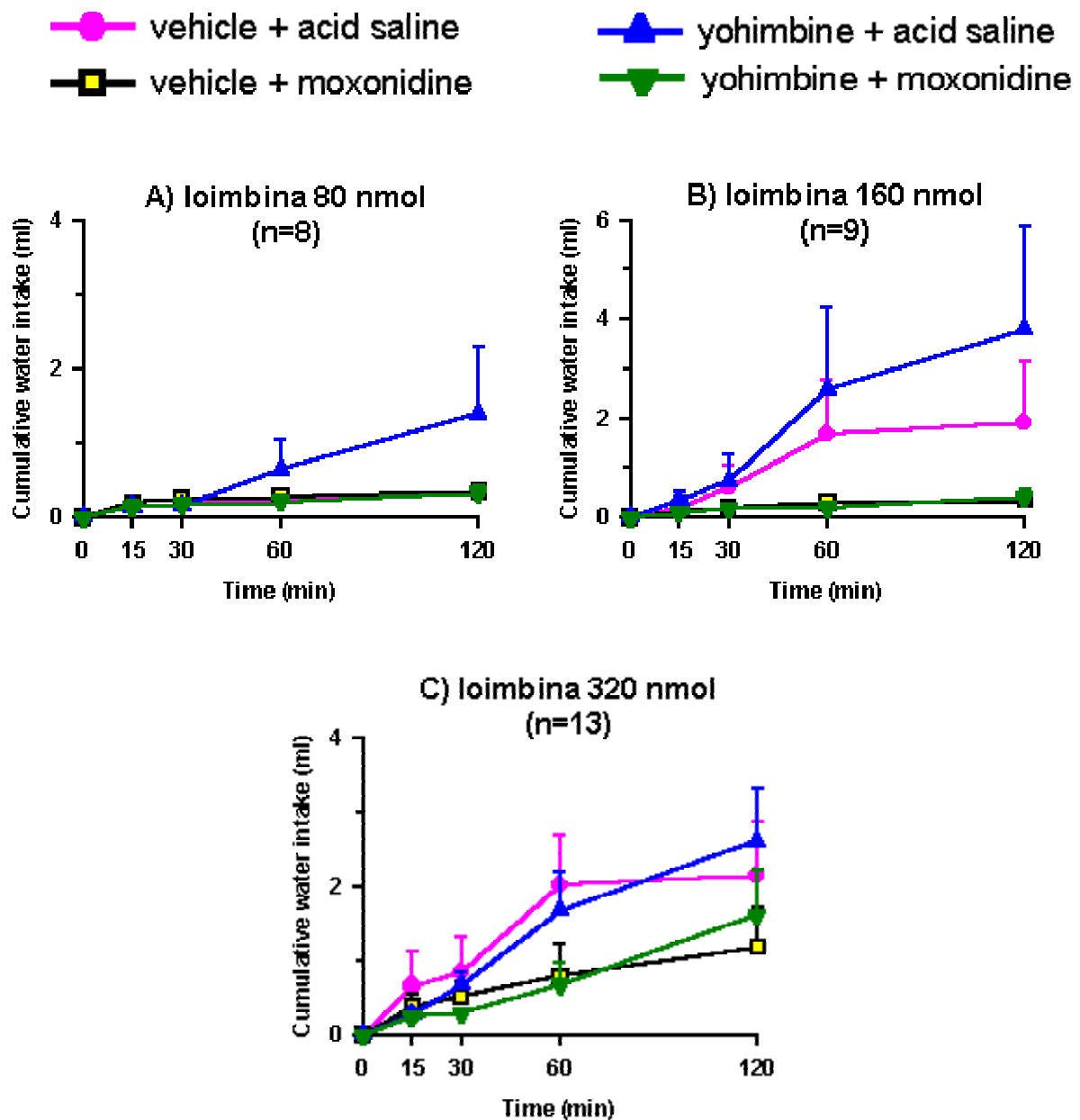


Figura 13: Ingestão cumulativa de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de NaCl 0,3 M em ratos tratados icv com veículo ou A) ioimbina 80 nmol/1 μ l, B) ioimbina 160 nmol/2 μ l e C) ioimbina 320 nmol/3 μ l previamente à injeção icv de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

8. Efeitos da associação de RX 821002 (RX) e moxonidina injetados no VL sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.

A prévia administração do antagonista RX no VL nas doses de 40 $[F(3, 48) = 7,05; p < 0,05]$ e 80 nmol/1 μ l $[F(3, 108) = 49,57; p < 0,05]$ (Figura 14) aboliu o efeito inibitório da moxonidina (20 nmol/1 μ l) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, enquanto que a dose de 20 nmol/1 μ l de RX não foi capaz de alterar o efeito inibitório da moxonidina na ingestão de NaCl 0,3 M (Figura 14A). A injeção de RX (40 nmol/1 μ l) associado com injeção de veículo no VL aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M (Figura 14B). As outras doses de RX (20 e 80 nmol/1 μ l) associados com veículo não modificaram a ingestão de NaCl hipertônico (Figuras 14A e 14C).

Em um dos grupos de animais estudados, moxonidina (20 nmol/1 μ l) também reduziu a ingestão de água $[F(3, 108) = 9,90; p < 0,05]$ (Figura 15A). Esse efeito da moxonidina não foi modificado pelo RX na dose de 20 nmol (Figura 15A). Nos demais grupos de animais não houve redução da ingestão de água quando os animais foram tratados apenas com moxonidina (Figura 15B e 15C), uma vez que a ingestão de água mesmo nos controles já foi muito pequena o que é comum nesse tipo de tratamento que é mais específico para induzir ingestão de solução de NaCl hipertônica.

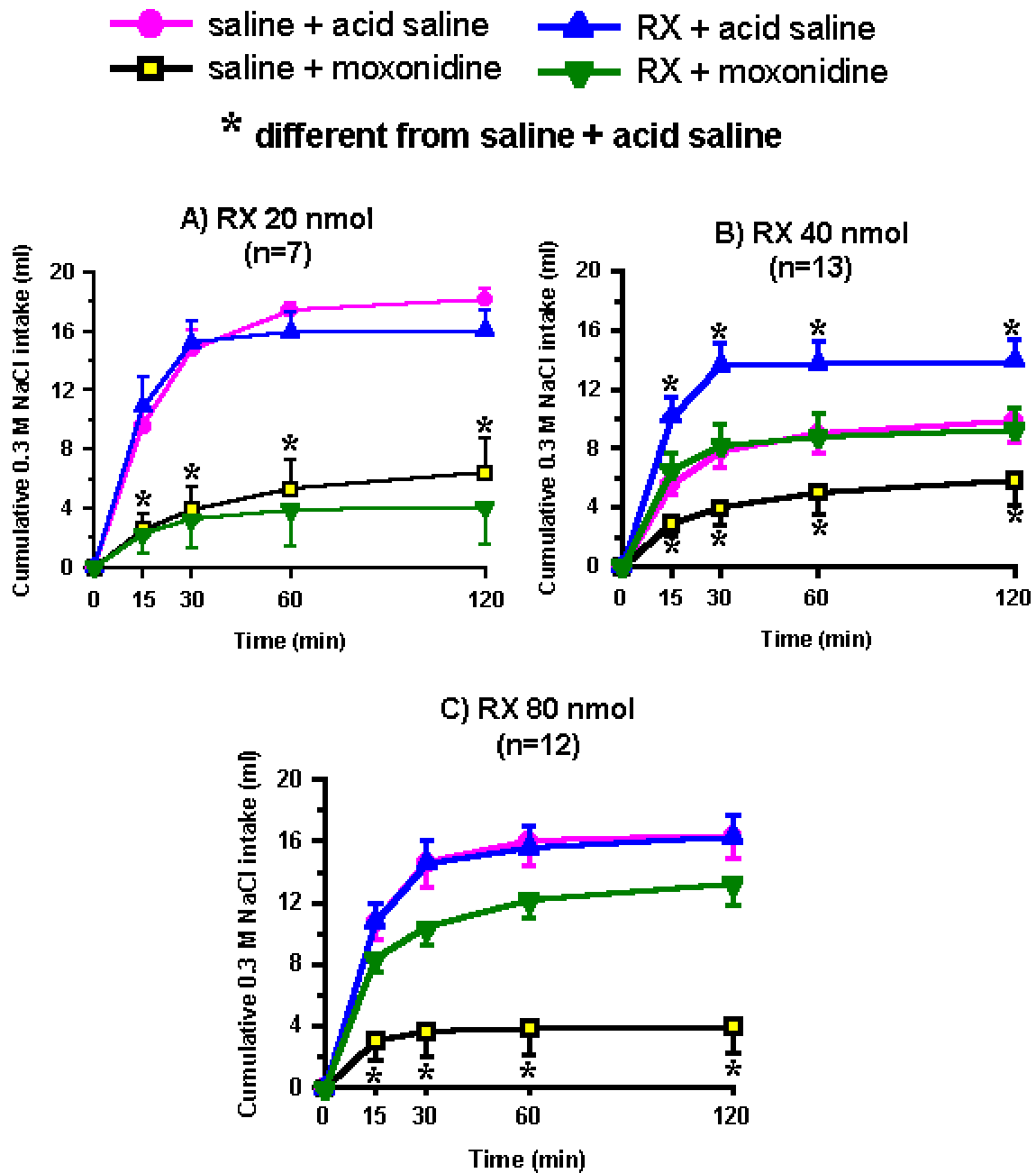


Figura 14: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de NaCl 0,3 M em ratos tratados icv com salina ou o antagonista RX 821002 (RX), sendo A) RX 20 nmol/1 μ l, B) RX 40 nmol/1 μ l e C) RX 80 nmol/1 μ l previamente à injeção icv de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

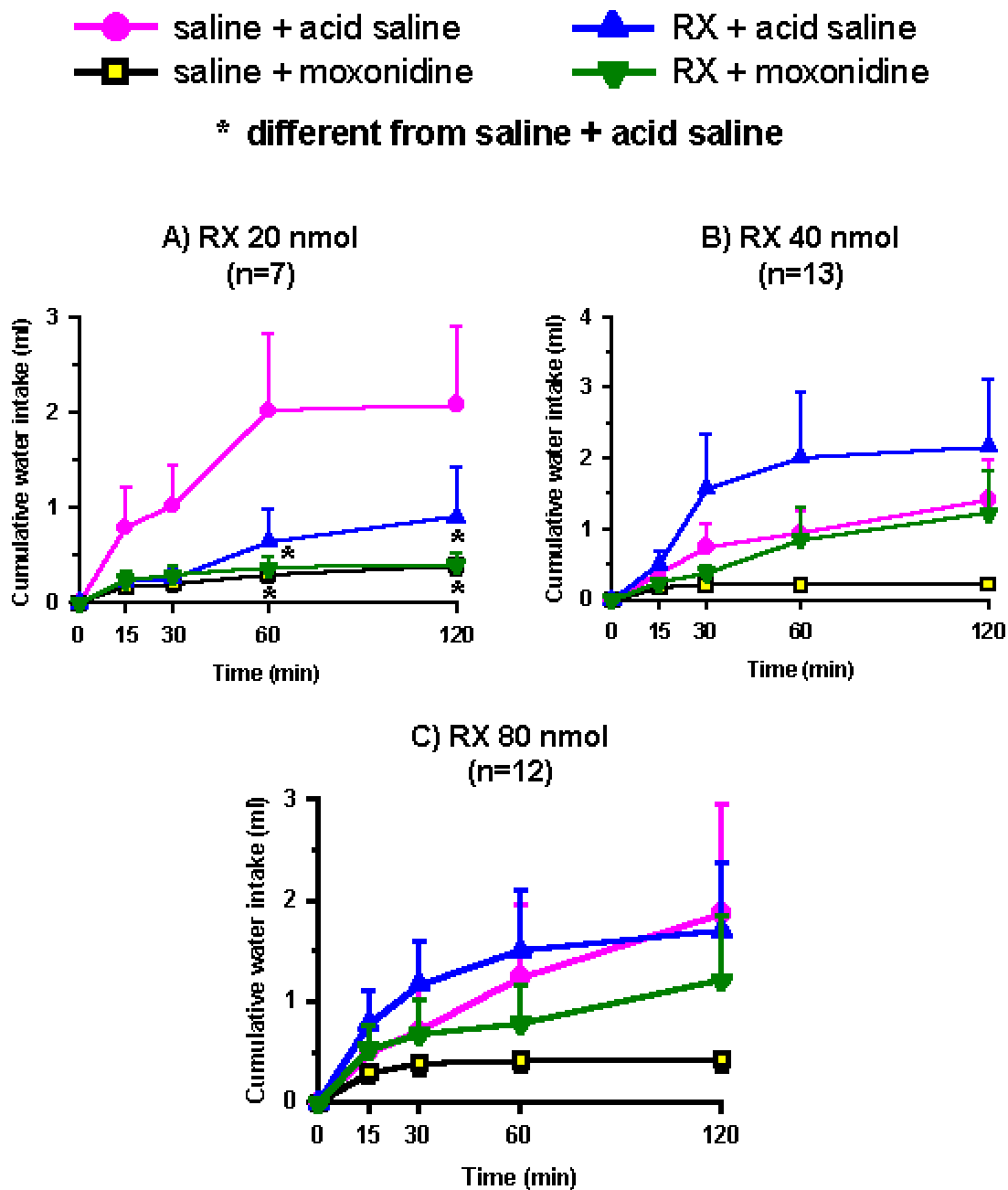


Figura 15: Ingestão cumulativa de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de NaCl 0,3 M em ratos tratados icv com salina ou o antagonista RX 821002 (RX), sendo A) RX 20 nmol/1 μ l, B) RX 40 nmol/1 μ l e C) RX 80 nmol/1 μ l previamente à injeção icv de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

9. *Efeitos da associação de SKF 86466 (SKF) e moxonidina injetados no VL sobre as ingestões de água e de NaCl hipertônico em ratos depletados de sódio.*

SKF na dose de 640 nmol/1 μ l aboliu o efeito inibitório da moxonidina (20 nmol/1 μ l) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3, 18) = 5,85; p < 0,05$], (Figura 16). Já as injeções prévias de SKF nas doses de 160 e 320 nmol/1 μ l não foram capazes de reverter o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M (Figura 16A e Figura 16B).

Em relação à ingestão de água que ocorre paralelamente à ingestão de NaCl 0,3 M, não houve diferenças significativas nos grupos dos animais tratados com SKF 160 nmol [$F(2, 12) = 0,49; p > 0,05$] (Figura 17A) e SKF 640 nmol [$F(3, 18) = 1,38; p > 0,05$] (Figura 17C). No grupo de animais tratados com SKF 320 nmol, a injeção de moxonidina reduziu a ingestão de água no tempo de 120 min e a injeção prévia de SKF 320 nmol não modificou esse efeito da moxonidina [$F(2, 12) = 5,79; p < 0,05$] (Figura 17B).



* different from saline + acid saline

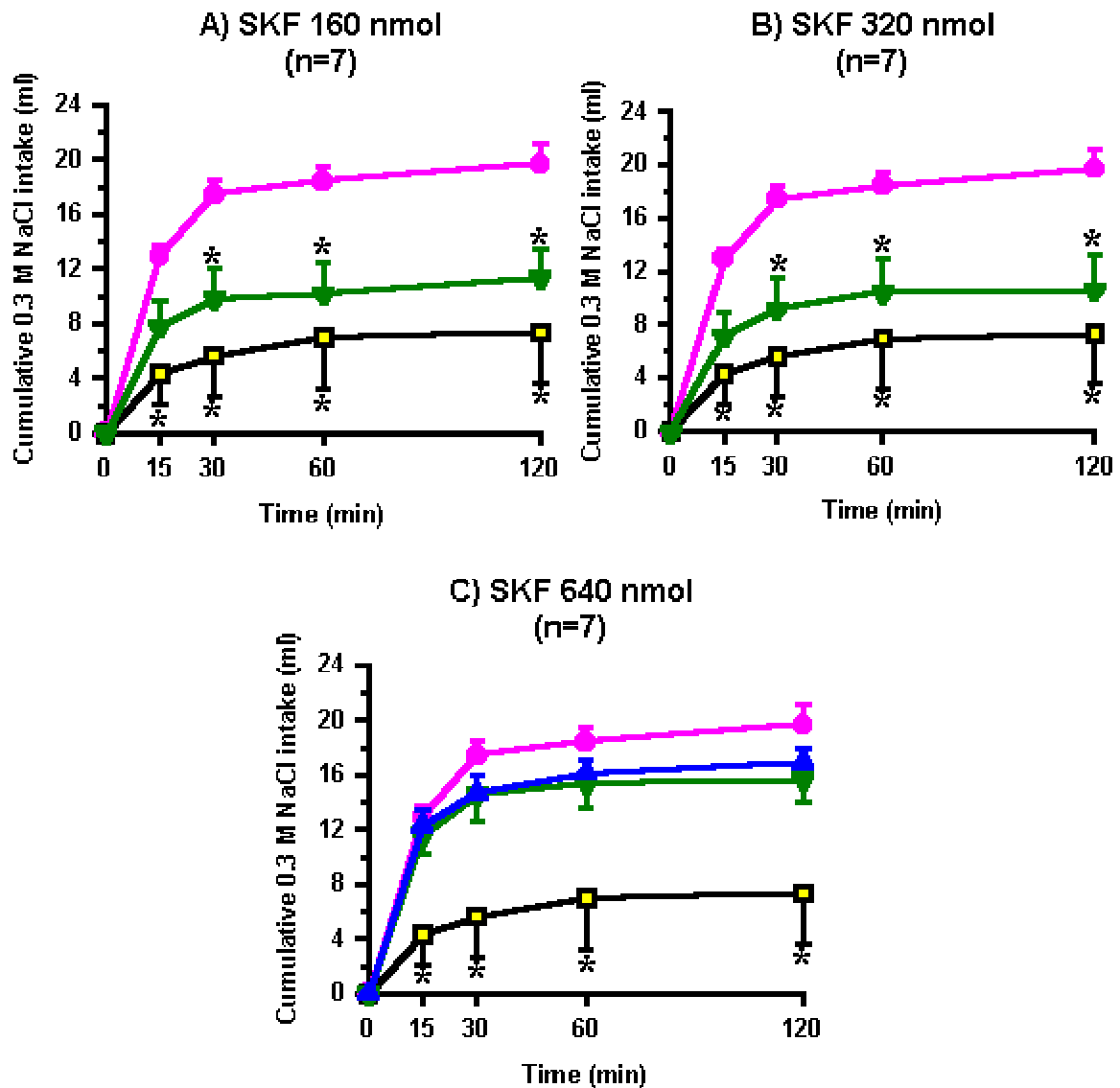


Figura 16: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de NaCl 0,3 M em ratos tratados icv com salina ou o antagonista SKF 86466 (SKF), sendo A) SKF 160 nmol/1 μ l, B) SKF 320 nmol/1 μ l e C) SKF 640 nmol/1 μ l previamente à injeção icv de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l). Os resultados são expressos como média \pm EPM.



* different from saline + acid saline

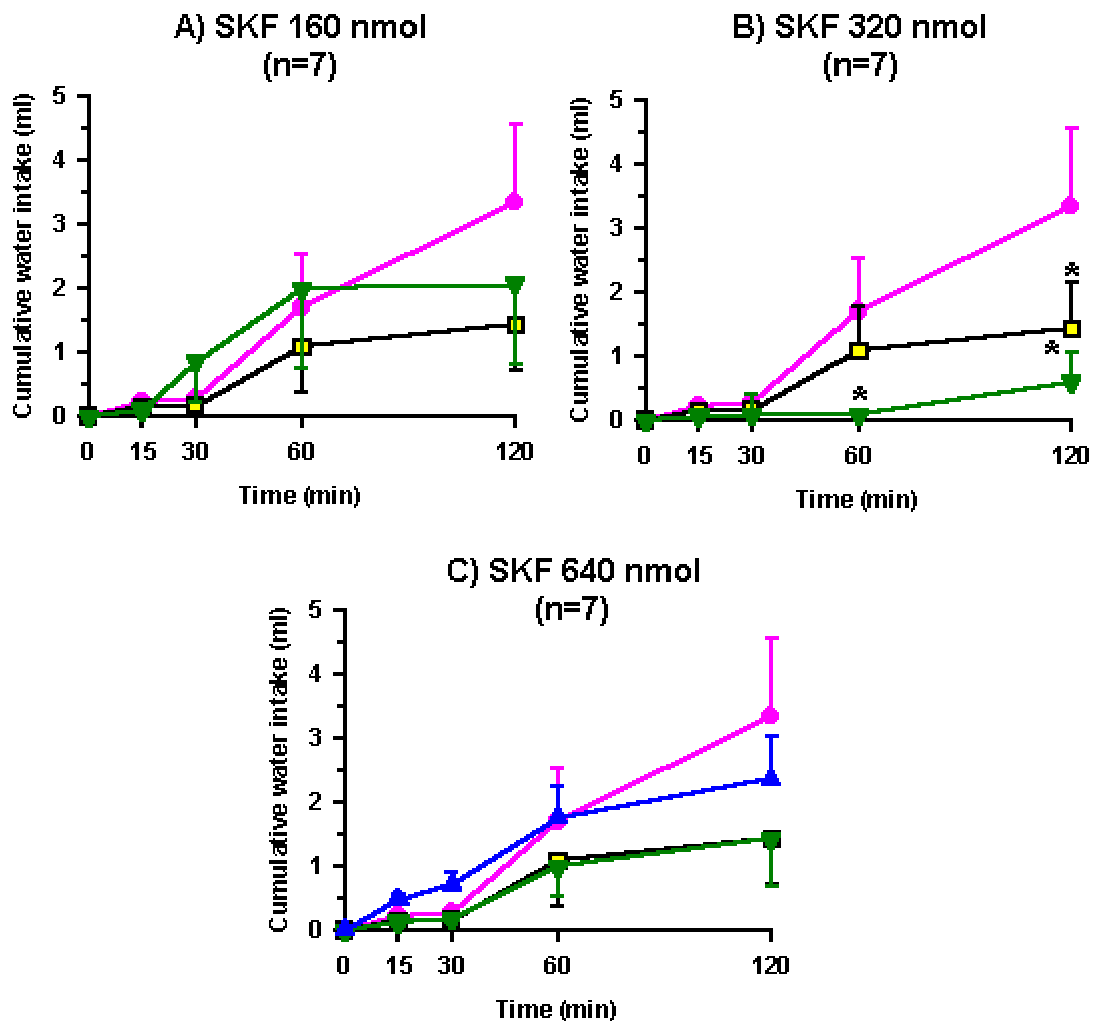


Figura 17: Ingestão cumulativa de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 24 h de depleção de NaCl 0,3 M em ratos tratados icv com salina ou o antagonista SKF 86466 (SKF), sendo A) SKF 160 nmol/1 μ l, B) SKF 320 nmol/1 μ l e C) SKF 640 nmol/1 μ l previamente à injeção icv de salina acidificada ou moxonidina (20 nmol/1 μ l). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

10. Efeitos da injeção prévia icv de moxonidina sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados.

A injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL produziu resposta pressora [$F(3,18) = 14,7; p < 0,05$], porém não promoveu alterações na frequência cardíaca [$F(3,18) = 0,7; p > 0,05$], (Tabela 1, Figura 18). Moxonidina (MOXO) nas doses utilizadas (20, 40 e 80 nmol) não promoveu alterações nem na pressão arterial média (PAM) nem na frequência cardíaca (FC) (Tabela 1). Moxonidina nas doses de 20 e 40 nmol/1 μ l não foi capaz de prevenir o efeito pressor da ANG II (Figura 18A), mas na dose de 80 nmol/2 μ l reduziu o efeito pressor produzido pela ANG II, (Figura 18A).

Carbacol (4 nmol/1 μ l) injetado no VL produziu respostas pressora [$F(3,24) = 32,6; p < 0,05$] e bradicárdica [$F(3,24) = 3,5; p < 0,05$] (Tabela 2, Figura 19). A administração prévia de moxonidina na dose de 20 nmol não afetou a resposta pressora produzida pela ativação colinérgica, porém a dose de 80 nmol reduziu parcialmente o efeito pressor do carbacol (Figura 19A). Em relação a variações na FC, o tratamento prévio com moxonidina não modificou a resposta produzida pelo carbacol (Figura 19B).

Tabela 1: Valores absolutos e variações da PAM (mmHg) e FC (bpm) em ratos que receberam injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) 20 minutos após injeção de veículo ou moxonidina (MOXO).

Tratamento	Grupo MOXO 20 (n=10)		Grupo MOXO 40 (n=8)		Grupo MOXO 80 (n=7)	
	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC
pré-veículo	121±3	396±17	117±3	421±16	120±4	420±19
pós-veículo	118±3	379±8	114±2	396±18	122±3	411±12
variação	-2±1	-17±13	-2±1	-25±15	2±2	-9±8
pré-ANG	117±3	364±9	111±2	398±15	116±5	404±20
pós-ANG	135±5*	381±18	131±3*	393±17	132±5*	409±13
variação	18±3*	18±12	20±2*	-5±11	16±1*	5±13
pré-moxo	119±2	398±15	113±3	369±14	116±3	383±19
pós-moxo	115±2	376±12	113±4	383±14	117±4	380±19
variação	-4±2	-23±10	0±2	14±12	1±2	-3±7
pré-ANG [§]	115±3	370±11	114±4	410±13	120±4	396±13
pós-ANG [§]	127±4*	382±17	135±4*	394±8	127±4	386±11
variação	12±2*	13±9	21±3*	-16±10	7±2⁺	-10±7

Valores expressos como média ± EPM. * diferente de veículo (p<0,05);
⁺ diferente de veículo + ANG II (p<0,05); [§] após o tratamento com moxonidina.

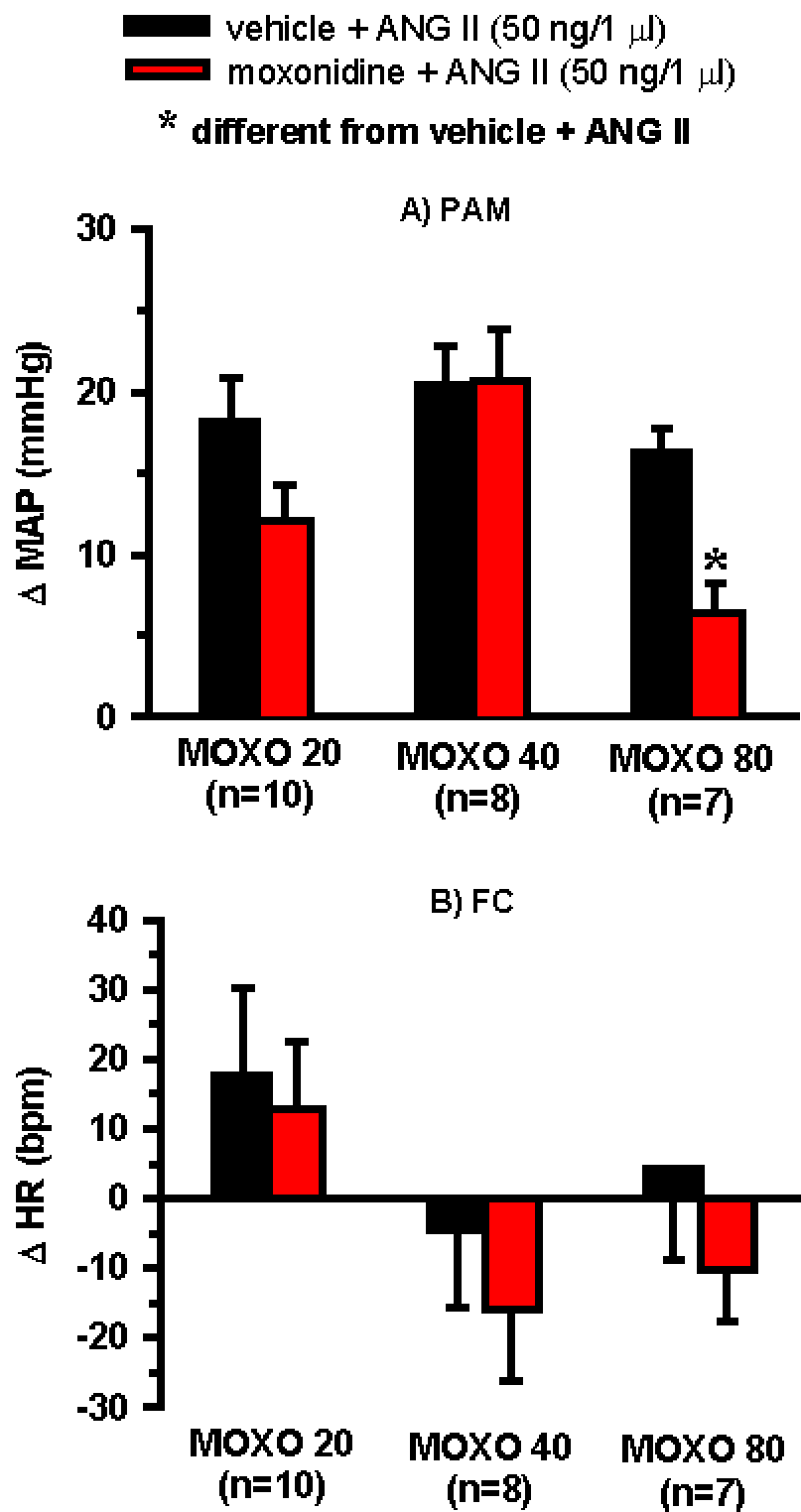


Figura 18: A) Aumento da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidos pela injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL 20 minutos após a injeção de veículo ou moxonidina (MOXO: 20, 40 nmol/1 μ l e 80 nmol/2 μ l) no VL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

Tabela 2: Valores absolutos e variações da PAM (mmHg) e FC (bpm) em ratos que receberam injeção icv de carbacol (4 nmol/1 μ l) 20 minutos após injeção de veículo ou moxonidina (MOXO).

Tratamento	Grupo MOXO 20 (n=11)		Grupo MOXO 80 (n=7)	
	PAM	FC	PAM	FC
pré-veículo	118 \pm 2	368 \pm 10	118 \pm 3	391 \pm 20
pós-veículo	114 \pm 2	362 \pm 11	122 \pm 3	395 \pm 20
variação	-4\pm1	-6\pm10	4\pm1	-4\pm7
pré-carbacol	112 \pm 2	358 \pm 10	117 \pm 3	402 \pm 20
pós-carbacol	154 \pm 4	339 \pm 10	155 \pm 3	353 \pm 13
variação	42\pm4 *	-19\pm12	38\pm3 *	-49\pm15 *
pré-moxo	115 \pm 2	367 \pm 6	115 \pm 3	400 \pm 11
pós-moxo	113 \pm 2	374 \pm 9	118 \pm 3	381 \pm 14
variação	-2\pm2	7\pm9	3\pm2	-19\pm10
pré-carbacol [§]	113 \pm 3	380 \pm 11	109 \pm 4	372 \pm 10
pós-carbacol [§]	148 \pm 4	326 \pm 12	134 \pm 3	347 \pm 13
variação	35\pm3 *	-54\pm9 *	25\pm4 * ⁺	-25\pm12

Valores expressos como média \pm EPM. * diferente de veículo (p<0,05);
⁺ diferente de veículo + carbacol (p<0,05); [§] após tratamento com moxonidina.

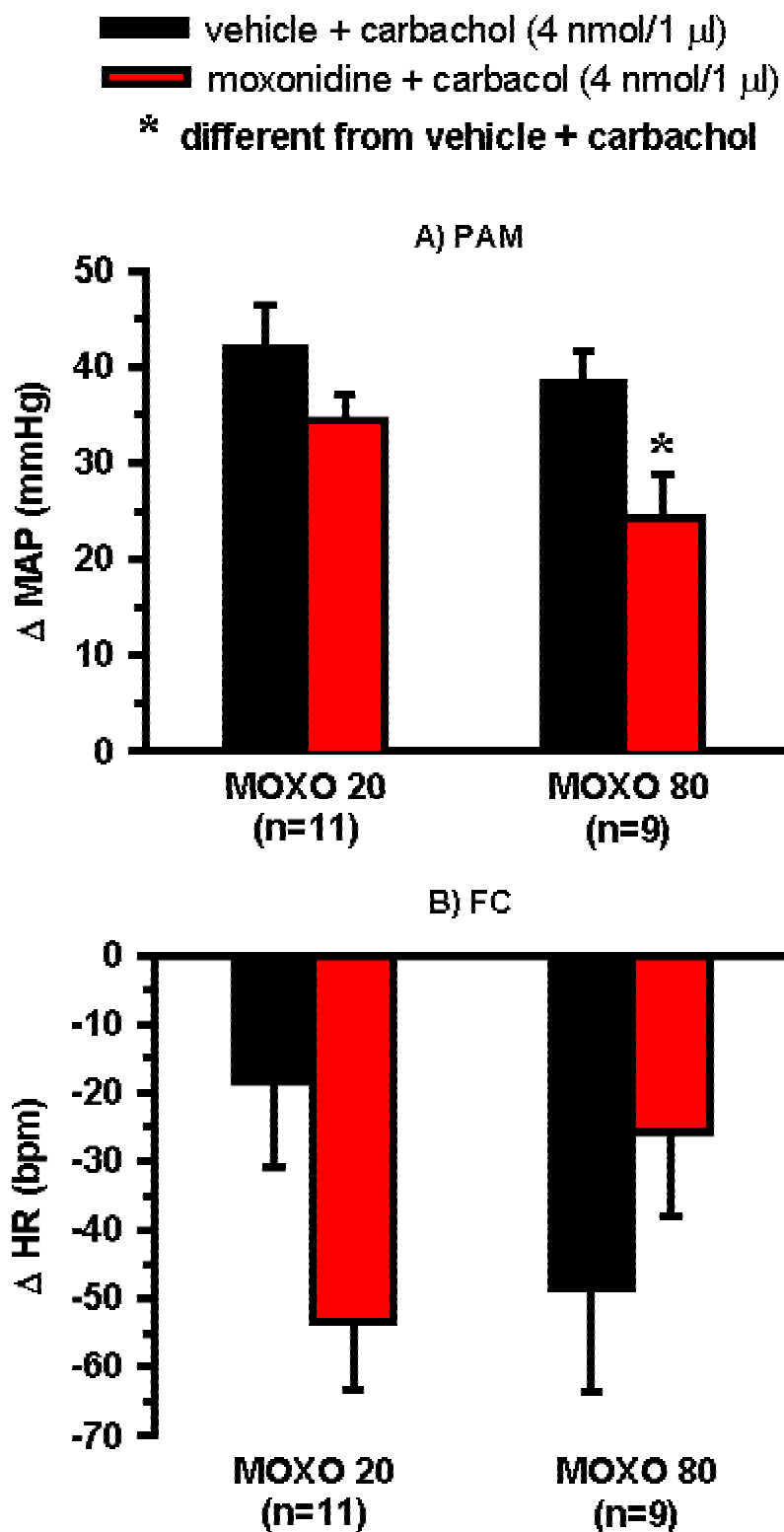


Figura 19: A) Aumento da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidos pela injeção de carbachol (4 nmol/1 μ l) no VL 20 minutos após a injeção de veículo ou moxonidina (MOXO: 20 nmol/1 μ l e 80 nmol/2 μ l) no VL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

11. Efeitos da associação de ioimbina e moxonidina injetadas no VL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II no VL em ratos acordados.

Em ratos normotensos (valores basais: PAM = $108,8 \pm 3,4$ mmHg e FC = $376 \pm 14,6$ bpm), a administração central (VL) de ANG II (50 ng/1 μ l) promoveu um aumento da PAM que foi reduzido pela administração prévia de moxonidina (80 nmol/2 μ l) [$F(3,18) = 7,1; p < 0,05$], (Figura 20A). Ioimbina (320 nmol/3 μ l) não promoveu alterações na PAM e FC basais, porém aboliu o efeito inibitório da moxonidina sobre a resposta pressora da ANG II (Figura 20).

Em relação às variações na FC, não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos realizados [$F(3,18) = 0,04; p > 0,05$], (Figura 20B).

█ vehicle + vehicle + ANG II █ vehicle + moxonidine + ANG II
█ yohimbine + vehicle + ANG II █ yohimbine + moxonidine + ANG II

* different from vehicle + vehicle + ANG II
 + different from vehicle + moxonidine + ANG II

(n=7)

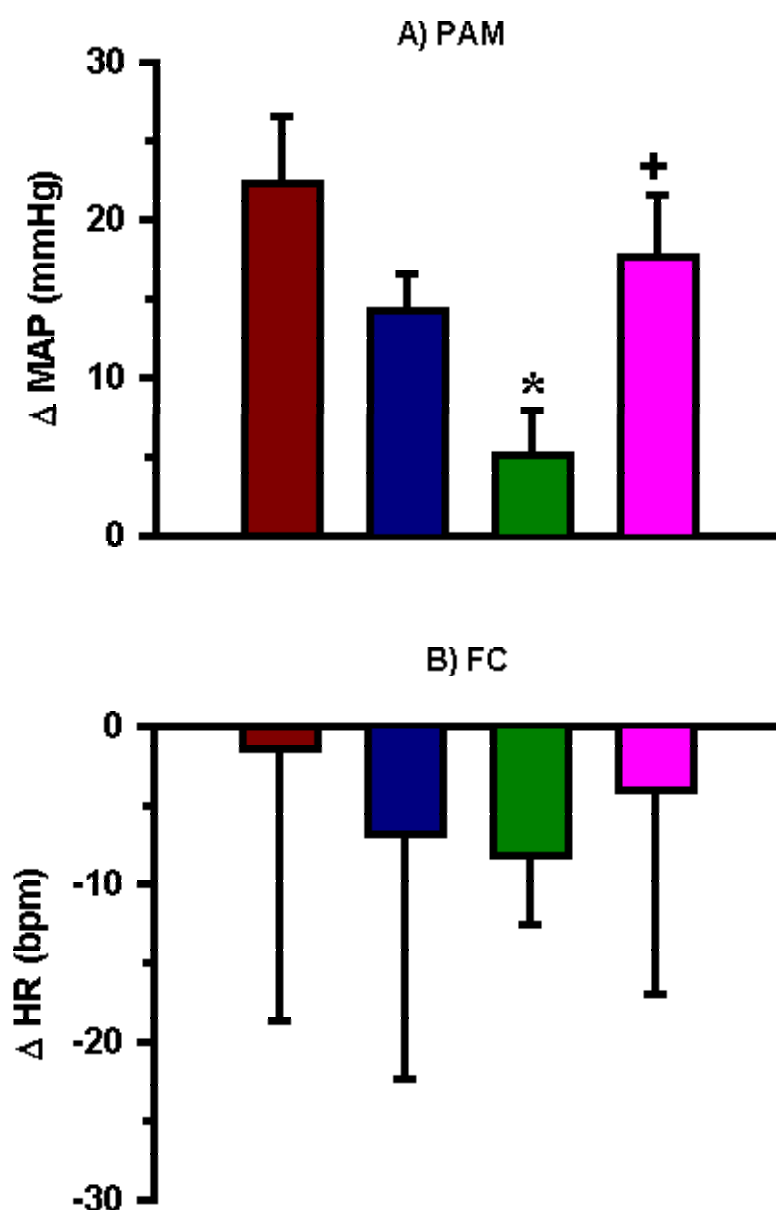


Figura 20: A) Aumento da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidos pela injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL de ratos previamente tratados com a associação de veículo ou ioimbina (320 nmol/3 μ l) + veículo ou moxonidina (80 nmol/2 μ l) no VL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

12. Efeitos da injeção de moxonidina no 4º V sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados.

Os valores basais da PAM e FC realizada em ratos normotensos foram: PAM = $119 \pm 2,5$ e 115 ± 3 mmHg; FC = 363 ± 9 e 386 ± 14 bpm, respectivamente, para os grupos da ANG II e carbacol.

Moxonidina (20 nmol/1 μ l) injetada no 4º V promoveu hipotensão e bradicardia (Figuras 21 e 22), que persistiram até o momento da injeção de ANG II ou carbacol.

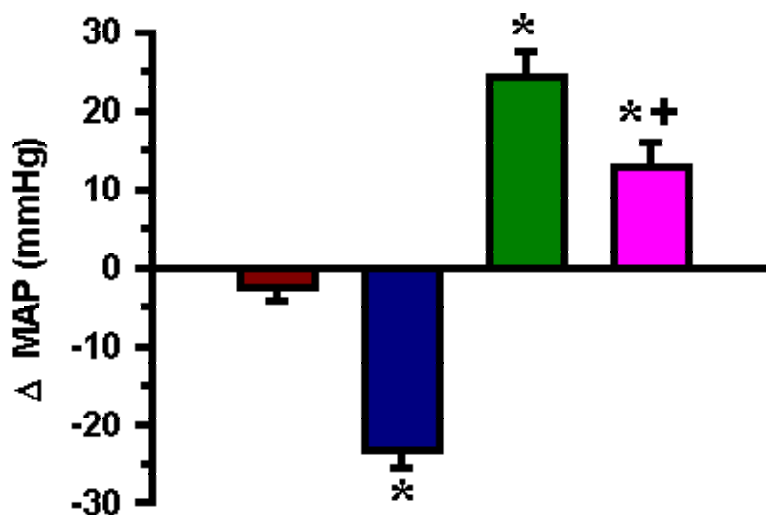
A injeção de moxonidina (20 nmol/1 μ l) no 4º V reduziu o efeito pressor da ANG II (50 ng/1 μ l) injetada no VL [$F(3, 34) = 52,17$; $p < 0,05$], mas, em relação a variações na FC, não houve diferença em relação ao grupo veículo + ANG II e apenas a injeção de moxonidina reduziu a FC [$F(3, 34) = 13,10$; $p < 0,05$], (Figura 21).

A injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL produziu resposta pressora [$F(3, 21) = 34,17$; $p < 0,05$], sendo que esse efeito não foi alterado pela injeção prévia de moxonidina (20 nmol/1 μ l) no 4º V (Figura 22A). Em relação a variações na FC, somente a injeção de moxonidina no 4º V promoveu bradicardia [$F(3, 21) = 12,18$; $p < 0,05$], (Figura 22B), mas não houve diferenças significativas entre os animais tratados com veículo ou moxonidina + carbacol (Figura 22B).

█ vehicle █ vehicle + ANG II
█ moxonidine 20 nmol █ moxonidine 20 nmol + ANG II

* different from vehicle
 + different from vehicle + ANG II
 (n=11)

A) PAM



B) FC

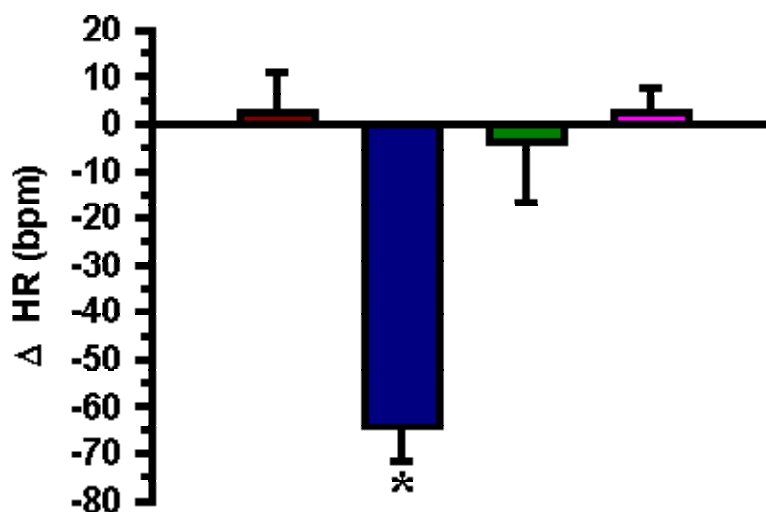


Figura 21: A) Variações da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidas pela injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL 20 minutos após a injeção de veículo ou moxonidina (20 nmol/1 μ l) no 4^o V. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

■ vehicle ■ vehicle + carbachol
■ moxonidine 20 nmol ■ moxonidine 20 nmol + carbachol

* different from vehicle

(n=9-10)

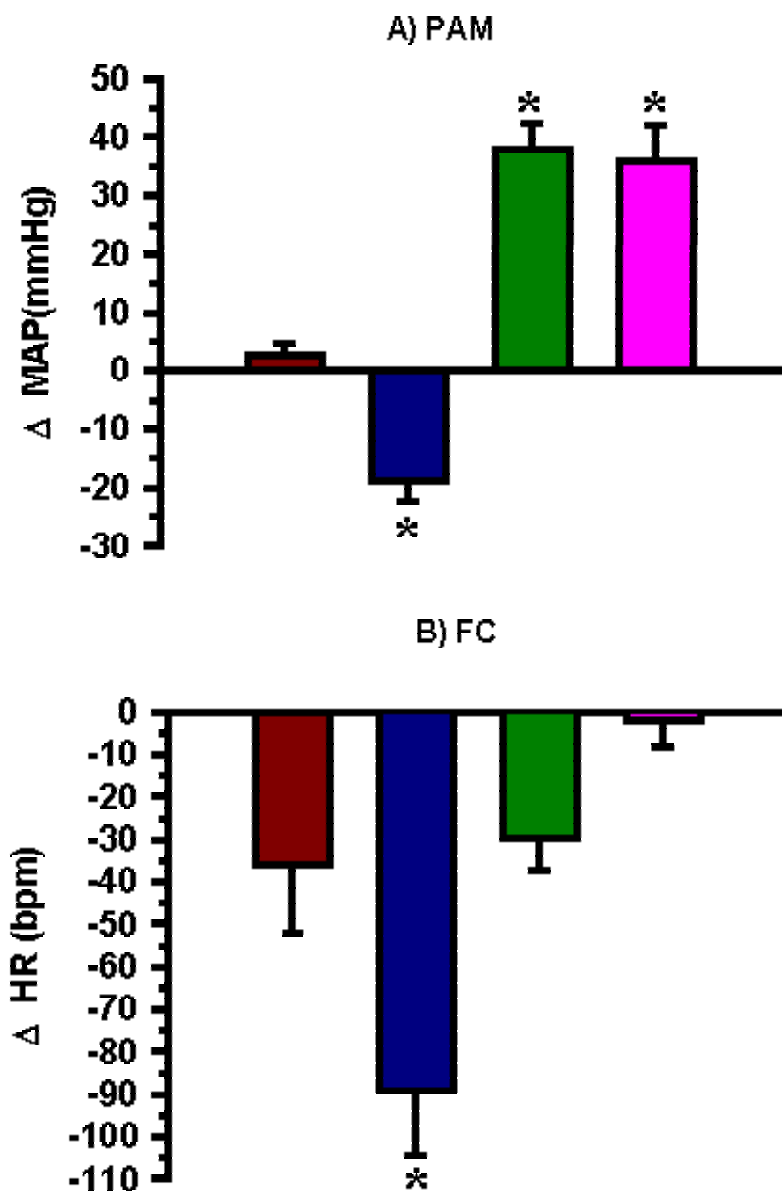


Figura 22: A) Variações da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidas pela injeção de carbachol (4 nmol/1 μ l) no VL 20 minutos após a injeção de veículo ou moxonidina (20 nmol/1 μ l) no 4^o V. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

13. Efeitos da injeção de moxonidina no HL sobre as respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL em ratos acordados.

A medida da PAM e FC foi realizada em ratos normotensos (valores basais: PAM = $117,6 \pm 2,8$ e 118 ± 1 mmHg; FC = $410 \pm 20,5$ e $411 \pm 8,8$ bpm, respectivamente, para os grupos da ANG II e carbacol).

A administração de moxonidina 20 nmol/0,5 μ l no HL não promoveu variações significativas dos parâmetros cardiovasculares analisados (Figura 23 e 24). ANG II (50 ng/1 μ l) no VL produziu resposta pressora e que foi atenuada pela prévia injeção de moxonidina no HL [$F(3,21) = 13,8$; $p < 0,05$], (Figura 23A). Não houve alterações significativas entre os diferentes tratamentos no que se refere a variações da FC [$F(3,21) = 0,6$; $p > 0,05$], (Figura 23B).

A injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL desencadeou resposta pressora [$F(3,15) = 33,9$; $p < 0,05$] que não foi modificada pela administração prévia de moxonidina (20 nmol) no HL (Figura 24A). Alterações significativas na FC também não foram observadas [$F(3,15) = 0,4$; $p > 0,05$], (Figura 24B).

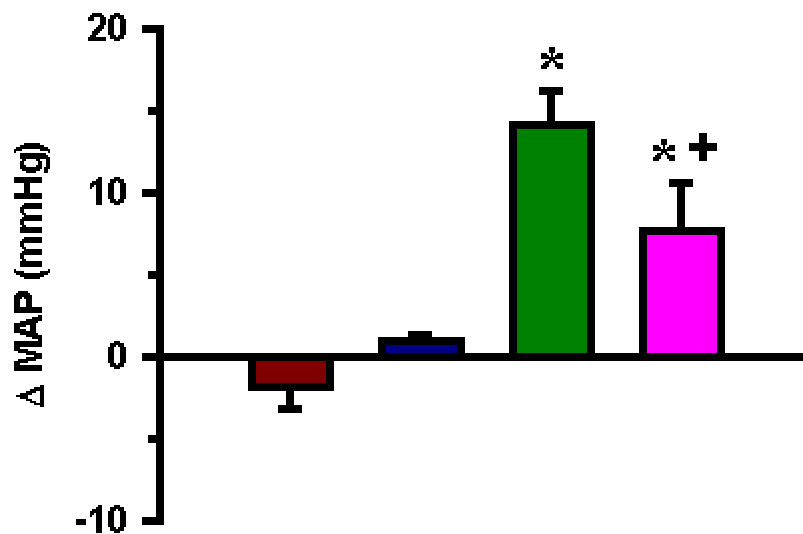
■ vehicle ■ vehicle + ANG II
■ moxonidine 20 nmol ■ moxonidine 20 nmol + ANG II

* different from vehicle

+ different from vehicle + ANG II

(n=8)

A) PAM



B) FC

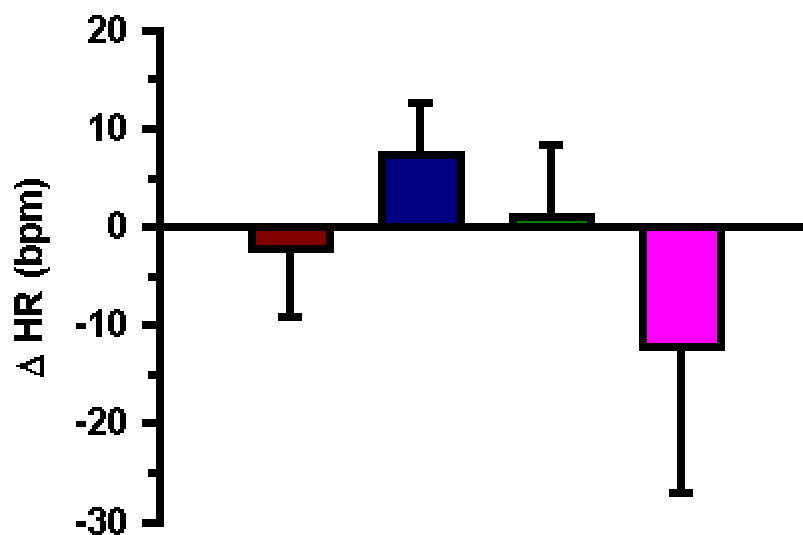


Figura 23: A) Variações da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidas pela injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL 20 minutos após a injeção de veículo ou moxonidina (20 nmol/0,5 μ l) no HL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

■ vehicle ■ vehicle + carbachol
■ moxonidine 20 nmol ■ moxonidine 20 nmol + carbachol

* different from vehicle
(n=6)

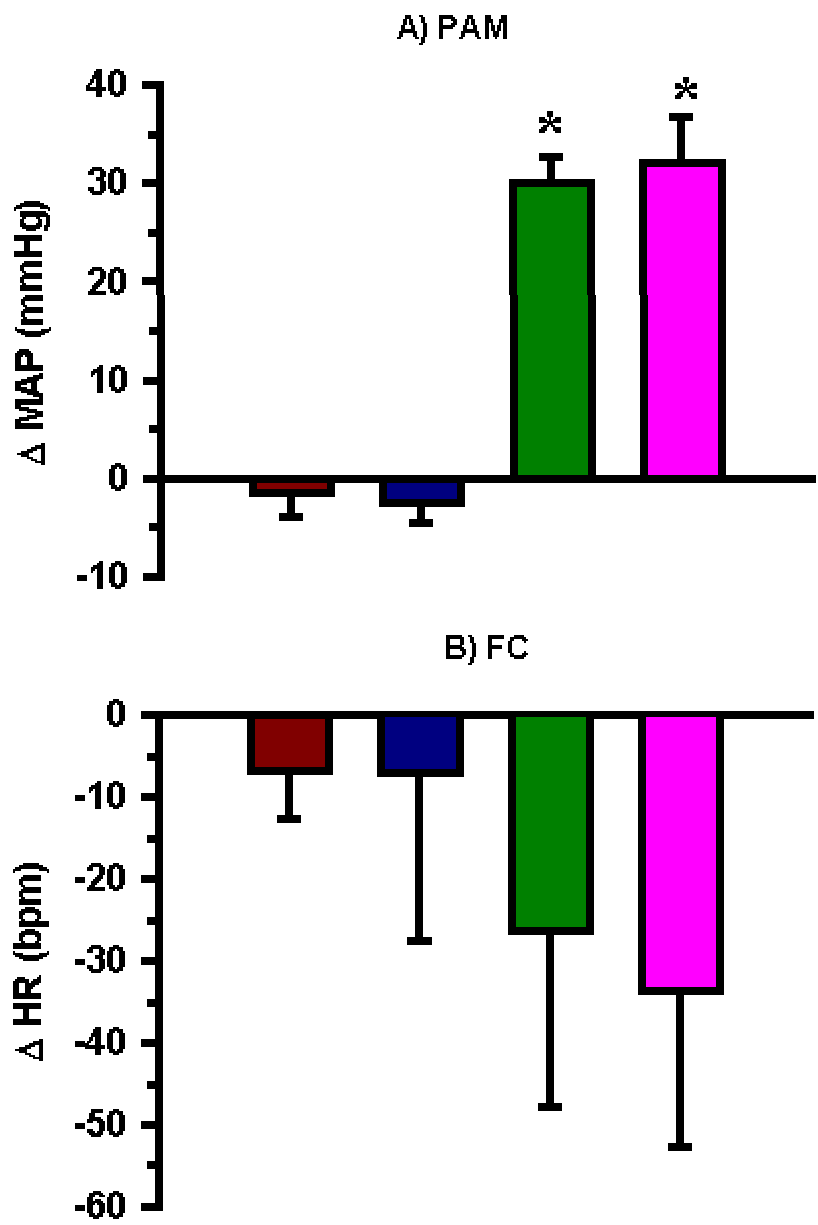


Figura 24: A) Variações da pressão arterial média (Δ MAP) e B) variações da frequência cardíaca (Δ HR) produzidas pela injeção de carbachol (4 nmol/1 μ l) no VL 20 minutos após a injeção de veículo ou moxonidina (20 nmol/0,5 μ l) no HL. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

14. Expressão de c-fos após administração de moxonidina no VL em ratos normalmente hidratados e saciados.

Foi observado que em comparação com os ratos que receberam injeção de veículo, nos ratos que receberam injeção de moxonidina (20 nmol/1 μ l) no VL houve aumento da expressão de células positivas para c-fos nas seguintes estruturas cerebrais prosencefálicas: OVLT [$F(1,6) = 6,9; p < 0,05$], ASLips [$F(1,12) = 16,30; p < 0,05$], NPMv [$F(1,5) = 22,9; p < 0,05$], NPV [$F(1,6) = 12,1; p < 0,05$] e NOS [$F(1,6) = 6,8; p < 0,05$], (Figuras 25 e 26).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados nas demais áreas analisadas: NSH [$F(1,6) = 0,294; p > 0,05$], ASLcont [$F(1,12) = 1,6; p > 0,05$], NPMd [$F(1,6) = 2,02; p > 0,05$], OSF [$F(1,6) = 2,59; p > 0,05$] e Amg [$F(1,5) = 0,989; p > 0,05$], (Figura 25). Não foi observada nenhuma marcação para c-fos no HL de ratos tratados com moxonidina.

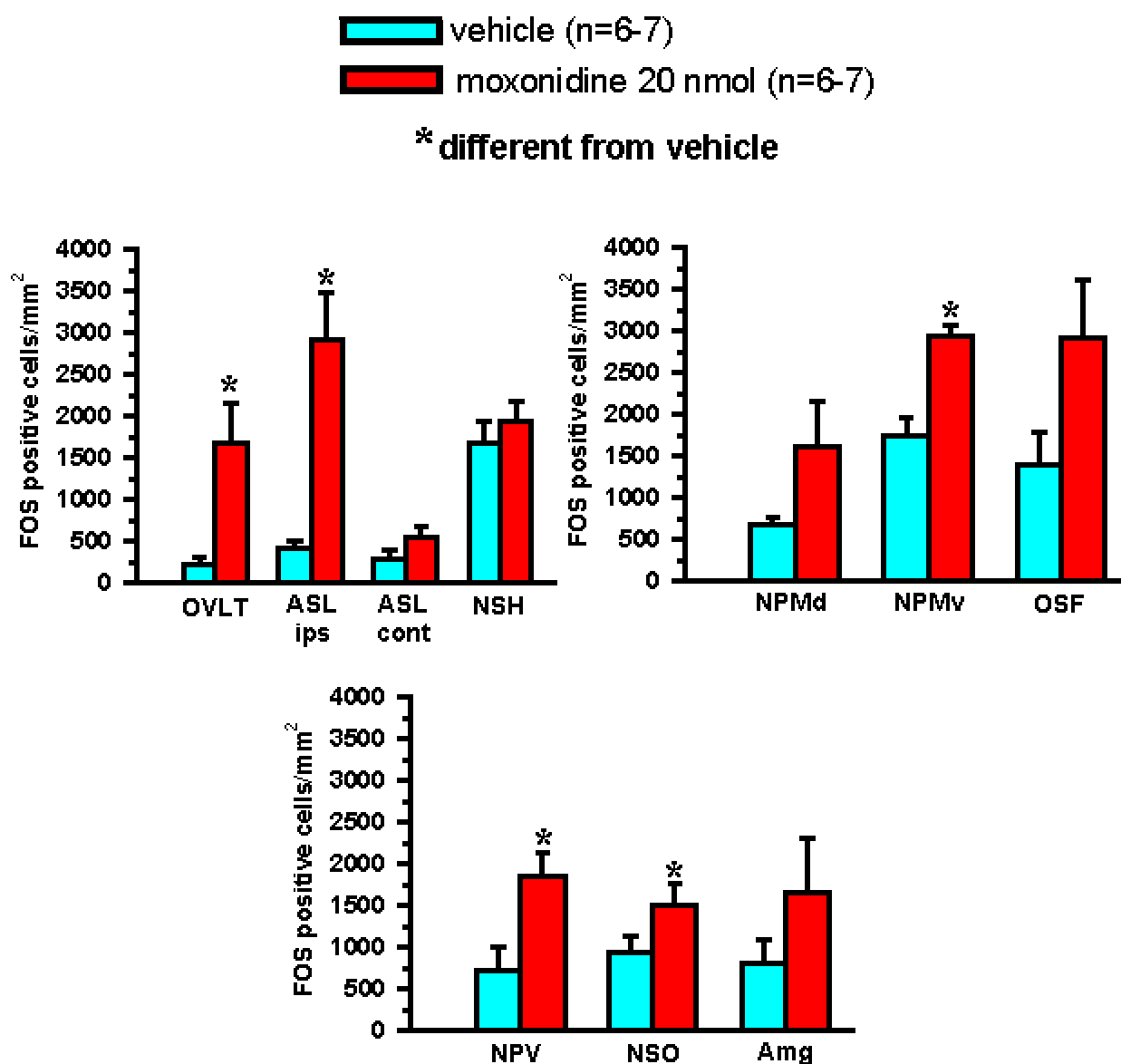


Figura 25: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) 1 h após a injeção de veículo ou moxonidina (20 nmol/1 μ l) no VL, sendo: OVLT (órgão vasculoso da lamina terminal), ASLips (área septal lateral ipsilateral), ASLcont (área septal lateral contralateral), NSH (núcleo septo-hipotalâmico), NPMd (núcleo preóptico mediano dorsal), NPMv (núcleo preóptico mediano ventral), OSF (órgão subfornical), NPV (núcleo paraventricular), NSO (núcleo supra-óptico) e Amg (complexo amigdalóide). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

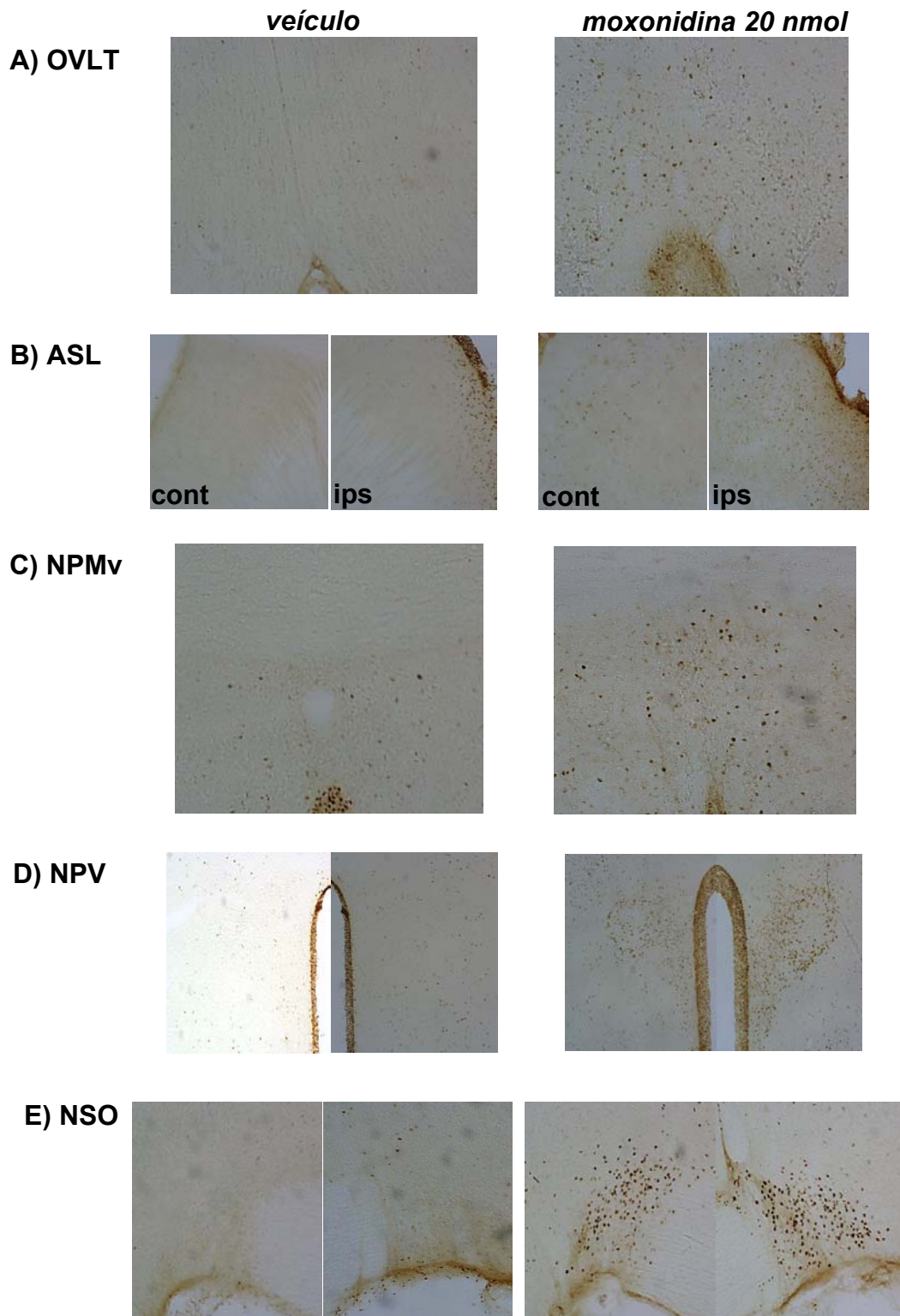


Figura 26: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de animais, tratados com veículo ou moxonidina (20 nmol/1 μ l), ilustrando a expressão da proteína c-fos nas seguintes áreas cerebrais: A) OVLT (órgão vasculoso da lâmina terminal); B) ASLcont (área septal lateral contralateral) e ASLips (área septal lateral ipsilateral); C) NPMv (núcleo preóptico mediano ventral), D) NPV (núcleo paraventricular), E) NSO (núcleo supra-óptico).

15. Expressão de c-fos após associação de moxonidina e ANG II injetadas no VL.

Comparado com o tratamento com salina, nos ratos que receberam apenas injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL foi observado aumento da expressão da proteína c-fos na ASLips [$F(1,3) = 18,04; p < 0,05$], NPMd [$F(1,3) = 24,12; p < 0,05$], NSH [$F(1,3) = 19,2; p < 0,05$], NPV [$F(1,3) = 39,2; p < 0,05$] e redução na ASLcont [$F(1,3) = 12,44; p < 0,05$] (Tabela 3). Nas demais áreas analisadas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois tratamentos.

Em todas as áreas analisadas não foram observadas diferenças significativas entre o grupo de animais que recebeu veículo ou moxonidina no VL (20 nmol/1 μ l) associado à injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) também no VL (Figuras 27 e 28). Não foi observada expressão de c-fos no HL.

Tabela 3: Marcação da proteína c-fos (células positivas/mm²) em animais que receberam injeção de salina ou ANG II (50 ng/1 µl) no VL 1 h antes de serem sacrificados.

<i>tratamento</i>	Células positivas c-fos/mm ²										
	n	OVLTL	ASL ips	ASL cont	NSH	NPMd	NPMv	OSF	NPV	NSO	Amg
<i>salina</i>	2-3	33,7 ±0,0	288 ±41	315 ±0,0	885 ±15	599 ±69	715 ±370	1146 ±168	675 ±43	2473 ±185	2123 ±45
<i>ANG II</i>	2-3	952 ±202	487 ±12*	141 ±31*	1670 ±113*	1385 ±90*	1273 ±88	668 ±298	1282 ±54*	2139 ±385	576 ±407

OVLTL (órgão vasculoso da lamina terminal), ASLips (área septal lateral ipsilateral), ASLcont (área septal lateral contralateral), NSH (núcleo septo-hipotalâmico), NPMd (núcleo preóptico mediano dorsal), NPMv (núcleo preóptico mediano ventral), OSF (órgão subfornical), NPV (núcleo paraventricular), NSO (núcleo supra-óptico) e Amg (complexo amigdalóide). Os resultados são expressos como média ± EPM. * **diferente de salina.**

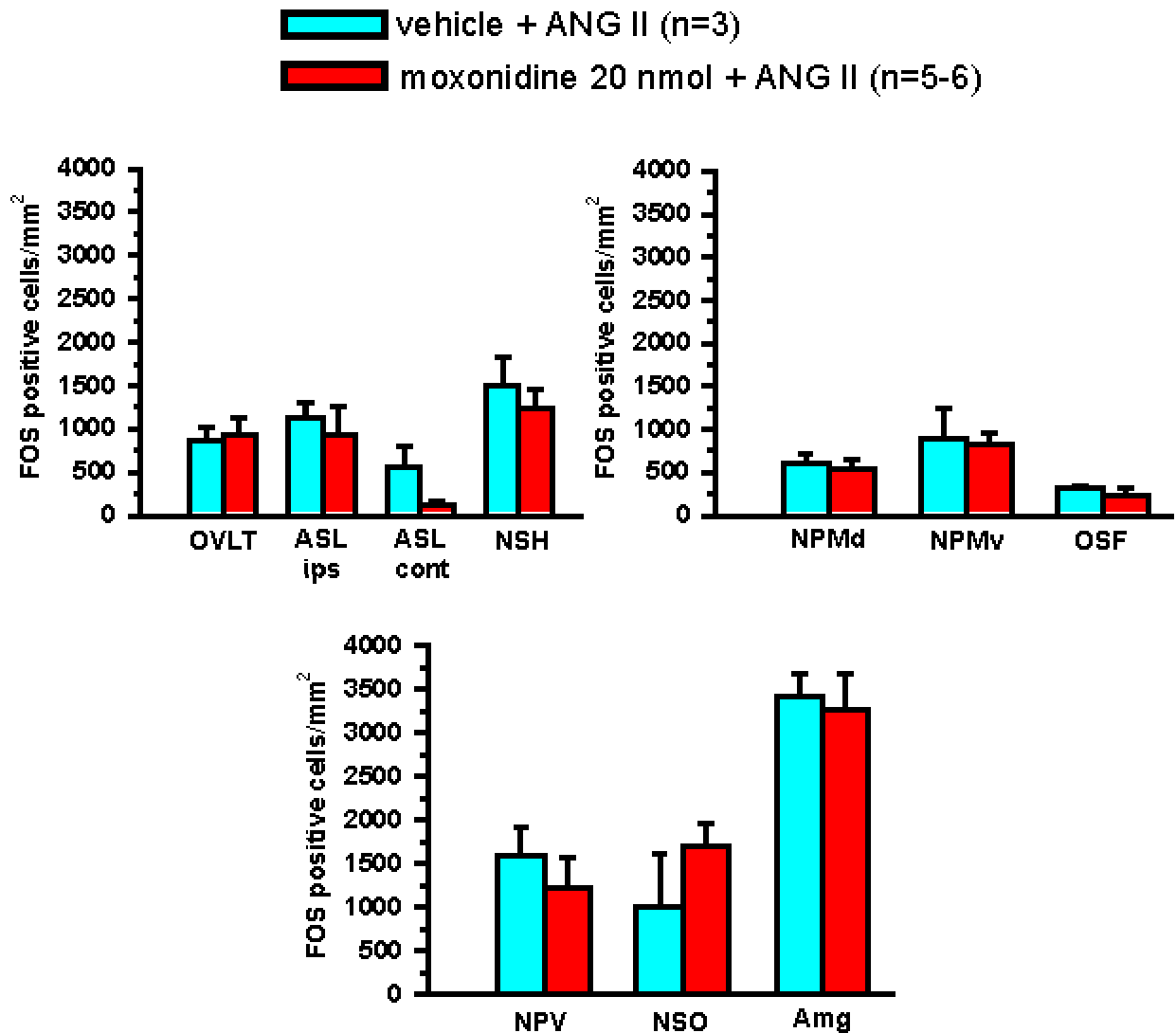


Figura 27: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/ mm²) em animais que receberam injeção de veículo + ANG II ou moxonidina (20 nmol/1 μ l) + ANG II no VL, sendo: OVLT (órgão vascular da lamina terminal), ASLips (área septal lateral ipsilateral), ASLcont (área septal lateral contralateral), NSH (núcleo septo-hipotalâmico), NPMd (núcleo preóptico mediano dorsal), NPMv (núcleo preóptico mediano ventral), OSF (órgão subfornical), NPV (núcleo paraventricular), NSO (núcleo supra-óptico) e Amg (complexo amigdalóide). Os resultados são expressos como média \pm EPM.

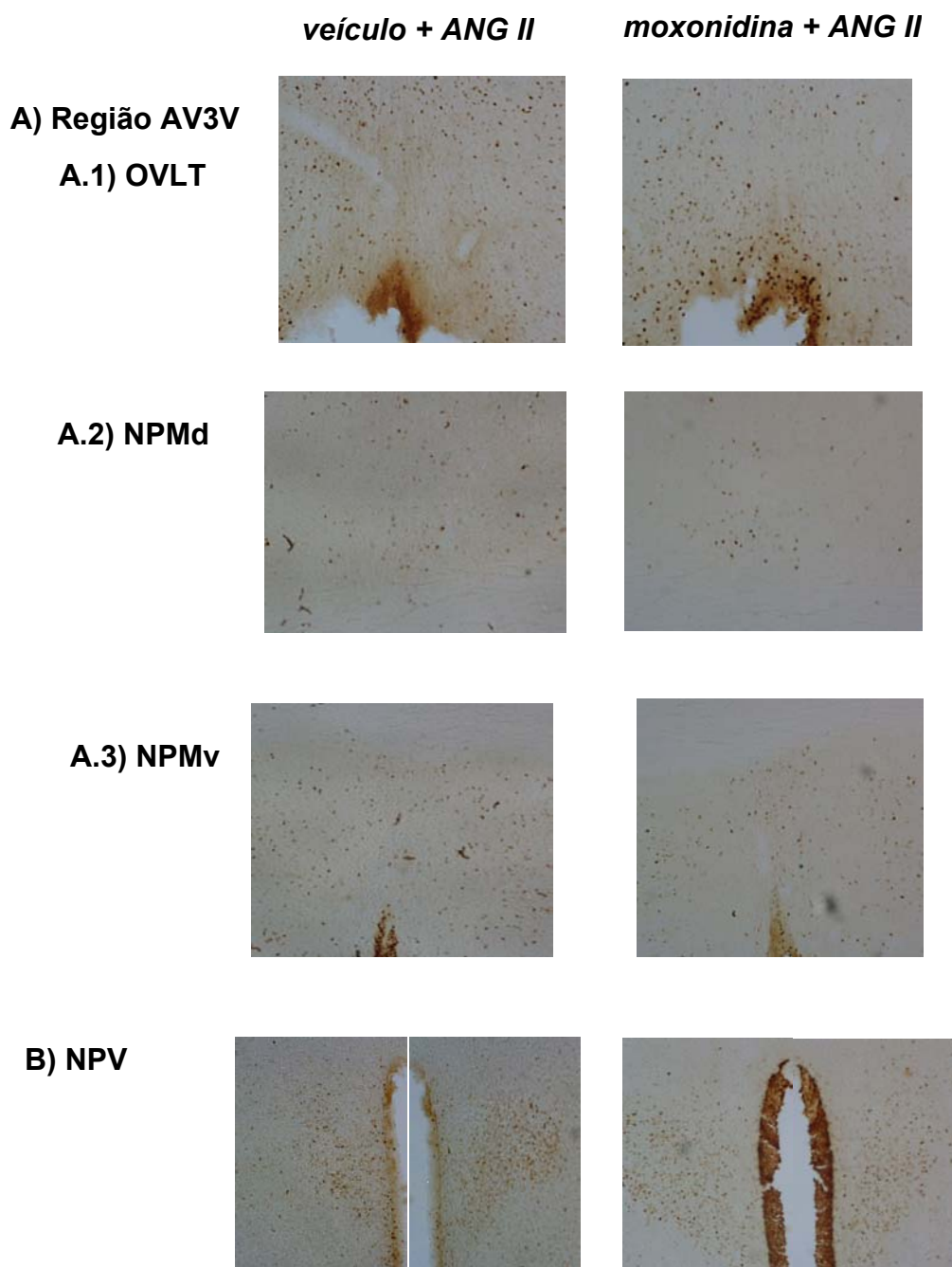


Figura 28: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de animais, tratados com veículo ou moxonidina (20 nmol/1 μ l) 20 minutos antes da injeção central de ANG II (50 ng/1 μ l), ilustrando a expressão da proteína c-fos em A) algumas áreas cerebrais da região AV3V, como A.1) OVLT (órgão vascular da lâmina terminal); A.2) NPMd (núcleo preóptico mediano dorsal; A.3) NPMv (núcleo preóptico mediano ventral) e B) NPV (núcleo paraventricular).

16. Estudo da expressão de c-fos após administração de moxonidina no VL em ratos depletados de sódio.

Ratos normotensos foram submetidos ao protocolo de depleção de sódio (furosemide sc + dieta deficiente de sódio por 24 h) e submetidos a injeções no VL de veículo (propilenoglicol/água) ou moxonidina.

Em comparação com os animais que receberam injeção icv de veículo, nos animais que receberam injeção icv de moxonidina (20 nmol/1 μ l) ocorreu aumento na expressão da proteína c-fos no NPMd [$F(1,10) = 7,7; p < 0,05$], ASLips [$F(1,10) = 8,3; p < 0,05$], e redução no OVLT [$F(1,10) = 16,6; p < 0,05$], (Figuras 29 e 30).

Em relação ao complexo amigdalóide e as demais áreas analisadas não houve diferenças significativas entre os tratamentos realizados (Figura 29). Não foi observada expressão da proteína c-fos no HL.

sodium depletion + vehicle (n=3-4)
 sodium depletion + moxonidine 20 nmol (n=8)

* different from sodium depletion + vehicle

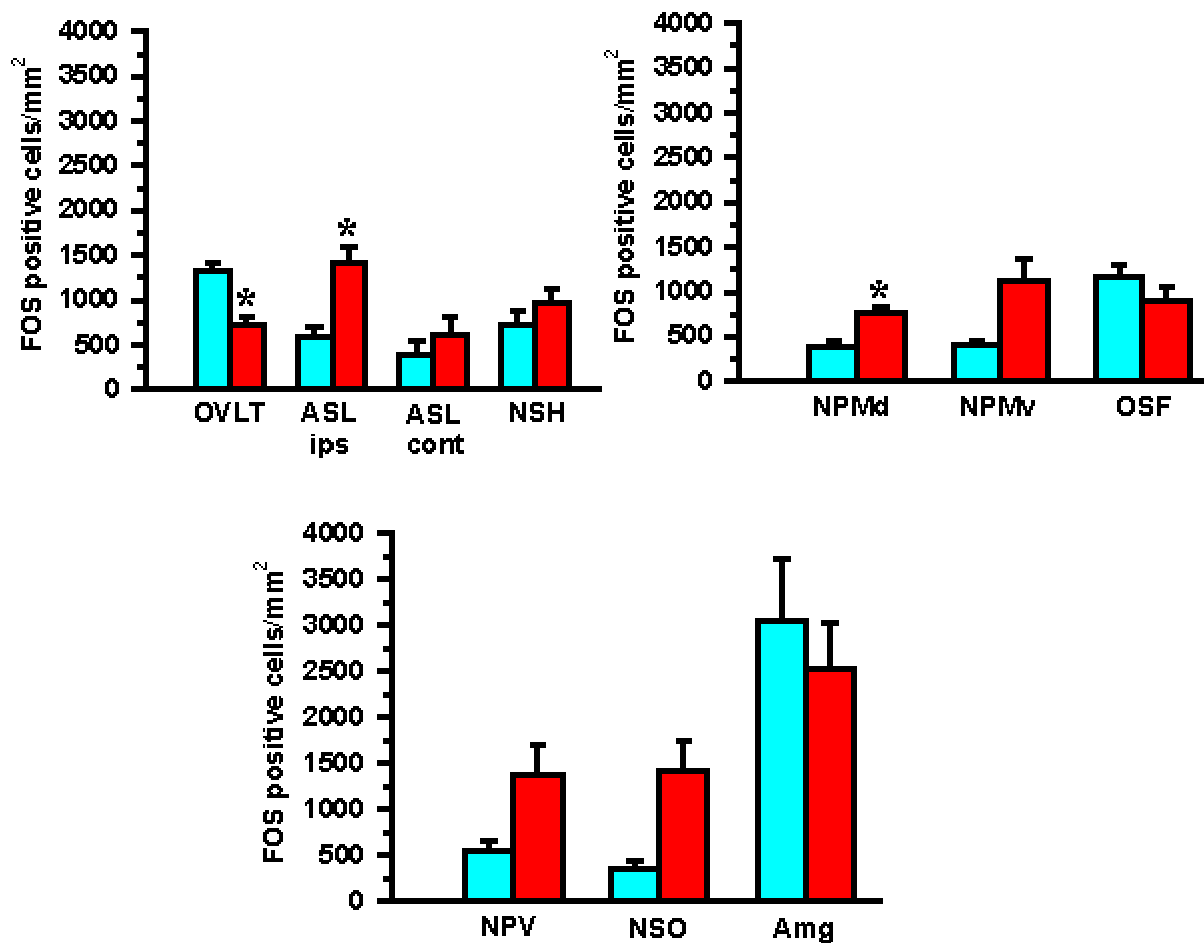


Figura 29: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/ mm²) em animais submetidos à depleção de sódio de 24 h que receberam injeção de veículo ou moxonidina (20 nmol/1 µl) no VL, sendo: OVLT (órgão vascular da lamina terminal), ASLips (área septal lateral ipsilateral), ASLcont (área septal lateral contralateral), NSH (núcleo septo-hipotalâmico), NPMd (núcleo preóptico mediano dorsal), NPMv (núcleo preóptico mediano ventral), OSF (órgão subfornical), NPV (núcleo paraventricular), NSO (núcleo supra-óptico) e Amg (complexo amigdalóide). Os resultados são expressos como média ± EPM.

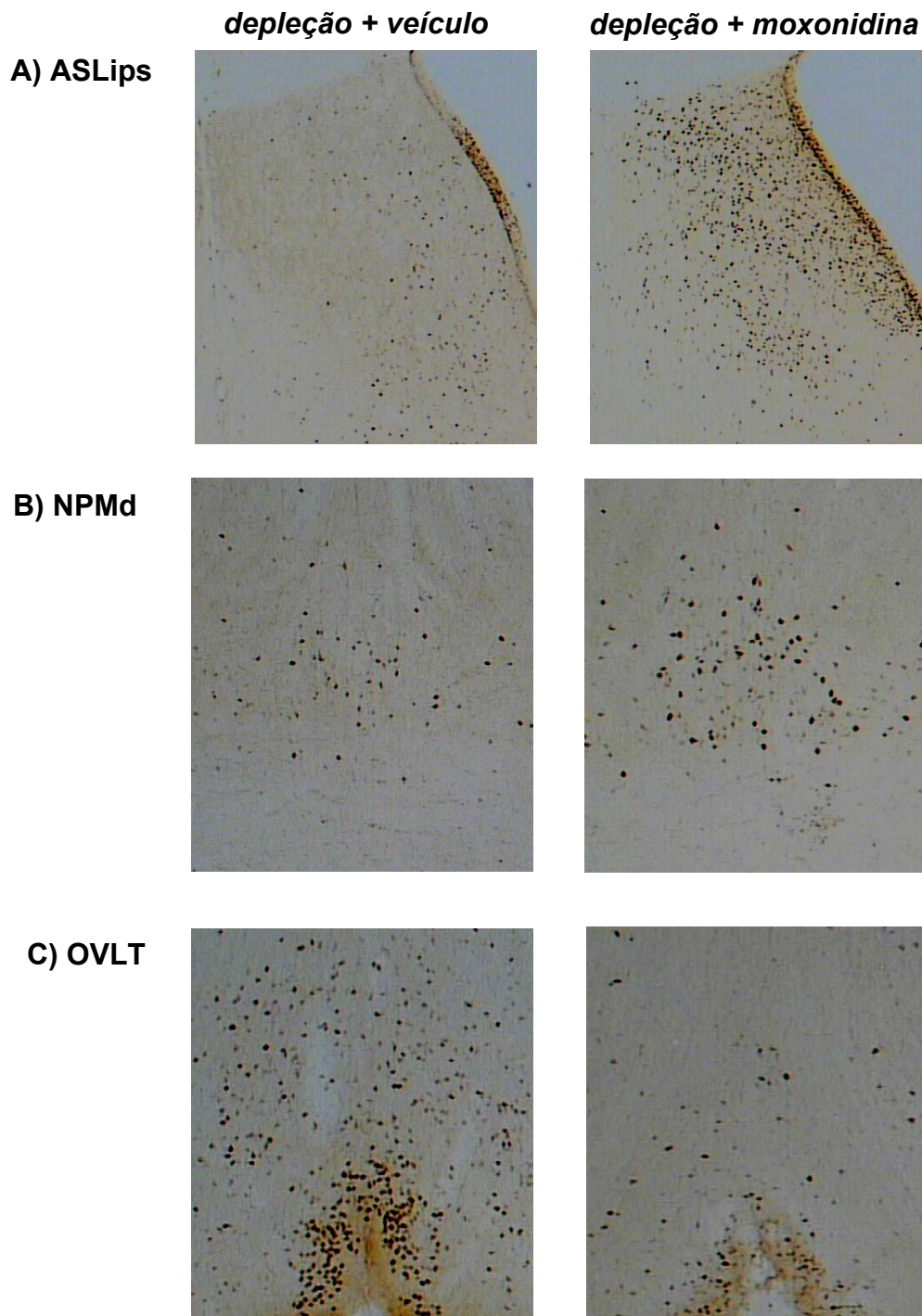


Figura 30: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de animais, depletados de sódio que receberam injeção no VL de veículo ou moxonidina (20 nmol/1 μ l), ilustrando a expressão da proteína c-fos nas seguintes áreas cerebrais: A) ASLips (área septal lateral ipsilateral), B) OVLT (órgão vascular da lâmina terminal) e C) NPMd (núcleo preóptico mediano dorsal).

DISCUSSÃO

Efeitos de injeções centrais de moxonidina na ingestão de NaCl

a) Ventrículo lateral (VL) e quarto ventrículo (4° V)

A injeção de moxonidina (20 nmol) no VL ou no 4° V reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio. Nos primeiros 60 minutos, independentemente do local da injeção (VL ou 4° V), a moxonidina foi capaz de reduzir de maneira semelhante a ingestão de NaCl 0,3 M. Porém, a moxonidina injetada no 4° V não reduziu a ingestão de NaCl até os 120 min (final do experimento). Diferentemente, quando injetada no VL, a redução da ingestão perdurou durante todo o experimento.

O efeito inibitório da moxonidina quando injetada no VL sobre a ingestão de NaCl está de acordo com dados da literatura (Sugawara e cols., 1999) e este efeito pode ser devido a sua ação em áreas prosencefálicas periventriculares que estejam envolvidas no controle da ingestão de água e de NaCl. Nesse sentido, em animais depletados de sódio, foi observado que a injeção de moxonidina (20 nmol) no VL promove aumento na expressão da proteína c-fos na ASLips e no NPMd, e redução no OVLT, sugerindo que alterações na atividade dessas áreas possam estar envolvidas no efeito antinatriorexigênico da moxonidina.

Por outro lado, quando injetada no 4° V o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl pode ser devido a sua ação em áreas próximas ao 4° V, como a AP, que é uma estrutura mediana localizada na terminação caudal do 4° V, limitada lateralmente pelo NTS. Lesão da AP, bem como da AP + porção adjacente do NTS, aumenta o consumo de solução de NaCl (Contreras e Stetson, 1981; Kosten e cols., 1983; Hyde e Mirelis, 1984; Watson, 1985; Edwards e cols., 1993) sugerindo assim um envolvimento dessas áreas no controle da ingestão de NaCl. Pelos resultados apresentados neste trabalho, pode-se sugerir que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos nestas áreas possa estar relacionada à inibição da ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio.

Observa-se, pelos resultados obtidos com injeções no VL e no 4° V, que tanto áreas prosencefálicas quanto do tronco cerebral poderiam estar envolvidas no efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.

A redução da ingestão de NaCl após injeção de moxonidina (20 nmol) no 4° V durou apenas 1 hora. É importante se observar que a injeção de moxonidina no 4° V promove hipotensão e bradicardia, permanecendo essas respostas também em torno de 1 hora (dados não publicados). Assim, parece que 1 hora é o tempo que persiste o efeito dessa dose de moxonidina injetada no 4° V. Os efeitos da injeção da mesma dose de moxonidina no VL duraram mais tempo.

Comparando-se animais controles e tratados com moxonidina, não foram observadas diferenças significativas em relação à ingestão de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M. Na verdade, o protocolo utilizado de depleção de sódio de 24 h visa estimular a ingestão de solução de NaCl hipertônico, sendo a ingestão de água um efeito secundário e de pequena intensidade. Portanto, a tendência de redução da ingestão de água talvez não tenha sido estatisticamente significativa devido ao pequeno volume de água ingerida nesse caso. De qualquer forma, a injeção de moxonidina no VL ou 4° V não modificou essa ingestão de água, o que é diferente do efeito antidipsogênico da moxonidina já demonstrado para a ingestão de água induzida por ANG II ou pela estimulação colinérgica centrais, bem como pela privação hídrica (Menani e cols., 1999; Martinez e cols., 2000).

b) Complexo amigdalóide, núcleo central da amígdala (NCA) e núcleo basal da amígdala (NBA)

Injeções de moxonidina, tanto unilaterais quanto bilaterais, no complexo amigdalóide reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio, sendo que injeções bilaterais se mostraram mais eficientes em reduzir a ingestão de NaCl do que injeções unilaterais. Dados da literatura mostram que lesões eletrolíticas bilaterais do complexo amigdalóide podem aumentar ou diminuir a ingestão de NaCl 1,5% dependendo da dimensão e da porção do complexo amigdalóide que foi danificada pela lesão (Gentil e cols., 1968). Além disso, a lesão da região medial do complexo amigdalóide foi capaz de abolir a ingestão de NaCl induzida por mineralocorticóides (Nitabach e cols., 1989;

Zhang e cols., 1993). Já foi verificado a presença de receptores adrenérgicos α_2 no complexo amigdalóide (Zilles e cols., 1993; King e cols., 1995; Newman-Tancredi e cols., 2000) e estudos de King e cols. (1995) não mostraram a presença de receptores imidazólicos no complexo amigdalóide. Portanto, o complexo amigdalóide desempenha um papel relevante no controle da ingestão de NaCl e os presentes resultados mostram que receptores adrenérgicos α_2 e/ou imidazólicos participam deste controle.

O complexo amigdalóide é formado por vários subnúcleos, de forma que um volume grande (1 μ l) injetado pode levar a droga a atingir vários desses subnúcleos. Portanto, na tentativa de mapear quais os subnúcleos que poderiam estar envolvidos nessa inibição produzida pela moxonidina, foi estudado também o efeito de injeções bilaterais em pequenos volumes (0,2 – 0,4 μ l) dessa droga nos núcleos central e basal da amígdala.

Moxonidina injetada bilateralmente no NCA não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio. Por outro lado, dados da literatura demonstraram que lesão bilateral do NCA reduzia a ingestão de NaCl induzida por diferentes protocolos (Galaverna e cols., 1991; Galaverna e cols., 1993; Seeley e cols., 1993; Zardetto-Smith e cols., 1994; Ganaraj e Jeganathan, 1998), além da ingestão não estimulada de NaCl (Seeley e cols., 1993), sugerindo que o NCA exerceria um papel excitatório no comportamento ingestivo. Todavia, os resultados apresentados neste trabalho não mostraram um envolvimento do NCA no efeito da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.

Lesões realizadas bilateralmente no núcleo basolateral do complexo amigdalóide (NBLA) aumentaram a ingestão de alimento e água, enquanto que lesões bilaterais do NCA levaram a uma redução do comportamento ingestivo (Ganaraj e Jeganathan, 1998), reforçando a idéia de que o NCA teria uma ação excitatória sobre o comportamento ingestivo (Galaverna e cols., 1991; Galaverna e cols., 1993; Seeley e cols., 1993; Zardetto-Smith e cols., 1994; Ganaraj e Jeganathan, 1998) e sugerindo uma função inibitória do NBLA sobre a ingestão (Ganaraj e Jeganathan, 1998). Injeções bilaterais do agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, moxonidina, no NBA reduziram a

ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio, sugerindo que a ativação desses receptores no NBA inibe a ingestão de NaCl, diferentemente do que foi observado para os estudos realizados no NCA.

Animais com lesões seqüenciais do NCA e NBLA mostraram predominantemente os efeitos da lesão do NBLA (aumento de ingestão de água e alimento), enquanto que os efeitos da lesão do NCA foram mascarados (Ganaraj e Jeganathan, 1998), sugerindo que esses subnúcleos interagem, prevalecendo a ação do NBLA. Injeções bilaterais de moxonidina quando realizadas no NBA, mas não quando injetadas no NCA, foram capazes de reduzir a ingestão de NaCl, sugerindo a existência nessa área de um mecanismo dependente de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos que inibe a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio.

À semelhança do que ocorreu com a injeção de moxonidina no VL ou no 4º V, observou-se que injeções bilaterais ou unilaterais de moxonidina no complexo amigdalóide não alteraram a ingestão de água que acompanha a ingestão de NaCl. Por outro lado, injeções bilaterais de moxonidina (todas as doses) no NCA reduziram a ingestão de água, enquanto que injeções de moxonidina (20 nmol) no NBA aumentaram a ingestão de água, mostrando que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos dessas duas áreas produz efeitos opostos na ingestão de água que acompanha a ingestão de solução hipertônica de NaCl. Por outro lado, a injeção de moxonidina no NBA reduz a ingestão de NaCl 0,3 M ao mesmo tempo em que aumenta a ingestão de água. Como a ingestão de água no protocolo de 24 h de depleção de sódio é dependente da ingestão de solução hipertônica de NaCl, que foi reduzida nesse caso, não é possível se apresentar justificativas mais claras para o aumento da ingestão de água, exceto que a moxonidina possa diretamente alterar a saciedade desses animais.

Lesões bilaterais do NCA diminuíram a ingestão de água (Ganaraj e Jeganathan, 1998), sugerindo um papel excitatório do NCA no controle da ingestão de água. Injeções bilaterais de moxonidina no NCA reduziram a ingestão de água, sugerindo que talvez a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos do NCA poderiam atuar bloqueando os mecanismos

excitatórios presentes nesse núcleo, e conseqüentemente, inibindo a ingestão de água.

Por outro lado, lesões do NBLA levaram a um aumento da ingestão de água, o que sugere uma função inibitória para este núcleo (Ganaraj & Jeganathan, 1998). Injeções bilaterais de moxonidina no NBA também promoveram um aumento da ingestão de água, o que sugere que ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos do NBA produz efeitos semelhantes aos da lesão dessa área.

Assim, os presentes resultados mostraram uma possível participação dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos nos mecanismos relacionados com o controle da ingestão de água no NCA e NBA, e para o controle da ingestão de NaCl no NBA. Todavia, é importante ressaltar que o protocolo de depleção de sódio visa à indução da ingestão de solução hipertônica de NaCl, enquanto que a ingestão de água, geralmente muito variável quando associada com NaCl 0,3 M, depende dos efeitos osmóticos da ingestão de NaCl. Para se analisar, com maior segurança um possível efeito da moxonidina no NCA ou NBA sobre a ingestão de água seria recomendado utilizar um protocolo que induzisse especificamente ingestão de água (por exemplos, privação hídrica de 24 h, salina hipertônica ou injeção central de ANG II).

c) Hipotálamo lateral (HL)

A injeção de moxonidina (20 nmol) no HL não foi capaz de reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de NaCl. Também não foram observadas diferenças significativas na ingestão de água que acompanha a ingestão de solução hipertônica de NaCl.

Já havia sido demonstrado que clonidina ou moxonidina, injetadas no HL, reduzem a ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h (Ferrari e cols, 1990; De Oliveira e cols., 2000), sugerindo que o HL seria um dos locais de ação dessas drogas para o controle da ingestão de água. Verificamos ainda neste trabalho, que a injeção de moxonidina no HL reduz a resposta pressora produzida pela injeção central de ANG II, reforçando a idéia de que o HL é um dos locais de ação da moxonidina. Além disso, estudos anteriores

demonstraram que lesão do HL pode reduzir ou abolir a ingestão de soluções hipertônicas de NaCl induzida por deficiência de NaCl ou tratamento com mineralocorticóide (Wolf, 1967; Schulkin e Fluharty, 1985) comprovando a importância dessa área no controle da ingestão de sódio.

É possível que, para se obter algum efeito sobre a ingestão de solução hipertônica de NaCl fossem necessárias injeções bilaterais de moxonidina no HL, diferentemente do que foi observado para ingestão de água, experimento no qual, a injeção unilateral de moxonidina já foi suficiente para reduzir em aproximadamente 70% a ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h (De Oliveira e cols., 2000).

Em resumo, no HL, diferentemente do que ocorre para o controle da ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h, a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos produzida pela injeção de moxonidina não está envolvida no controle da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio.

d) Envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 no controle da ingestão de NaCl

Moxonidina, assim como a clonidina, são agonistas mistos de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos que apresentam efeitos antidipsogênicos e antinatriorexigênicos (Fregly e cols, 1981; De Paula e cols., 1996; Yada e cols., 1997a; Yada e cols., 1997b; Sugawara, 1999; Sugawara e cols., 1999; Sugawara e cols., 2001). Antagonistas desses receptores são muito utilizados na tentativa de elucidar qual deles (adrenérgicos α_2 ou imidazólicos) ou se ambos estariam envolvidos nos efeitos inibitórios da moxonidina e clonidina na ingestão de água e soluções hipertônicas de NaCl (Ferrari e cols., 1990; Sato e cols., 1996; Sugawara e cols, 1999).

O efeito inibitório da moxonidina injetada no VL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio por 24 h foi abolido pela injeção icv de RX 821002 (40 e 80 nmol) e SKF 86466 (640 nmol) durante todo o período experimental e pela ioimbina (320 nmol) nos períodos finais do experimento (60 e 120 min). Essas drogas são consideradas antagonistas de receptores adrenérgicos α_2 sugerindo que a ação inibitória da moxonidina

sobre a ingestão de NaCl induzida por depleção seria mediada pelos receptores adrenérgicos α_2 centrais. Estudos anteriores haviam mostrado que a injeção central de RX 821002 aboliu o efeito antidipsogênico da moxonidina sobre a ingestão de água induzida pela injeção central de ANG II (Menani e cols., 1999). Assim, a moxonidina poderia estar atuando através dos receptores adrenérgicos α_2 para inibir a ingestão de água e de NaCl.

Moxonidina, assim como a clonidina, apresentam afinidades diferentes pelos receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, sendo que a clonidina apresenta afinidade semelhante pelos receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, enquanto que a moxonidina apresenta maior afinidade pelos receptores imidazólicos (Kawasaki e Takasaki, 1986; Ernsberger e cols., 1987; Buccafusco e cols., 1995; Ernsberger e cols., 1995) e apesar destas diferenças, tanto a moxonidina quanto a clonidina são capazes de inibir a ingestão de NaCl (De Paula e cols., 1996; Yada e cols., 1997a; Yada e cols., 1997b; Sugawara, 1999; Sugawara e cols., 1999). Já havia sido demonstrado que a iombina reduzia parcialmente o efeito antidipsogênico da clonidina sobre a ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h ou ANG II icv (Ferrari e cols., 1990; Yada e cols., 1997a), mas não modificava o efeito inibitório da clonidina sobre a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio (Yada e cols., 1997b), diferentemente do SKF 86466 cuja injeção icv foi capaz de reduzir parcialmente o efeito inibitório da clonidina sobre a ingestão de NaCl (Sugawara, 1999). Neste trabalho, verificamos que tanto a ioimbina quanto o SKF 86466 aboliram o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M. Ioimbina e SKF 86466 são considerados antagonistas específicos de receptores adrenérgicos α_2 permitindo a caracterização da participação dos receptores adrenérgicos α_2 no efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl. Embora considerado um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , o RX 821002 apresenta um anel imidazólico, podendo também se ligar em sítios imidazólicos (Hieble e Ruffolo, 1995; Callado e cols., 1996).

Apenas a injeção central de RX 821002 (40 nmol) e ioimbina (320 nmol) aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio, sugerindo uma possível ação inibitória tônica dos receptores adrenérgicos α_2 centrais no controle da ingestão de NaCl. Todavia, é necessário ressaltar que os efeitos

ocorreram em dois grupos de ratos que apresentaram uma ingestão de NaCl reduzida no grupo controle (tratado com veículo). Assim, é possível que esta ingestão de NaCl reduzida no grupo controle esteja afetando os efeitos do RX 821002 e ioimbina. Estudos anteriores já haviam mostrado aumento na ingestão de NaCl em animais tratados com injeção periférica de ioimbina (Johnson e cols., 1990; Fitts, 1991), mas este trabalho é o primeiro a mostrar que é possível ocorrer aumento da ingestão de NaCl após a injeção central de antagonistas adrenérgicos α_2 .

Foi verificado que o pré-tratamento com RX 821002 aboliu o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl em doses menores (40 e 80 nmol) do que a necessária para ioimbina (320 nmol) e, principalmente, para o SKF 86466 (640 nmol). Além disso, RX 821002 e SKF 86466 aboliram o efeito antinatriorexigênico da moxonidina durante todo o experimento, enquanto que a ioimbina aboliu o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl apenas nos tempos de 60 e 120 min. O RX 821002 por apresentar um anel imidazólico e conseqüentemente, poder se ligar em sítios imidazólicos, além de também ser um antagonista seletivo para receptores adrenérgicos α_2 (Hieble e Ruffolo, 1995; Callado e cols., 1996), foi mais eficiente em bloquear o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M do que os antagonistas considerados específicos de receptores adrenérgicos α_2 e que não possuem estrutura imidazólica, ioimbina e SKF 86466, que produziram os mesmos efeitos só que em altas doses. Efeito semelhante ocorre em estudos com agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, como clonidina e moxonidina, que inibem a ingestão de NaCl em pequenas doses (20 nmol) (De Paula e cols., 1996; Yada e cols., 1997a; Yada e cols., 1997b; Sugawara, 1999; Sugawara e cols., 1999), enquanto que para noradrenalina e α -metilnoradrenalina (agonistas de receptores adrenérgicos α_2 , mas não dos receptores imidazólicos) são necessárias doses maiores (80 e 160 nmol) para serem observados os mesmos efeitos (De Paula e cols., 1996; Yada e cols., 1997a; Sugawara, 1999; Sugawara e cols., 1999; Sugawara e cols., 2001). Considerando os agonistas e antagonistas, parece que a existência de uma característica imidazólica pode facilitar seus efeitos na ingestão de NaCl. Apesar disto, dados da literatura mostraram que o idazoxan (antagonista de

receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos) na dose de 320 nmol inibiu apenas parcialmente o efeito antinatriorexigênico da moxonidina (Sugawara e cols., 1999), enquanto que o bloqueio dos receptores adrenérgicos α_2 , como apresentado neste trabalho, aboliu o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio, indicando o envolvimento destes receptores no efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl.

Sumarizando, os resultados mostraram o envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 centrais no papel inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl. Além disso, sugerem um possível papel tônico dos receptores adrenérgicos α_2 centrais na inibição da ingestão de NaCl. É preciso destacar que pela primeira vez foi demonstrado que os efeitos de um agonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos na ingestão de NaCl foram totalmente bloqueados pelo tratamento prévio com antagonistas específicos de receptores adrenérgicos α_2 .

Efeitos da injeção central de moxonidina na resposta pressora produzida pela ativação angiotensinérgica e colinérgica central

É sabido que os efeitos pressores tanto da ANG II como do carbacol injetados centralmente são atribuídos ao aumento da atividade simpática e da secreção de vasopressina (Hoffman e cols., 1977; Imai e cols., 1989). A microinjeção de moxonidina, assim como de clonidina, no BRVL induz respostas vasodepressoras (Bousquet e cols., 1984; Ernsberger e cols., 1993b; Haxhiu e cols., 1994; Nurminem e cols., 1998; Yamasato e cols., 2001) sugerindo, portanto, que essas drogas produzem uma redução da atividade simpática. É sugerido que o efeito anti-hipertensivo da moxonidina se deva a uma ação dela nos receptores imidazólicos presentes no BRVL (Ernsberger e cols., 1993b; Ernsberger e cols., 1994; Haxhiu e cols., 1994; Buccafusco e cols., 1995; Ernsberger e cols., 1995; Ernsberger e cols., 1997). Tanto clonidina quanto moxonidina, além de se ligarem em receptores imidazólicos, também são agonistas de receptores adrenérgicos α_2 (Kawasaki e Takasaki, 1986; Ernsberger e cols., 1987; Ernsberger e cols., 1993; Ernsberger e cols., 1994; Haxhiu e cols., 1994; Buccafusco e cols., 1995; Bock e cols., 1999; Philipp e

cols., 2002), cuja ativação central também pode reduzir a descarga simpática (Guyenet, 1997; Yamasato e cols., 2001). A injeção central de clonidina reduziu o efeito pressor produzido pela ativação angiotensinérgica central (Colombari e cols., 1990).

a) Efeito da injeção de moxonidina no VL sobre a resposta pressora produzida pela ANG II e carbacol

A injeção de moxonidina no VL nas doses de 20, 40 e 80 nmol, não promoveu alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). As doses de 20 e 40 nmol não modificaram a resposta pressora produzida pela ANG II (50 ng), porém a dose de 80 nmol de moxonidina reduziu o efeito pressor produzido pela injeção icv de ANG II.

Para se tentar elucidar qual receptor estaria envolvido no efeito inibitório da moxonidina sobre o efeito pressor da ANG II, foi administrado, 20 min antes da injeção icv de moxonidina, ioimbina (320 nmol), antagonista específico de receptores adrenérgicos α_2 , e verificou-se que a administração prévia de ioimbina aboliu o efeito inibitório da moxonidina, sugerindo que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 centrais é essencial para este efeito da moxonidina. Dados da literatura relatam que os receptores imidazólicos presentes no BRVL são importantes para o efeito anti-hipertensivo da moxonidina (Ernsberger e cols, 1993b; Ernsberger e cols., 1994; Haxhiu e cols., 1994; Buccafusco e cols., 1995; Ernsberger e cols., 1995; Ernsberger e cols., 1997) e no presente trabalho, verificamos a importância dos receptores adrenérgicos α_2 no efeito inibitório da moxonidina sobre a resposta pressora produzida pela ativação angiotensinérgica central, sugerindo que em áreas prosencefálicas, diferentemente do que ocorre no BRVL, os receptores adrenérgicos α_2 também possam ser importantes para os efeitos anti-hipertensivos da moxonidina. Somente a administração de ioimbina não promoveu alterações na pressão arterial e frequência cardíaca, o que está de acordo com dados da literatura (Bock e cols., 1999).

Em relação à ativação colinérgica, a injeção icv de moxonidina 80 nmol reduziu a resposta pressora produzida pela injeção central de carbacol (4 nmol). Todavia, a moxonidina apresentou um efeito inibitório mais intenso sobre a resposta pressora produzida pela ANG II do que a produzida pelo

carbacol. O efeito pressor produzido pelo carbacol, além da liberação de vasopressina e ativação simpática via BRVL, poderia envolver também vias alternativas, como fibras oriundas do núcleo paraventricular ou núcleos da rafe que poderiam ativar diretamente neurônios pré-ganglionares do simpático (Gebber, 1990), e conseqüentemente promoverem a ativação simpática que resulta na resposta pressora do carbacol, e talvez, a moxonidina nas doses utilizadas, não tenha interferido nessas vias alternativas.

A injeção icv (VL) de 6-hidroxidopamina (neurotoxina de neurônios catecolaminérgicos) atenuou a ingestão de água induzida pela ANG II, mas não pelo carbacol (Fitzsimons e Setler, 1975), sugerindo que a integridade dos neurônios catecolaminérgicos (dopamina, adrenalina e/ou noradrenalina) são importantes para ação dipsogênica da ANG II, mas não do carbacol. Talvez, algo semelhante ocorra em relação à resposta pressora, e talvez por isso, a moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos) tenha tido um efeito menos expressivo em bloquear a resposta pressora produzida pelo carbacol, sendo que somente a injeção icv de uma dose alta de moxonidina (80 nmol) foi capaz de reduzir parcialmente este efeito.

b) Efeito da injeção de moxonidina no 4º V sobre a resposta pressora produzida pela ANG II e carbacol

Apenas a injeção de moxonidina (20 nmol) no 4º V promoveu hipotensão e bradicardia, sendo este um efeito já conhecido, e possivelmente decorrente de uma redução da atividade simpática periférica produzida pela ação da moxonidina no BRVL (Bousquet e cols., 1984; Nurminen e cols., 1998). A moxonidina injetada no 4º V reduz a atividade simpática e isto pode explicar a redução da resposta pressora da ANG II. Entretanto, a moxonidina injetada no 4º V não alterou a resposta pressora do carbacol que em parte também é devido à ativação simpática. Portanto, parece que a ativação simpática produzida pela estimulação colinérgica central (ou pelo menos pelo carbacol injetado no VL) não é devido à ativação do BRVL. Como já discutido anteriormente, a ativação simpática independente do BRVL é possível por fibras oriundas do núcleo paraventricular ou núcleos da rafe que ativariam diretamente neurônios pré-ganglionares do simpático (Gebber, 1990) e

poderiam ser responsáveis pela ativação simpática que resultaria na resposta pressora do carbacol.

c) Efeito da injeção de moxonidina no HL sobre a resposta pressora produzida pela ANG II e carbacol

A injeção de moxonidina (20 nmol) no HL não promoveu alterações na PAM e FC, porém foi capaz de reduzir a resposta pressora induzida pela ANG II injetada no VL, mas não pelo carbacol injetado no VL.

Estudos anteriores demonstraram a importância do hipotálamo para alguns efeitos cardiovasculares, por exemplo, lesões bilaterais do HL aboliram a resposta pressora e reduziram a bradicardia decorrentes da injeção icv de clonidina, e reduziram a hipertensão produzida pela administração de clonidina na área septal média (ASM) (Colombari e cols., 1992b; Haibara e cols., 1992), sugerindo um envolvimento do HL em respostas dependentes de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos. Além disso, lesão eletrolítica do HL diminuiu a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol na ASM e de ANG II e carbacol no NPM (Haibara e cols., 1994; Silva e cols., 1995), sugerindo que o HL é importante para a resposta pressora produzida pela ativação colinérgica e angiotensinérgica. Resultados de Hartle e cols. (1982) também sugeriram que o hipotálamo anterior poderia conter uma via eferente da região AV3V associada com resposta pressora central produzida pela ANG II.

A moxonidina conseguiu reduzir o efeito pressor produzido pela ativação angiotensinérgica, sugerindo que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 e/ou imidazólicos, localizados no HL, exerce um efeito inibitório na resposta pressora produzida pela ANG II. Foi observado que o bloqueio de projeções α adrenérgicas para o hipotálamo rostral com fentolamina produziu uma atenuação dose-dependente da resposta pressora produzida pela administração icv de ANG II (Jones, 1988), sugerindo uma participação adrenérgica no efeito da ANG II, sendo que esta via poderia estar sendo inibida pela moxonidina.

As possíveis justificativas para o efeito inexpressivo da moxonidina sobre a resposta pressora produzida pelo carbacol já foram mencionadas anteriormente.

Resumindo, moxonidina injetada no VL na dose de 80 nmol praticamente aboliu o efeito pressor da ANG II, mas só reduziu parcialmente o efeito pressor do carbacol. A dose de 20 nmol de moxonidina injetada no 4º V ou no HL atenuou a resposta pressora da ANG II, mas não afetou os efeitos cardiovasculares do carbacol. Talvez, o carbacol ative vias alternativas na qual a moxonidina não atue ou as doses utilizadas, embora tenham efeito sobre a resposta pressora da ANG II, não são suficientes para bloquear a hipertensão decorrente da ativação colinérgica.

Os resultados apresentados também mostraram que a moxonidina atua em receptores adrenérgicos α_2 para bloquear as respostas pressoras produzidas pela ativação de vias angiotensinérgicas na regulação cardiovascular.

Efeitos da moxonidina injetada centralmente na expressão da proteína c-fos em diferentes tratamentos

A injeção central de moxonidina em animais normovolêmicos e saciados promoveu expressão da proteína c-fos nas seguintes áreas prosencefálicas: OVLT, ASLips, NPMv, NPV e NSO, que são estruturas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular (Covian e cols., 1975; Brody e cols., 1978; Brody e Johnson, 1980; Johnson, 1985; Colombari e cols., 1992a; Fitzsimons, 1998).

Vários estudos mostram o envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 na expressão da proteína c-fos. A injeção periférica de ioimbina (Bing e cols., 1992; Tsujinjo e cols., 1992) promoveu aumento da imunorreatividade para c-fos em diversas áreas cerebrais (LC, NCA, núcleo do leito da estria terminal, NTS, BRVL, NPV, neocortex, córtex piriforme e NSO), sendo este efeito inibido pela injeção de clonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2

e imidazólicos). Por outro lado, a injeção central (VL) de ioimbina (Blume e cols., 2002) não foi capaz de induzir a expressão da proteína c-fos (áreas estudadas: NSO, NPV, OSF e NPM). Somente a injeção periférica (ip) de clonidina promoveu expressão de c-fos no NPV e NSO do hipotálamo (Tsujiro e cols., 1992). Além disso, a administração periférica de RX 821002 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) promoveu aumento na expressão de RNAm para a proteína c-fos no córtex, sem ter efeitos marcantes em outras áreas (Shen e cols., 1995). Estes resultados sugerem um possível envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos na modulação da expressão da proteína c-fos em diversas áreas cerebrais, e a moxonidina, por ser um agonista desses receptores também promove esta expressão, como demonstra os presentes resultados.

Como já foi mencionado, a moxonidina induz a expressão de c-fos em áreas envolvidas no controle da ingestão de água e sódio e regulação cardiovascular. Além disso, algumas dessas áreas estão envolvidas nas ações da ANG II, por exemplo a região AV3V (que inclui o OVLT, NPM e núcleo preóptico periventricular) (Brody e cols., 1978; Brody e Johnson, 1980; Johnson, 1985; Colombari e cols., 1992a; Fitzsimons, 1998). É sabido que a moxonidina reduz: a ingestão de NaCl induzida pela depleção de sódio por 24 h (De Oliveira e cols., 1998; Sugawara e cols., 1999), a ingestão de água induzida por privação hídrica ou ANG II (Menani e cols., 1999; Martinez e cols., 2000) e a resposta pressora produzida pela ANG II. Portanto, a injeção central de moxonidina reduz tanto os efeitos dipsogênicos quanto pressores produzidos pela ANG II. Em relação à expressão da proteína c-fos, verificou-se que apenas a injeção icv de ANG II (50 ng) promoveu expressão da proteína c-fos nas seguintes áreas: NPMd e NPV que estão de acordo com dados da literatura que relatam que injeção única no VL de ANG II promove expressão de c-fos nestas áreas e outras como OVLT, OSF e NSO (Mahon e cols., 1995). Além do NPMd e NPV, neste trabalho observamos que a injeção de ANG II também promoveu expressão de c-fos na ASLips e NSH e reduziu a expressão de c-fos na ASLcont. Diferenças na expressão de c-fos induzida pela ANG II entre o presente trabalho e o já relatado na literatura, pode ser devido à

diferença da dose de ANG II utilizada (Mahon e cols, 1995, utilizaram uma dose de aproximadamente 103 ng).

A injeção central de antagonistas de receptores adrenérgicos α_1 (prazosin) e α_2 (ioimbina) reduziram a expressão da proteína c-fos promovida pela ANG II icv no NPV e NSO (Blume e cols., 2002). Assim, seria possível esperar que um agonista de receptores adrenérgicos α_2 (moxonidina) pudesse também alterar a expressão da proteína c-fos induzida por ANG II, porém este não foi o efeito observado, sendo que o tratamento prévio com moxonidina não alterou a expressão de c-fos produzida pela ANG II central. Devido ao fato dos dois tratamentos isoladamente aumentarem a expressão de c-fos em áreas cerebrais semelhantes, é difícil saber qual tratamento é o responsável pela expressão de c-fos após a combinação dos dois tratamentos. É possível que a moxonidina esteja inibindo a expressão de c-fos produzida pela ANG II e a expressão de c-fos que se observa após os dois tratamentos seja efeito apenas da moxonidina. Com a técnica de imuno-histoquímica utilizada, marcação da proteína c-fos, não foi possível distinguirmos o padrão de atividade celular produzido pela injeção central de moxonidina e ANG II, sendo provável que a análise de outros genes fosse necessária para essa distinção.

A depleção de sódio de 24 h promove expressão de c-fos no OSF (100% dos animais estudados) e no OVLT (40 % dos animais estudados) (Rowland e cols., 1996a), sugerindo que essas áreas (OSF e OVLT) estariam envolvidas na ingestão de NaCl induzida por depleção. Em nosso estudo, animais depletados de sódio tratados com moxonidina apresentaram um aumento da marcação para c-fos na ASLips e NPMd e redução no OVLT, sugerindo que mudanças na atividade dessas áreas possam ser responsáveis pelo efeito inibitório da moxonidina na ingestão de NaCl 0,3 M.

Não foram observadas diferenças significativas na marcação da proteína c-fos no complexo amigdalóide após injeção icv de moxonidina, sugerindo que o complexo amigdalóide não seria um provável local de ação para o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M quando injetada no VL. Por outro lado, quando a injeção de moxonidina foi realizada no complexo amigdalóide ocorreu redução da ingestão de NaCl 0,3 M. Em relação ao HL, também não foi observada expressão da proteína c-fos em nenhum dos

tratamentos estudados, embora a moxonidina apresente efeitos (redução da ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h e redução da resposta pressora decorrente da ativação angiotensinérgica) quando injetada no HL (De Oliveira e cols., 2000).

Parece que após a combinação de moxonidina + ANG II ou de moxonidina + depleção de sódio houve redução na expressão da proteína c-fos em algumas áreas quando comparadas com a expressão de c-fos observada após tratamento apenas com moxonidina injetada no VL. No caso da combinação de moxonidina + ANG II esse efeito foi observado na ASLips e no OSF, enquanto que na combinação de moxonidina + depleção o mesmo ocorreu no NSH, NPMv e OSF. Todavia, não seria recomendável se fazer análise estatística comparando-se esses resultados, pois conforme descrito no protocolo experimental, estes experimentos não foram realizados simultaneamente.

Em síntese, temos que a injeção central de moxonidina promove ativação de várias áreas prosencefálicas (OVLT, ASLips, NPMv, NPV e NSO) que podem ser possíveis locais de ação para os efeitos da moxonidina no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular. Verificou-se também que a injeção prévia de moxonidina não alterou a expressão da proteína c-fos induzida pela injeção central de ANG II. Além disso, foram observadas modificações na atividade da ASLips, NPMd e OVLT em animais depletados de sódio que receberam injeção central de moxonidina, sugerindo que estas áreas poderiam estar envolvidas nos efeitos inibitórios da moxonidina sobre a ingestão de NaCl.

SUMÁRIO

Sumarizando os resultados apresentados:

1. Os efeitos inibitórios da moxonidina injetada no VL e 4° V mostram que tanto áreas prosencefálicas quanto do tronco cerebral estariam envolvidas nos efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio por 24 h. Foi observado também que moxonidina injetada em áreas cerebrais específicas como o complexo amigdalóide e o NBA, mas não o NCA e o HL, induz efeito antinatriorexigênico.
2. O papel inibitório da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M seria mediado pelos receptores adrenérgicos α_2 . Além disso, é sugerido um possível papel tônico dos receptores adrenérgicos α_2 na inibição da ingestão de NaCl.
3. Moxonidina injetada centralmente reduz as respostas pressoras produzidas principalmente pela ativação angiotensinérgica, e em menor grau, pela ativação colinérgica central. Verificou-se ainda que os receptores adrenérgicos α_2 são fundamentais para o efeito inibitório da moxonidina sobre a resposta pressora produzida pela injeção de ANG II.
4. Várias áreas cerebrais (OVLT, ASLips, NPMv, NPV e NSO) envolvidas no controle da ingestão de água e de NaCl e da regulação cardiovascular são ativadas após a injeção central de moxonidina em ratos normovolêmicos e saciados, sendo possíveis locais de ação para os efeitos da moxonidina.
5. Embora a moxonidina reduza o efeito pressor da ANG II, não se observou alteração na expressão de c-fos produzida pela injeção central de ANG II.
6. A injeção central de moxonidina alterou a atividade na ASLips, NPMd e OVLT em animais depletados de sódio, portanto essas áreas podem ser responsáveis pelo efeito antinatriorexigênico da moxonidina injetada no VL.

CONCLUSÕES

1. Moxonidina, atuando em receptores adrenérgicos α_2 centrais, inibe a ingestão de NaCl 0,3 M e respostas pressoras (em especial as produzidas pela ativação angiotensinérgica central).
2. De acordo com os estudos de expressão da proteína c-fos, áreas cerebrais como OVLT, ASL, NPM, NPV e NSO podem desempenhar algum papel nos efeitos da moxonidina injetada no VL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAAL, A. E., ASSAF, J., KUCHARCZIK AND MOGENSON, G. J. Effect of ablation of the subfornical organ on water intake elicited by systemically administered angiotensin II. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 52: 1217-1220, 1974.

ANDERSSON, B. Regulation of water intake. **Physiol. Rev.** 58:582-603, 1978.

ANTUNES-RODRIGUES, J. McCANN, S. M. AND SAMSON, W. K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. **Endocrinology.** 118: 8720-8724, 1986.

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

AVRITH, D. B., WISELKA, M. J. AND FITZSIMONS, J. T. Increased sodium appetite in adrenalectomized or hypophysectomized rats after intracranial injections of renin or angiotensin II. **Endocrinology.** 87(1):109-112, 1980.

BARBOSA, S. P., DE GOBBI, J. I. F., ZILIOLI, L., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W. A., RENZI, A., DE LUCA JR., L. A. AND MENANI, J. V. Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. **Brain Res. Bull.** 37:463-466, 1995.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, 56:335-344, 1989.

BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M. AND STANTON, B. A. O rim: Controle da osmolalidade e do volume dos líquidos corporais. **Fisiologia.** 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pág. 674-699, 2000.

BING, G., FILER, D., MILLER, J. C. AND STONE, E. A. Noradrenergic activation of immediate early genes in rat cerebral cortex. **Mol. Brain Res.**, 11:43-46, 1991.

BING, G., STONE, E. A., ZHANG, Y. AND FILER, D. Immunohistochemical studies of noradrenergic-induced expression of c-fos in the rat CNS. **Brain Res.**, 592:57-62, 1992.

BISHOP, V. S. AND SANDERFORD, M. G. Angiotensin II modulation of the arterial baroreflex: role of the area postrema. **Clin. and Experim. Pharmacol. and Physiol.**, 27:428-431, 2000.

BLAIR- WEST, J. R., BURNS, P., DENTON, D. A., FERRARO, T., McBURNIE, M. I., TARJAN, E. AND WEISINGER, R. S. Thirst induced by increasing brain sodium concentration is mediated by brain angiotensin. **Brain Res.**, 637:335-338, 1994.

BLUME, A., NEUMANN, C., DORENKAMP, M., CULMAN, J. AND UNGER, T. Involvement of adrenoceptors in the angiotensin II-induced expression of inducible transcription factors in the rat forebrain and hypothalamus. **Neuropharmacology**, 42:281-288, 2002.

BOCK, C., NIEDERHOFFER, N. AND SZABO, B. Analysis of the receptor involved in the central hypotensive effect of rilmenidine and moxonidine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 359:262-271, 1999.

BOUSQUET, P., FELDMAN, J. AND SCHWARTZ, J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 230:232-236, 1984.

BOUSQUET, P., FELDMAN, J. AND ATLAS, D. An endogenous, non catecholamine clonidine antagonist increases mean arterial blood pressure. **Eur. J. Pharmacol.**, 124:167-170, 1986.

BOUSQUET, P., GRENEY, H., BENNAI, F., FELDMAN, J., STUTZMANN, J., BELCOURT, A. AND DONTENWILL, M. Imidazoline receptors and cardiovascular regulations: a statement. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 763:526-530, 1995.

BOUSQUET, P., BRUBAN, V., SCHANN, S. AND FELDMAN, J. Imidazoline receptors: a challenge. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 74:205-209, 2000.

BRASILI, L. Enigmatic receptors. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 74:201-203, 2000.

BRAUN-MENENDEZ, E. AND BRANDT, P. Aumento del apetito específico para la sal provocado por la desoxicorticosterona. **Rev. de la Soc. Argentina de Biología**. 28, 15-23, 1952.

BRODY, M. J., FINK, G. D., BUGGY, J., HAYWOOD, J. R., GORDON, F. J. AND JOHNSON, A. K. The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. **Circ. Res.** , 43 (Suppl. I), 12-113, 1978.

BRODY, M.J. AND JOHNSON, A.K. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. **IN: Frontiers in Neuroendocrinology**, vol 6, edited by L. Martini e W.F. Ganong, New York, Raven, pp. 249-292, 1980.

BROWN, C. M., MACKINNON, A. C., MCGRATH, J. C., SPEDDING, M. E AND KILPATRICK, A. T. α_2 adrenoreceptor subtypes and imidazoline-like binding sites in the rat brain. **Br. J. Pharmacol.**, 99, 803-809, 1990.

BUCCAFUSCO, J.J., LAPP, C.A., WESTBROOKS, K.L. AND ERNSBERGER, P. Role of medullary I_1 -imidazoline and α_2 -adrenergic receptors in the antihypertensive responses evoked by central administration of clonidine analogs in conscious spontaneous hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exper. Therap.** 273: 1162-1171, 1995.

BYLUND, D. B.. Pharmacological characteristics of α_2 adrenergic receptor subtypes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 763, 1-5, 1995.

CALLADO, L. F., GABILONDO, A. M. AND MEANA, J. J. [3 H]RX 821002 (2-metoximidazolan) binds to α_2 -adrenoreceptor subtypes and a non-adrenoreceptor imidazoline binding site in rat kidney. **Eur. J. Pharmacol.**, 316: 359-368, 1996.

CALLERA, J. C., CAMARGO, L. A. A., DE LUCA JR., L. A., MENANI, J. V., RENZI, A. AND SAAD, W. A. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 46:39-43, 1993.

CALLERA, J. C., SAAD, W.A., CAMARGO, L. A. A., RENZI, A., DE LUCA JR., L. A. AND MENANI, J. V. Role of the adrenergic pathways of the lateral hypothalamus on water intake and pressor response induced by cholinergic activation of the medial septal area in rats. **Neurosc. Lett.** 167: 153-155, 1994.

CAMACHO, A. AND PHILLIPS, M. I. Separation of drinking and pressor responses to central angiotensin by monoamines. **Am. J. Physiol. (Regul. Integ. Comp. Physiol. 9)** 240:R106-R113, 1981.

CAMPBELL, W. R. AND POTTER, D. E. Potential role of imidazoline (I_1) receptors in modulating aqueous humor dynamics. **J. Ocul. Pharmacol.**, 10:393-402, 1994.

CHAN, C. K. S. AND HEAD, G. A. Relative importance of central imidazoline receptors for the antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine. **J. Hypertens.**, 14:855-864, 1996.

CIRIELLO, J., LAWRENCE, D. AND PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res.** 322: 388-392, 1984.

COGHLAN, J. P., CONSIDINE, P. J., DENTON, D. A., FEI, D. T., LEKSELL, L. G., MCKINLEY, M. J., MULLER, A. F., TARJAN, E., WEISINGER, R. S. AND BRADSHAW, R. A. Sodium appetite in sheep induced by cerebral ventricular infusion of angiotensin: comparison with sodium deficiency. **Science**, 214(4517):195-197,1981.

COLOMBARI, E., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., DE LUCA JR., L.A. AND MENANI, J.V. Role of central α_1 - and α_2 -adrenoceptors on the dipsogenic and cardiovascular effect of angiotensin II. **Pharmacol.Biochem.Behav.**, 36:893-896, 1990.

COLOMBARI, E., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. A., RENZI, A., DE LUCA Jr., L. A. AND MENANI, J. V. AV3V lesion supresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. **Brain Res.** 572: 172-175, 1992a.

COLOMBARI, E., CAMARGO, L.A.A., SAAD, W.A., RENZI, A., DE LUCA JR., L.A. AND MENANI, J. V. Cardiovascular effects of central clonidine in conscious rats after hypothalamic lesions. **J. Auton. Nervous System.**, 40, 49-56, 1992b.

CONTRERAS, R. J. AND STETSON, P. W. Changes in salt intake after lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. **Brain Res.**, 211: 355-366, 1981.

COVIAN, M. R. AND RODRIGUES, S. A. Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. **Am. J. Physiol.**, 205(5):922-926, 1963.

COVIAN, M. R., ANTUNES RODRIGUES, J., GENTIL, C. G., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. AND SILVA NETO, C. R. Central control of salt balance. In: **Neural integration of physiological mechanisms and behaviour** (Stevenson, J. A. F. Memorial Volume) Mogenson, G. S. e Calaresu, F. R. (eds) University of Toronto Press 267-282, 1975.

DE GOBBI, J. I. F., DE LUCA JR., L. A. AND MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Res.** 880: 131-138, 2000.

DE LUCA JR, L. A. AND MENANI, J.V. Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 30: 497-502, 1997.

DE LUCA JR., L. A., CAMARGO, L. A. A., MENANI, J. V., RENZI, A. AND SAAD, W. A. A possible dual role for central noradrenaline in the control of hydromineral fluid intake. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 4: 905-914, 1994.

DE OLIVEIRA, L. B., SUGAWARA, A. M., MARGATHO, L. O., DE LUCA JR., L. A. AND MENANI, J. V. Efeitos da moxonidina na ingestão de água e sódio em ratas normotensas e hipertensas. **Resumo da FeSBE**, pág. 249, 1998.

DE OLIVEIRA, L. B., DE LUCA JR. L. A., RENZI, A. AND MENANI, J. V. Injeção de moxonidina no hipotálamo lateral reduz a ingestão de água induzida por privação hídrica em ratos. **Resumo da FeSBE**, pág. 46, 2000.

DE PAULA, P.M., SATO, M. A., MENANI, J.V. AND DE LUCA JR, L. A. Effects of central α -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neurosc. Lett.** 214: 155-158, 1996.

DE SARRO, G. B., ASCIOTI, C., FROIO, F., LIBRI, V. AND NISTICO, G. Evidence that locus ceruleus is the site where clonidine and drugs acting α_1 and α_2 -adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. **Br. J. Pharmacol.**, 90:675-685, 1987.

EDWARDS, G.L., BELTZ, T.G., POWER, J.D. AND JOHNSON, A.K. Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. **Am. J. Physiol.** 264: R1242-R1247, 1993.

ELFONT, R. M., EPSTEIN, A. N. AND FITZSIMONS, J. T. Involvement of the renin-angiotensin system in captopril-induced sodium appetite in the rat. **J. Physiol.** 354:11-27, 1984.

ERNSBERGER, P., MEELEY, M. P., MANN, J. J. AND REIS, D. J. Clonidine binds to imidazoline sites as well as α_2 -adrenoceptors in the ventrolateral medulla. **Eur. J. Pharmacol.** 134: 1-13, 1987.

ERNSBERGER, P. R., MEELEY, M. P. AND REIS, D. J. An endogenous substance with clonidine like properties: selective binding to imidazole sites in the ventrolateral medulla. **Brain Res.**, 441:309-318, 1988.

ERNSBERGER, P., ELLIOT, H.L., WEIMAN, H.J., RAAP, A., HAXHIU, M.A., HOFFERBER, E., LOW-KROGER, A., REID, J.L. AND MEST, H.J. Moxonidine: a second-generation central antihypertensive agent. **Cardiov. Drug Rev.**, 11:411-431, 1993a.

ERNSBERGER, P., DAMON, T. H., GRAFF, L. M., SCHäFER, S. G., AND CHRISTEN, M. O. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I₁-imidazoline sites. **J. Pharmacol. Exper. Therap.** 264:172-264, 1993b.

ERNSBERGER, P., HAXHIU, M.A., GRAFF, L.M., COLLINS, L.A., DRESHAJ, I., GROVE, D.L., GRAVES, M.E., SCHAFER, S.G. AND CHRISTEN, M.O. A novel mechanism of action for hypertension control: moxonidine as a selective I₁-imidazoline agonist. **Cardiovasc. Drugs Therapy** 8: 27-41, 1994.

ERNSBERGER, P., GRAVES, M. E., GRAFF, L. M., ZAKIEH, N., NGUYEN, P., COLLINS, L. A., WESTBROOKS, K. L. AND JOHNSON, G. G. I₁-imidazoline receptor. Definition, characterization, distribution and trans-membrane signaling. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 763:22-42, 1995.

ERNSBERGER, P., FRIEDMAN, J. E. AND KOLETSKY, R. J. The I₁ – imidazoline receptor: from binding site to therapeutic target in cardiovascular disease. **J. of Hypertension**, **15 (suppl 1)**, S9-S23, 1997.

FALK, J. L. AND TANG, M. Rapid sodium depletion and salt appetite induced by intraperitoneal dialysis. In: **Biological and behavioral aspects of salt intake** ed Kare, M. R., Fregly, M. J., Bernard, R. A. Academic Press, New York, Chapter 15, 185-204, 1980.

FARSANG, C. AND KAPOCSI, J. Imidazoline receptors: from discovery to antihypertensive therapy (facts and doubts). **Brain Res. Bull.**, 49 (5):317-331, 1999.

FELDMAN, R. S., MEYER, J. S. AND QUENZER, L. F. Peptide neurotransmitters. In: **Principles of Neuropsychopharmacology**, Massachusetts: Sinauer Associates, 1997.

FERGUSON, A. V. AND WASHBURN, L. S. Angiotensin II: a peptidergic neurotransmitter in central autonomic pathways. **Prog. in Neurobiology**, 54:169-192, 1998.

FERRARI, A.C., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W.A, RENZI, A., DE LUCA JR., L. A. AND MENANI, J. V. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. **Brain Res.** 522: 125-130, 1990.

FERRARI, A.C., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W.A, RENZI, A., DE LUCA JR., L. A. AND MENANI, J. V. Role of α_1 - and α_2 -adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. **Brain Res.** 560: 291-296, 1991.

FERREYRA, M. C. AND CHIARAVIGLIO, E. Changes in volemia and natremia and onset of sodium appetite in sodium depleted rats. **Physiol. Behav.** 19(2): 197-201, 1977.

FITTS, D. A. AND MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav. Neurosci.** 103:865-872, 1989.

FITTS, D.A. Effects of lesions of ventral median preoptic nucleus or subfornical organ on drink and salt appetite after deoxycorticosterone acetate or yohimbine. **Behav. Neurosc.**, 105:721-726, 1991.

FITTS, D. A., STARBUCK, E. M. AND RUHF, A. Circunventricular organs and ANG II-induced salt appetite: blood pressure and connectivity. **Am. J. Physiol. (Reg. Integ. Comp. Physiol.)**, 279:R2277-R2286, 2000.

FITZSIMONS, J. T. The physiology of thirst: a review of the extraneural aspects of the mechanisms of drinking. In: E. Stellar and J. M. Sprague (Eds.) **Progress in Physiological Psychology**, vol. 4, Academic Press, New York, N. Y., pp 119-201, 1971.

FITZSIMONS, J. T. Thirst. **Physiol. Rev.** 52:468-561, 1972.

FITZSIMONS, J. T. AND SETLER, P. E. The relative importance of central nervous catecholaminergic and cholinergic mechanisms in drinking in response to angiotensin and other thirst stimuli. **J. Physiol (Lond.)** 250:613-631, 1975.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin stimulation of the central nervous system. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 87:117-167, 1980.

FITZSIMONS, J. T. The role of angiotensin II in the control of hypovolemic thirst and sodium appetite. **Adv. Physiol. Sci.**, 11:555-562, 1981.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. **Physiological Reviews.** vol. 38, n° 3, pages 583-686, 1998.

FLUHARTY, S. J. AND EPSTEIN, A. N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic

interaction with systemic mineralocorticoids. **Behav. Neurosci.** 97:746-758, 1983.

FREGLY, M.J. AND KELLEHER, D.L. Antidipsogenic effect of clonidine on isoproterenol induced water intake. **Appetite J.** 1:279-289, 1980.

FREGLY, M.J., KELLEHER, D.L. AND GREENLEAF, J.E. Antidipsogenic effect of clonidine on angiotensin II, hypertonic saline, pilocarpine and dehydration-induced water intake. **Brain Res. Bull.** 7: 661-664, 1981.

FREGLY, M.J., ROWLAND, N.E. AND GREENLEAF, J.E. A role for presynaptic α_2 -adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. **Brain Res. Bull.** 12: 393-398, 1984a.

FREGLY, M.J., ROWLAND, N.E. AND GREENLEAF, J.E. Clonidine antagonism of angiotensin-related drinking: a central site of action. **Brain Res.** 298: 321-327, 1984b.

GALAVERNA, O., DE LUCA JR., L. A., SCHULKIN, J., YAO, S.Z. AND EPSTEIN, A. N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, 28, 89-98, 1991.

GALAVERNA, O., SEELEY, R. J., BERRIDGE, K. C., GRILL, H. J., EPSTEIN, A. N. AND SCHULKIN, J. Lesions of the central nucleus of the amygdala. I. Effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. **Behav. Brain Res.**, 59(1-2):11-7, 1993.

GANARAJ, B. AND JEGANATHAN, P. S. Involvement of basolateral nucleus & central nucleus of amygdala in the regulation of ingestive behaviour. **Indian J. Med. Res.**, 108:98-103, 1998.

GANONG, W. F. Funções endócrinas dos rins, coração e glândula pineal. **Fisiologia Médica.** 17^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. pág. 321-324.

GEBBER, G.L. Central determinants of sympathetic nerve discharge. In: **Central regulations of autonomic functions**, edited by Loewi, A.D. and Spyer, K.M. New York: Oxford University Press, p. 126-144, 1990.

GENTIL, C. G., RODRIGUES, J. A., NIGRO-VILAR, A. AND COVIAN, M. R. Role of amygdaloid complex in sodium chloride and water intake in the rat. **Physiology and Behavior**, vol.3, 981-985, 1968.

GODWIN, S. J., TORTELLI, C. F., PARKIN, M. L. AND HEAD, G. A. Comparison of the baroreceptor-heart rate reflex effects of moxonidine, rilmenidine and clonidine in conscious rabbits. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 72(2-3):195-204, 1998.

GUBITS, R. M., SMITH, T. M., FAIRHURST, J. L. AND YU, H. Adrenergic receptors mediate changes in c-fos mRNA levels in brain. **Mol. Brain Res.**, 6:39-45, 1989.

GUYENET, P. G. Is the hypotensive effect of clonidine and related drugs due to imidazoline binding sites? **Am. J. Physiol. (Regul. Integ. Comp. Physiol. 42)**, 273:R1580-R1584, 1997.

HAIBARA, A. S., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A. AND MENANI, J. V. Lesions of the LH impair the pressor response to clonidine injected into the MSA of conscious rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 25:857-860, 1992.

HAIBARA, A. S., SAAD, W. A., MENANI, J. V., CAMARGO, L. A. A. AND RENZI, A. Role of LH on fluid, electrolyte and cardiovascular responses to activation of the MSA. **Am. J. Physiol. (Regul. Integ. Comp. Physiol. 35)** R496-R502, 1994.

HÁRSING Jr., L. G., KAPOCSI, J. AND VIZI, E. S. Possible role of α_2 and α_1 adrenoceptors in the experimentally induced depression of central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 32:927-932, 1989.

HARTLE, D. K., LIND, R. W., JOHNSON, A. K. AND BRODY, M. J. Localization of the anterior hypothalamic ANG II pressor system. **Hypertension 4 (suppl II):II-159-II-165**, 1982.

HAXHIU, M.A., DRESHAJ, I., SCHAFER, S.G. AND ERNSBERGER, P. Selective antihypertensive action of moxonidine is mediated mainly by I₁-imidazoline receptors in the rostral ventrolateral medulla. **J. Cardiovasc. Pharmacol. 24 (Suppl.1): S1-S8**, 1994.

HEAD, G. A., CHAN, C. K. S. AND GODWIN, S. J. Central cardiovascular action of agmatine, a putative clonidine-displacing substance, in conscious rabbit. **Neurochem. Int.**, 30 (1):37-45, 1997.

HERBERT, H., MOGA, M. M. AND SAPER, C. B. Connections of parabrachial nucleus to the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J. Comp. Neurol.** 293, 540-580, 1990.

HERBERT, J., FORSLING, M. L., HOWES, S. R., STACEY, P. M. AND SHIERS, H. M. Regional expression of c-fos antigen in the basal forebrain following intraventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline. **Neuroscience**, v. 51, pp. 867-882, 1992.

HERRERA, D. G. AND ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Prog. in Neurob.**, 50:83-107, 1996.

HIEBLE, J. P. AND RUFFOLO JR., R. R. Possible structural and functional relationship between imidazoline receptors and α_2 -adrenoreceptor. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 763:8-21, 1995.

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

HOFFMAN, W.E., PHILLIPS, M.I., SCHIMID, P.G., FALCON, J. AND WEET, J.F. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**, 16:463-472, 1977.

HOHAGE, H., HESS, K., JAHL, C., GREVEN, J. AND SCHLATTER, E. Renal and blood pressure effects of moxonidine and clonidine in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Nephrol.** 48 (6):346-352, 1997.

HUGHES, P. AND DRAGUNOW, M. Induction of immediate early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. **Pharmacol. Reviews**, 47(1):133-178, 1995.

HYDE, T. M. AND MIRELIS, R. R. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. **Am. J. Physiol.** 247 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 16) R173-R182, 1984.

IMAI, Y., ABE, K., SASAKI, N., ET AL. Role of vasopressin in cardiovascular responses to central cholinergic stimulation in rats. **Hypertension**, 13:549-557, 1989.

JALOWIEC, J. E. AND STRICKER, E. M. Sodium appetite in rats after apparent recovery from acute sodium deficiency. **J. Comp. and Physiol. Psych.** 73:238-244, 1970.

JHAMANDAS, J. H., PETROV, T., HARRIS, K. H., VU, T. AND KRUKOFF, T. L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res. Bull.** 39: 115-126, 1996.

JOHNSON, A. K. Role of the periventricular tissue surrounding the anteroventral third ventricle (AV3V) in the regulation of the body fluid homeostasis. In: **Schrier, R. W. (ed). Vasopressin.** Raven, New York, N. Y., pp. 319-382, 1985.

JOHNSON, A.K. AND EDWARDS, G.L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: **Current topics in neuroendocrinology**, vol.10, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 149-190, 1990.

JOHNSON, A.K., BELTZ, T.G. AND EDWARDS, G.L. The nature of sodium appetite induced by yohimbine. **FASEB J.** 4:A1195, 1990.

JOHNSON, A. K. AND EDWARDS, G. L. Central projections of osmotic and hypovolemic signal in homeostatic thirst. In: **Thirst: Physiological and Psychological Aspects**, edited by D. J. Ramsay and D. A. Booth. London: Springer-Verlag, pp. 149-175, 1991.

JOHNSON, L. R. Fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular. **Fundamentos de Fisiologia Médica.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pág. 272, 2000.

JONES, D. L. Hypothalamic α adrenergic blockade modifies drinking and blood pressure responses to central angiotensin II in conscious rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 66:1270-1277, 1988.

KAAN, E. C., BRÜCKNER, R., FROHLY, P., TULP, M., SCHARER, S. G. AND ZIEGLER, D. Effects of agmatine and moxonidine on glucose metabolism. **Cardiovasc. Risk. Fact. (suppl. 1)**, 5:19-27, 1995.

KAWASAKI, H. AND TAKASAKI, K. Central α_2 -adrenoreceptor mediates hypertensive response to clonidine in conscious normotensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 236:810-818, 1986.

KING, P. R., GUNDLACH, A. L. AND LOUIS, W. J. Quantitative autoradiographic localization in rat brain of alpha 2-adrenergic and non-adrenergic I-receptor binding sites labelled by [3H] rilmenidine. **Brain res.**, 675(1-2):264-78, 1995.

KOSTEN, T., CONTRERAS, R. J., STETSON, P. W. AND ERNEST, M. J. Enhanced saline intake and decrease heart rate after area postrema ablations in rat. **Physiology & Behavior**, vol. 31: 777-785, 1983.

KRUKOFF, T. L., HARRIS, K. H. AND JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. **Brain Res. Bull.** 30: 163-172, 1993.

KUCHARCZYK, J. AND MOGENSEN, G. J. Specific deficits in regulatory drinking following electrolytic lesions of the lateral hypothalamus. **Experimental Neurology.**, 53:371-385, 1976.

LEIBOWITZ, S. F. Hypothalamic alpha-adrenergic suppression of drinking: effects of several types of thirst. **Proc. 80th APA Annu. Convntion**, 845-846, 1972.

LI, G., REGUNATHAN, S., BARROW, C. J., ESHRAGHI, J., COOPER, R. AND REIS, D. J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science**, 263:966-969, 1994.

LIND, R. W., SWANSON, L. M. AND GANTEN, D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. **Neuroendocrinology**, 40:2-24, 1985.

MAHON, J. M., ALLEN, M., HERBERT, J. AND FITZSIMONS, J. T. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after Intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin II (1-7) or carbachol. **Neuroscience**, 69(1):199-208, 1995.

MANGIAPANE, M.L. AND SIMPSON, J.B. Subfornical organ: Forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. **Am. J. Physiol.**, 239: R382-R389, 1980.

MARTINEZ, G., MORETTI, T., DE LUCA JR, L. A., CAMARGO, L. A. A.. AND MENANI, J. V. Associação de ioimbina e moxonidina na ingestão de água em ratos com privação hídrica. **Resumo da FeSBE**, pág. 46, 2000.

MASSON, D. B. AND FITTS, D. A. Subfornical organ connectivity and drinking to captopril and carbachol in rats. **Behav. Neurosci.** 103:873-880, 1989.

McCRIMMON, D. R. AND LALLEY, P. M. Inhibition of respiratory neural discharges by clonidine and 5-hydroxytryptophan. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 222 (3): :771-777, 1982.

McKINLEY, M. J., DENTON, D. A., NELSON, J. F AND WEISINGER, R. S. Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep. **Am. J. Physiol.** 245 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 14):R287-R292, 1983.

McKINLEY, M. J., BADOER, E. AND OLDFIELD, B. J. Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of lamina terminalis. **Brain Res.**, 594:295-300, 1992.

MEELEY, M. P., ERNSBERGER, P. R., GRANATA, A. R. AND REIS, D. J. An endogenous clonidine-displacing substance from bovine brain: receptor binding and hypotensive actions I the ventrolateral medulla. **Life Sci.** 38:1119-1126, 1986.

MENANI, J. V., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A., RENZI, A., DE LUCA JR., L. A. AND COLOMBARI, E. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. **Neurosc. Lett.**, 113(3):339-44, 1990.

MENANI, J.V. AND JOHNSON, A.K. Serotonergic mechanism of the lateral parabrachial nucleus: angiotensin-induced pressor and drinking response. **Am. J. Physiol.**, 269: R1044-R1049, 1995.

MENANI, J.V., THUNHORST, R.L. AND JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, 270: R162-R168, 1996.

MENANI, J. V. AND JOHNSON, A.K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, 275: R1431-R1437, 1998.

MENANI, J. V., DE LUCA JR., L. A. AND JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am. J. Physiol.** 274: R555-R560, 1998.

MENANI, J. V., SATO, M. A., HAIKEL, L., VIEIRA, A. A., ANDRADE, C. A. F., DA SILVA, D. C. F., RENZI, A. AND DE LUCA JR., L. A. Central moxonidine on water and NaCl intake. **Brain Res. Bull.**, 49, pp. 273-279, 1999.

MICHEL, M. C. AND ERNSBERGER, P. Keep an eye on the I site: imidazoline preferring receptors. **Trend Pharmacol. Sci.**, 13:369-370, 1992.

MIGUEL, T. T. AND DE LUCA JR., L. A. Avaliação da importância dos receptores adrenérgicos alfa-2 e dos receptores imidazólicos cerebrais para a ingestão regulatória de água e de NaCl 3%. FeSBE, 1997.

MOE, K. E., WEISS, M. L. AND EPSTEIN, A. N. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. **Am. J. Physiol.** 247: R356-R365, 1984.

MORGAN, J. I. AND CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **Trends Neurosci.**, 12:459-462, 1989.

MOSQUEDA-GARCIA, R. Central Autonomic Regulation, **in: Primer on the Autonomic Nervous System**, Academic Press Inc., pp 3-12, 1996.

NEWMAN-TANCREDI, A., CHAPUT, C., TOUZARD, M. AND MILLAN, M. J. [(35S)-GTPgammaS autoradiography reveals alpha (2) adrenoceptors-mediated G-protein activation in amygdala and lateral septum. **Neurophar.**, 39 (6):1111-3, 2000.

NITABACH, M. N., SCHULKIN, J. AND EPSTEIN, A. N. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. **Behav. Brain Res.**, 35, 127-134, 1989.

NURMINEN, M.L., CULMAN, J., HAASS, M., CHUNG, O. AND UNGER, T. Effect of moxonidine on blood pressure and sympathetic tone in conscious spontaneously hypertensive rats. **Eur.J.Pharmacol.**, 362:61-67, 1998.

OKUMARA, K., ICHIARA, K. AND NAGASAKA, M. Effects of imidazoline-related compounds on mechanical response to nicorandil in the rat portal vein. **Eur. J. Pharmacol.**, 215:253-257, 1992.

PILETZ, J. E., ANDORN, A. C., UNNERSTALL, J. R. AND HALARIS, A. Binding of [³H]-p-aminoclonidine to alpha 2 adrenoceptor state plus a non-adrenergic sites on human platelet plasma membranes. **Biochem. Pharmacol.** 42:569-584, 1991.

PHILIPP, M., BREDE, M. AND HIEN, L. Physiological significance of α_2 -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. **Am. J. Physiol. (Regul. Integ. Comp. Physiol.)**, 283:R287-R295, 2002.

PHILLIPS, M. I. Functions of brain angiotensin. **Ann. Rev. Physiol.** 49:413-35, 1987.

PHILLIPS, M. I. AND SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regulatory Peptides.** 78:1-11, 1998.

PINTHONG, D., WRIGHT, I. K. HANMER, C., MILLNS, P. AND MASON, R. Agmatine recognizes α_2 adrenoceptor binding sites but neither activates nor inhibits α_2 adrenoceptor. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 351:10-16, 1995.

QUDRI, F., BADOER, E., STADLER, T. AND UNGER, T. Angiotensin II – induced noradrenaline release from the anterior hypothalamus in conscious rats: a brain microdialysis study. **Brain Res.** 563:137-141, 1991.

RANG, H. P., DALE, M. M. AND RITTER, J. M. Seção dois: Mediadores químicos – Transmissão Noradrenérgica. **Farmacologia.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. pág. 115-138.

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

ROMANOVSKY, A. A., SHIDO, O., UNGAR, A. L. AND BLATTEIS, C. M. Genesis of biphasic thermal response to intrapreoptically microinjected clonidine. **Brain Res. Bull.**, 31:509-513, 1993.

ROWLAND, N. E., LI, B. H., ROZELLE, A. K., FREGLY, M. J., GARCIA, M. AND SMITH, G. C. Localization of changes in immediate early genes in brain in regulation of hydromineral balance: intravenous angiotensin II. **Brain Res. Bull.**, 33:427-436, 1994a.

ROWLAND, N. E., LI, B. H., ROZELLE, A. K. AND SMITH, G. C. Comparison of Fos-like immunoreactivity induced in rat brain by central injection of angiotensin II and carbachol. **Am. J. Physiol.**, 267:R792-R798, 1994b.

ROWLAND, N. E., FREGLY, M. J., HAN, L. AND SMITH, G. Expression of Fos in rat brain in relation to sodium appetite: furosemide and cerebroventricular renin. **Brain Res.**, 728:90-96, 1996a.

ROWLAND, N. E., FREGLY, M. J., LI, B. H. AND HAN, L. Angiotensin-related induction of immediate early genes in rat brain. **Regul. Peptides**, 66:25-29, 1996b.

SAKAI, R. R., NICOLAIDIS, S. AND EPSTEIN, A. N. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin and aldosterone. **Am. J. Physiol.** 251:R762-R:768, 1986.

SAKAI, R. R., LAKSHIMI, C., MONDER, C., FUNDER, J. W., KROSOWSKI, Z. AND MCEWEN, B. S. Colocalization of 11 β – Hydroxysteroid dehydrogenase and mineralocorticoid receptor in rat brain. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 16 (2):1309, 1990.

SATO, M. A., YADA, M.M., RENZI, A., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W A., MENANI, J.V. AND DE LUCA JR, L. A. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29:1663-1666, 1996.

SCHULKIN, J. AND FLUHARTY, S. J. Further studies on salt appetite following lateral hypothalamic lesions: Effects of preoperative alimentary experiences. **Behav. Neurosci.** . 99, 929-935, 1985.

SCHULKIN, J., MARINI, J. AND EPSTEIN, A. N. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. **Behav. Neurosci.** 103,178-185, 1989.

SCHULKIN, J. Sodium hunger: the search for a salty taste. Cambridge, UK, **Cambridge Univ. Press**, 1991.

SEELEY, R. J., GALAVERNA, O., SCHULKIN, J., EPSTEIN, A. N. AND GRILL, H. J. Lesions of the central nucleus of amygdala. II. Effects on intraoral NaCl intake. **Behav Brain Res.**, 59(1-2):19-25, 1993.

SHAPIRO, R. E. AND MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J. Comp. Neurol.** 234: 344-364, 1985.

SHEN, P. J., BURAZIN, T. C. D. AND GUNDLACH. Noradrenergic regulation of immediate early gene expression in rat forebrain: differential effects of α_1 and α_2 -adrenoceptor drugs. **Mol. Brain Res.**, 28:222-230, 1995.

SHENG, M. AND GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, 4:477-485, 1990.

SILVA, R. K. P., SAAD, W. A., RENZI, A., MENANI, J. V. AND CAMARGO, L. A. A. Effect of LH lesions on the water and salt intake, and sodium and urine excretion induced by activation of the median preoptic nucleus in conscious rats. **J. Auton. Nervous System** 53:195-204, 1995.

SIMPSON, J. B., MANGIPANE, M. L. AND DELLMANN, H. D. Central receptor sites for angiotensin-induced drinking: a critical review. **Fed. Proc.** 37:2676-2682, 1978.

SIMPSON, J.B. AND ROUTHENBERG, A. Subfornical organ: Site of drinking elicitation by angiotensin. **Science.** 181:1172-1175, 1973.

SIMPSON, J.B. AND ROUTHENBERG, A. Subfornical organ lesions reduce intravenous angiotensin-drinking. **Brain Res.** 88:154-161, 1975.

SMYTH, D. D. AND PENNER, S. B. Renal I-1-imidazoline receptor-selective compounds mediate natriuresis in the rat. **J. Card. Pharmacol. (suppl. 2)** 26:S62-S67, 1995.

STRICKER, E. M. The physiological basis of sodium appetite: a new look at the "depletion-repletion" model. In: **Biological and behavioral aspects of salt intake** ed Kare, M. R., Fregly, M. J., Bernard, R. A. Academic Press, New York, Chapter 15, 185-204, 1980.

STRICKER, E. M. AND WOLF, G. Blood volume and tonicity in relation to sodium appetite. **J. Comp. Physiol. Psych.**, 62:275-279, 1966.

STUMPF, W. E. AND SAR, M. Glucocorticoid and mineralocorticoid hormone target sites in the brain: autoradiographic studies with corticosterone, aldosterone and dexamethasone. In: **Interaction within the brain pituitary-adrenocortical system**. Jones, M. T., Dallman, M. F., Chattopadhyay, S. eds.. New York: Academic Press, 137-147, 1979.

SUGAWARA, A. M. Tese de Mestrado: Participação adrenérgica na ingestão hidro-salina: mecanismos e importância fisiológica. **Universidade Federal de São Carlos**, 1999.

SUGAWARA, A. M., MIGUEL, T. T., DE OLIVEIRA, L. B., MENANI, J. V. AND DE LUCA JR., L. A. Noradrenaline and mixed α_2 adrenoreceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. **Brain Res.**, 839, 227-234, 1999.

SUGAWARA, A. M., MIGUEL, T. T., PEREIRA, D. T. B., MENANI, J. V. AND DE LUCA JR., L. A. Effects of central imidazolinergic and alpha₂-adrenergic activation on water intake. **Braz. J. of Med. and Biol. Res.**, 34:1185-1190, 2001.

TESSON, F., LIMON-BOULEZ, I., URBAN, P., PUYPE, M., VANDEKERCKHOVE, J. ET AL. Localization of I₂-imidazoline binding sites on monoamino oxidases. **J. Biol. Chem.**, 270:681-688, 1995.

THRASHER, T. N. AND KEIL, L. C. Regulation of drinking and vasopressin secretion: role of the organum vasculosum lamina terminalis. **Am. J. Physiol.** **253 (Regul. Integ. Comp. Physiol. 22)**: R108-R120, 1987.

THRASHER, T. N., KEIL, L. C. AND RAMSAY, D. J. Lesions of the organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically-drinking and vasopressin secretion in the dog. **Endocrinology** 110:1837-1839, 1982.

THUNHORST, R.L. AND JOHNSON, A.K. Renin angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, 266: R458-R465, 1994.

THUNHORST, R.L., XU, Z., CICHA, M. Z., ZARDETTO-SMITH, A. M. AND JOHNSON, A. K. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, 274: R1807-R1814, 1998.

TIBIRICA, E., MERMET, C., FELDMAN, J., GONON, F. AND BOUSQUET, P. Correlation between the inhibitory effect of catecholaminergic ventrolateral medullary neurons and the hypotension evoked by clonidine: A voltametric approach. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 250:642-647, 1989.

TIBIRICA, E., FELDMAN, J., MERMET, C., GONON, F. AND BOUSQUET, P. An imidazoline specific mechanism for the hypotensive effect of clonidine of clonidine: a study with yohimbine and idazoxan. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 256:606-613, 1991.

TSAY, S. Y., CARISTEDT-DUKE, D., WEIGEL, N. L., DAHLMAN, K., GUSTAFFSSON, J. A., TSAY, M. J. AND O'MALLEY, B. W. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. **Cell**, 55:361-369, 1988.

TSUJINO, T, SANO, H., KUBOTA, Y., HSIEH, S. T., MIYAJIMA, T., SAITO, K., NAKAJIMA, M., SAITO, N. AND YOKOYAMA, M. Expression of Fos-like immunoreactivity by yohimbine and clonidine in the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.** 226:69-78, 1992.

VIVAS, L., PASTUSKOVAS, C. V. AND TONELLI, L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.**, 679:34-41, 1995.

WATSON, W. E. The effect of removing area postrema on the sodium and potassium balances and consumptions in the rat. **Brain Res.**, 359:224-232, 1985.

WEISINGER, R. S., DENTON, D. A., MCKINLEY, M. J. AND NELSON, J. F. Dehydration-induced sodium appetite in rats. **Physiol. Behav.** 34(1):45-50, 1985.

WEISINGER, R. S., DENTON, D. A., DI NICOLARTONIO, R., MCKINLEY, M. J., MULLER, A. F. AND TARJAN, E. Role of angiotensin in sodium appetite of sodium-depleted sheep. **Am. J. Physiol (Regul. Integr. Comp. Physiol.** 22). 253:R482-R488, 1987.

WEISINGER, R. S., BLAIR-WEST, J. R., BURNS, P., DENTON, D. A., MCKINLEY, M. J. AND TARJAN, E. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: A brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. **Regulatory Peptides.** 66:73-81, 1996.

WEISS, M. L., MOE, K. E. AND EPSTEIN, A. L. Interference with central actions of angiotensin II suppresses sodium appetite. **Am. J. Physiol.** 250 (Regul. Integr. Comp. Physiol. 19):R250-R259, 1986.

WELLMAN, P. J., DAVIES, B. J. AND MORIEN, A. Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus alpha 1 and alpha 2 adrenergic receptors. **Life Sci.**, 53 (9):669-679, 1993.

WOLF, G. Hypothalamic regulation of sodium intake: Relations to preoptic and tegmental function. **Am. J. Physiol.**, 213, 1433-1438, 1967.

YADA, M. M., DE PAULA, P. M., MENANI, J. V., RENZI, A., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W. A. AND DE LUCA JR, L. A. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. **Brain Res. Bull.** 42: 205-209, 1997a.

YADA, M. M., DE PAULA, P. M., MENANI, J. V. AND DE LUCA JR, L. A. Central α -adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 57, 137-143, 1997b.

YAMASATO, M., SAKIMA, A., NAKAZATO, J., SESOKO, S., MURATANI, H. AND FUKIYAMA, K. Hypotensive and sedative effects of clonidine injected into the rostroventrolateral medulla of conscious rats. **Am. J. Physiol. (Regul. Integ. Comp. Physiol.)**, 281:R1868-R1876, 2001.

ZARDETTO-SMITH, A. M., BELTZ, T. G. AND JOHNSON, A. K. Role of central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Res.**, 645(1-2):123-34, 1994.

ZHANG, D., EPSTEIN, A. N. AND SCHULKIN. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. **Brain Res.**, 600:20-26, 1993.

ZILLES, K., QU, M. AND SCHLEICHER, A. Regional distribution and heterogeneity of alpha-adrenoceptors in the rat and human central nervous system. **J. Hirnforsch**, 34(2):123-32, 1993.