

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ADRIELE MOREIRA DE FARIA

PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO  
ROSTRAL E DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO  
CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO

Alfenas/MG  
2013

ADRIELE MOREIRA DE FARIA

PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO ROSTRAL E  
DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA  
INGESTÃO DE SÓDIO

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina Aparecida Fabrício de Andrade

Alfenas/MG  
2013

Faria, Adriele Moreira de.

Participação do núcleo do trato solitário rostral e do núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio / Adriele Moreira de Faria. - 2013.

68 f. -

Orientadora: Carina Aparecida Fabrício de Andrade.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO ROSTRAL E  
DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA  
INGESTÃO DE SÓDIO

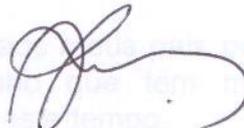
A Banca examinadora abaixo-assinada  
aprova a Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Fisiológicas  
pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Fisiologia.

Aprovada em:

Membro: *Carina A. F. Andrade*  
Instituição: FOAR - UNESP

Assinatura: 

Membro: *Ana Carolina Takakura*  
Instituição: ICB - USP

Assinatura: 

Membro: *Debara S. A. Colu mbani*  
Instituição: FOAR - UNESP

Assinatura: 

Primeiramente, dedico aos meus pais por todo o apoio e carinho que tem me proporcionado por todo este tempo.  
A minha professora Carina pela ajuda e compreensão.  
Aos técnicos pela cooperação na realização do projeto.

“A coragem é a primeira das qualidades humanas porque garante todas as outras”.

(Aristóteles)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as oportunidades oferecidas.

A Luiz Francisco Peleteiro de Faria e Edna Moreira de Faria pelo carinho e apoio oferecidos durante toda realização deste meu trabalho.

Ao meu irmão Andrei Moreira de Faria e toda a minha família que tem me incentivado.

Aos meus amigos Frederico Santiago Silva, Luciana Costa Teodoro, Kriss Cabral, Melissa Siqueira e Marcelo Cezar Costa por toda ajuda e carinho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina Aparecida Fabrício Andrade, pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseli Soncini e Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva pela colaboração técnica no Departamento de Ciências Fisiológicas da UNIFAL-MG.

Aos professores e técnicos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP e do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas-MG pelo apoio e colaboração.

Aos meus colegas da Unesp de Araraquara que participaram na colaboração com a realização desta pesquisa.

Aos Professores, técnicos e funcionários do instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG e da Unesp de Araraquara pelo apoio e excelente trabalho.

À UNIFAL-MG e Unesp de Araraquara por me proporcionaram um aperfeiçoamento profissional.

Aos meus colegas do Instituto de Ciências Biomédicas que, de maneira direta ou indireta, participaram deste trabalho e tornaram possível a elaboração desta pesquisa.

Aos órgãos de fomento (CAPES, FAPESP e FAPEMIG) pelo apoio financeiro à pesquisa, principalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

## RESUMO

O núcleo do trato solitário rostral (NTSr), localizado no bulbo, é considerado a primeira estação sináptica para a integração da informação sensorial ao sódio e envia e recebe projeções de diferentes áreas encefálicas envolvidas com o controle do equilíbrio hidroeletrolítico, incluindo o núcleo parabraquial lateral (NPBL) na ponte. A ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , purinérgicos ou GABAérgicos do NPBL promove uma facilitação da ingestão de sódio hipertônico. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: a) testar se o bloqueio do NTSr altera o comportamento de ingestão de sódio hipertônico; b) testar se a ativação de receptores GABAérgicos do NPBL altera a palatabilidade ao sódio; e c) investigar se há uma interação entre o mecanismo adrenérgico e purinérgico do NPBL para o controle da ingestão de sódio. Foram utilizados ratos Wistar ou Holtzman (290-320g) com cânulas implantadas bilateralmente em direção ao NPBL ou NTSr. Em ratos depletados de sódio (tratamento com furosemida 20 mg/kg s.c. seguido de dieta deficiente de sódio por 24 h), a administração bilateral de cloreto de cobalto (bloqueador da transmissão sináptica, 1 mM/0,1  $\mu$ l) no NTSr promoveu um discreto aumento da ingestão de sódio ( $16,8 \pm 1,9$  ml/60 min), enquanto que não houve alteração da ingestão de sódio após as injeções de muscimol (agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, 120 pmol/0,1  $\mu$ l) ( $11,5 \pm 2,7$  ml/60 min) em relação ao tratamento controle (salina:  $11,1 \pm 1,4$  ml/60 min). Em ratos saciados, administração de muscimol no NPBL não alterou o número de respostas hedônicas ( $89 \pm 18$ ) ou aversivas ( $24 \pm 16$ ) em resposta a infusão intra-oral de NaCl 0,3 M em comparação ao controle (salina:  $117 \pm 15$  e  $23 \pm 10$ , respectivamente). Por último, em animais depletados de sódio, injeções bilaterais de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ /imidazólicos, 0,5 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M ( $29,2 \pm 7,6$ , vs. veículo:  $16,3 \pm 2,6$  ml/120 min) e de água ( $5,1 \pm 1,4$ , vs. veículo:  $1,6 \pm 0,8$  ml/120 min). A prévia administração bilateral de suramin (antagonista purinérgico P2 não seletivo, 2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL reduziu os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M ( $14,0 \pm 6,9$  ml/120 min) e de água ( $1,6 \pm 0,5$  ml/120 min). Porém, apenas a injeção de suramin no NPBL quase aboliu a ingestão de NaCl 0,3 M ( $2,5 \pm 2,4$  ml/120 min) e aboliu a ingestão de água ( $0,1 \pm 0,1$  ml/120 min). Em outro grupo de ratos, moxonidina injetada no NPBL aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M

( $29,7 \pm 4,2$ , vs. veículo:  $18,9 \pm 0,7$  ml/120 min). Apenas a administração bilateral de PPADS (antagonista de receptores purinérgicos P2X,  $4,0$  nmol/ $0,2$   $\mu$ l) no NPBL não alterou a ingestão de NaCl  $0,3$  M ( $18,5 \pm 4,6$  ml/120 min). O pré-tratamento com PPADS no NPBL bloqueou os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl  $0,3$  M ( $14,3 \pm 4,1$  ml/120 min). Em suma, os presentes resultados sugerem que: a) o bloqueio da transmissão sináptica do NTSr pode facilitar a ingestão de sódio; b) o bloqueio de receptores GABAérgicos do NPBL parece não alterar as respostas comportamentais oro-faciais de percepção ao sabor ao sódio hipertônico; e c) há uma importante interação entre o mecanismo purinérgico e adrenérgico  $\alpha_2$  do NPBL para o controle da ingestão de sódio hipertônico induzida por depleção de sódio.

**Palavras-chave:** Apetite. Sódio. Sede. Tronco encefálico. Trifosfato de adenosina. Adrenérgicos .

## ABSTRACT

The rostral portion of the nucleus of the solitary tract (rNTS), located in the medulla oblongata, is considered the first synaptic relay for integration of sodium taste sensorial information. The rNTS receives and send projections to different forebrain and hindbrain areas related to hydroelectrolytic balance control, including the lateral parabrachial nucleus (LPBN) in the pons. Separate activation of  $\alpha_2$ -adrenergic and P2 purinergic receptor, as well as GABAergic receptor activation, in LPBN facilitates hypertonic NaCl intake. Therefore, the aims of the present study were: a) to test if the inhibition of rNTS would change sodium-depletion induced sodium intake; b) to test if the LPBN GABAergic mechanism interfere with sodium palatability; and c) to investigate the effects of the blockage of purinergic receptors of the LPBN on the facilitation of 0.3 M NaCl intake induced by  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation into the LPBN. Thus, male Wistar or Holtzman rats received bilateral LPBN or rNTS cannulas. In sodium-depleted (furosemide, 20 mg/kg b. wt. subcutaneously combined with sodium deficient diet for 24 h) male rats, bilateral injections of cobalt chloride (synaptic blocker, 1 mM/0.1  $\mu$ l) caused a small increase ( $16.8 \pm 1.9$  ml/60 min), while muscimol (GABA<sub>A</sub> receptor agonist, 120 pmol/0.1  $\mu$ l) injections did not change sodium-depletion induced sodium intake ( $11.5 \pm 2.7$  ml/60 min) in comparison to control treatment ( $11.1 \pm 1.4$  ml/60 min). In satiated rats treated with muscimol (0.5 nmol/0.2  $\mu$ l) injections into the LPBN, the number of hedonic ( $89 \pm 18$ ) and aversive ( $24 \pm 16$ ) responses to intra-oral infusion of 0.3 M NaCl were not different from those observed after LPBN saline injections ( $117 \pm 15$  e  $23 \pm 10$ , respectively). Finally, in sodium-depleted rats bilateral LPBN injections of moxonidine ( $\alpha_2$  adrenergic/imidazoline receptor agonist, 0.5 nmol/0.2  $\mu$ l) into the LPBN increased sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake ( $29.2 \pm 7.6$ , vs. vehicle:  $16.3 \pm 2.6$  ml/120 min) and water intake ( $5.1 \pm 1.4$ , vs. vehicle:  $1.6 \pm 0.8$  ml/120 min). Pretreatment with suramim (non-selective P2 purinergic antagonist, 2 nmol/0.2  $\mu$ l) abolished the effects of moxonidine on 0.3 M NaCl intake ( $14.0 \pm 6.9$  ml/120 min) and water intake ( $1.6 \pm 0.5$  ml/120 min). However, suramim alone into the LPBN almost abolished 0.3 NaCl intake ( $2.5 \pm 2.4$  ml/120 min) and abolished water intake ( $0.1 \pm 0.1$  ml/120 min) by sodium depleted rats. In another group of rats, bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2  $\mu$ l) into the LPBN increased sodium depletion-induced 0.3 M NaCl intake ( $29.7 \pm 4.2$ , vs. vehicle:  $18.9 \pm 0.7$  ml/120 min). The P2X purinergic antagonist PPADS

(pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, 4 nmol/0.2  $\mu$ l) alone into the LPBN did not change 0.3 NaCl intake ( $18.5 \pm 4.6$  ml/120 min). Therefore pretreatment with PPADS into the LPBN abolished the effects of moxonidine on 0.3 M NaCl intake ( $14.3 \pm 4.1$  ml/120 min). In summary, present results suggest that a) synaptic blockade into rNTS might facilitate sodium intake; b) GABAergic mechanisms into the LPBN are not involved with sodium palatability in satiated rats and c)  $\alpha_2$ -adrenergic and P2X purinergic receptors interact in the LPBN to facilitate sodium intake.

**Key words:** Sodium. appetite. Thirst. Hindbrain. Adenosine triphosphate.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

**ADH** – hormônio anti-diurético  
**ANG I** – angiotensina I  
**ANG II** – angiotensina II  
**ANP** – peptídeo natriurético atrial  
**AP** – área postrema  
**ATP**-adenosina trifosfato  
**AVP** – arginina vasopressina  
**BNST**- núcleo da estria terminal  
**CAP** – captopril  
**CCK** – colecistocinina  
**CoCl<sub>2</sub>**- cloreto de cobalto  
**ECA** – enzima conversora de angiotensina  
**FURO** – furosemida  
**GABA**- ácido  $\gamma$ - butírico  
**IO**- intraoral  
**kg** – quilograma  
**M** – molar  
**mg** – miligrama(s)  
**mm**-milímetros  
**min** - minutos  
**ml** – mililitro(s)  
**mM**- mili molar  
**ms**- mili segundos  
**MnPO** – núcleo pré-óptico mediano  
**n**- número de animais  
**Na<sup>+</sup>** - sódio  
**NPB** – núcleo parabraquial  
**NPBL** – núcleo parabraquial lateral  
**NPBm** – núcleo parabraquial medial  
**NTS** – núcleo do trato solitário  
**cNTS** – núcleo do trato solitário comissural  
**NTSm** – núcleo do trato solitário medial

**NTSr** – núcleo do trato solitário rostral

**NaCl**- cloreto de sódio

**OCVs** – órgãos circumventriculares

**OT** – ocitocina

**OVL**T – órgão vasculoso da lâmina terminal

**PPADS** – pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid;

**PVN** – núcleo paraventricular

**Sal** – salina

**sc** – subcutâneo

**SFO** – órgão subfornical

**SNC** – sistema nervoso central

**SON**- núcleo supra-óptico

**SURAMIN** – 8,8'- [Carbonylbis [imino-3,1-phenylenecarbonylimino (4-methyl-3,1 phenylene)carbonylimino]] bis-1,3,5-naphthalene trisulfonic acid hexasodium salt

**Vei** – veículo

**VPMpc** - núcleo talâmico posteromedial ventral parvocelular

**5-HT** – serotonina

**$\alpha,\beta$ -MeATP**–  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio em ratos que receberam injeções unilaterais ou em regiões fora do NTSr (injeções negativas) de muscimol, cloreto de cobalto ou salina.....	42
Tabela 2	Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio que receberam injeções de antagonista purinérgico P2 e moxonidina em regiões fora do NPBL (injeções negativas).....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das subdivisões do NPBL.....	21
Figura 2	Esquema das projeções gustatórias para o NTSr.....	25
Figura 3	Esquema da localização de implante intra-oral e aparato experimental para o estudo da reatividade ao sabor com soluções infundidas diretamente na cavidade oral.....	31
Figura 4	Localização histológica das cânulas no NPBL e NTSr.....	39
Figura 5	Efeitos de injeções bilaterais de muscimol ou cloreto de cobalto no NTSr sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio.....	41
Figura 6	Efeitos da administração de bilateral de muscimol no NPBL sobre o teste de reação ao sabor ao NaCl 0,3 M.....	43
Figura 7	Efeitos da prévia administração de antagonista purinérgico P2 (suramin) no NPBL sobre os efeitos da administração de moxonidina (agonista de receptores adrenérgico $\alpha_2$ /imidazólicos) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio.....	44
Figura 8	Efeitos da prévia administração de PPADS (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2X) sobre os efeitos da administração de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ /imidazólicos) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio.....	46

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1	IMPORTÂNCIA DO NPBL AO SÓDIO HIPERTÔNICO .....	20
1.2	PAPEL DO NTS ROSTRAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO HIPERTÔNICO.....	24
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	GERAIS.....	27
2.2	ESPECÍFICOS.....	27
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	ANIMAIS.....	28
3.2	CIRURGIA PARA O IMPLANTE DE CÂNULAS NO NPBL e NTSr..	28
3.3	INJEÇÃO DAS DROGAS NO ENCÉFALO.....	29
3.4	DROGAS UTILIZADAS.....	29
3.5	TESTE DE REAÇÃO AO SABOR.....	30
3.6	DEPLEÇÃO DE SÓDIO 24 HORAS.....	32
3.7	INDUÇÃO E MEDIDA DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M..	32
3.8	HISTOLOGIA PARA CONFIRMAÇÃO DOS PONTOS DE INJEÇÃO.....	33
3.9	EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	33
3.9.1	Efeitos de injeções bilaterais de muscimol ou cloreto de cobalto no NTSr sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio.....	33
3.9.2	Efeitos da administração bilateral de muscimol no NPBL sobre a análise de reação ao sabor ao NaCl 0,3 M.....	34
3.9.3	Efeitos da administração prévia de suramin (antagonista de receptores purinérgicos P2) no NPBL sobre os efeitos da administração de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ /imidazólicos) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.....	35
3.9.4	Efeitos da administração prévia de PPADS (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2X) no NPBL sobre os efeitos da administração de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ /imidazólicos) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.....	36
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	LOCALIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS CÂNULAS NO NPBL e NTSr.....	38
4.2	EFEITOS DE INJEÇÕES BILATERAIS DE MUSCIMOL (120 pmol/0,1 µl), CLORETO DE COBALTO (1 mM/0,1 µl) OU SALINA NO NTSr SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO.....	40
4.3	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE MUSCIMOL NO NPBL SOBRE O TESTE DE REAÇÃO AO SABOR AO NaCl 0,3 M.....	42
4.4	EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE INJEÇÕES BILATERAIS DE SURAMIN (2 nmol/0,2 µl) E MOXONIDINA (0,5 nmol/0,2 µl) NO NPBL SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO.....	43
4.5	EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE INJEÇÕES BILATERAIS DE PPADS (4 nmol/0,2 µl) E MOXONIDINA (0,5 nmol/0,2 µl) NO NPBL SOBRE A INGESTÃO DE NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO.....	45
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1	PAPEL DO NTSr SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO.....	48
5.2	ATIVAÇÃO DE RECEPTORES GABAÉRGICOS NO NPBL E A PALATABILIDADE AO NaCl 0,3 M.....	51
5.3	INTERAÇÃO ENTRE O MECANISMO PURINÉRGICO E ADRENÉRGICO $\alpha_2$ NO NPBL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO.....	52
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A regulação precisa do volume dos líquidos corporais e da osmolaridade plasmática é fundamental para a sobrevivência das células. A água é responsável por cerca de 60 % do peso corporal. O sódio ( $\text{Na}^+$ ) é um importante constituinte do compartimento extracelular e o maior determinante da osmolaridade e volume do líquido extracelular. A busca e a ingestão de água e sódio, comportamentos essenciais para a reposição desses nutrientes, pelo menos em mamíferos, estão associados aos estados motivacionais de sede e apetite ao sódio. Sede é decorrente da deficiência de água, a qual está associada ao desejo de ingerir água, enquanto que a deficiência de sódio resulta em apetite ao sódio, evidenciado pelo aumento na ingestão de soluções/substâncias com concentrações de sódio que normalmente seriam evitadas (RICHTER, 1939; EPSTEIN; STELLAR, 1955; FITZSIMONS, 1998; JOHNSON; THUNHORST, 1997).

A remoção de água ou desidratação celular pode afetar o funcionamento das células. Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento na pressão osmótica efetiva do compartimento extracelular, promovendo uma redução do volume de água das células, caracterizando assim a “desidratação intracelular”. A desidratação pode ser absoluta quando há perda de água dos compartimentos celular e extracelular, como acontece na privação de água, ou relativa se existir apenas uma perda de água celular, que se difunde para o líquido extracelular, como ocorre, por exemplo, na ingestão ou sobrecarga de solutos osmoticamente ativos. A desidratação extracelular ou a hipovolemia prejudica a perfusão tecidual e, conseqüentemente, o aporte de nutrientes e remoção de produtos do metabolismo celular. Em situações como hemorragia, diarreia, vômito, depleção de sódio, por exemplo, ocorre redução unicamente do volume do líquido extracelular, caracterizando assim a “desidratação extracelular”. É importante destacar que nessa situação há uma perda conjunta de água e de sódio, e por isso ela é geralmente acompanhada de comportamento apetitivo ao sódio. Embora os dois tipos de desidratação sejam experimentalmente e clinicamente separáveis, é comum a ocorrência simultânea de ambas, principalmente durante privação hídrica (DE LUCA JR. et al., 2005). Portanto, a quantidade de sódio nos líquidos corporais deve ser

mantida dentro de estreitos limites de variação para assegurar um funcionamento ideal dos processos fisiológicos.

Por outro lado, várias evidências correlacionam o consumo excessivo de sal ao desenvolvimento ou agravamento de doenças crônicas, incluindo a hipertensão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; HE; MACGREGOR, 2012). Estima-se que a quantidade diária de sódio consumida pela população brasileira é de 4,5 g por pessoa, independente da região ou classe de renda, excedendo assim em mais de duas vezes o limite recomendado de ingestão desse nutriente, (SARNO et al., 2009). O excesso de sódio ingerido na maioria das vezes está associado ao aumento da palatabilidade dos alimentos.

A expressão do apetite ao sódio depende do balanço entre sinais facilitadores (natriorexigênicos) e inibidores (antinatriorexigênicos). A hipovolemia ativa o sistema hormonal renina-angiotensina-aldosterona e desativa barorreceptores cardiopulmonares. Em contrapartida, a hiperosmolaridade plasmática ativa os mecanismos antinatriorexigênicos do núcleo parabraquial lateral (NPBL), (DE LUCA JR. et al., 2003; ANDRADE et al., 2006; KIMURA et al., 2008) e ocitocinêrgicos hipotalâmicos, (BLACKBURN et al., 1993, 1995).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um importante sistema hormonal ativado em situações de hipovolemia. A renina, uma enzima proteolítica, atua sobre o substrato plasmático, o angiotensinogênio (uma proteína globular sintetizada no fígado), produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I). A ANG I sob a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) produz um octapeptídeo ativo, denominado angiotensina II (ANG II). Sabe-se que a fonte de renina é o aparelho justaglomerular renal, e que as células da mácula densa também exercem importante função no controle da secreção da renina. Fatores como redução da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores do subtipo  $\beta_1$  adrenérgicos, catecolaminas ou prostaglandinas circulante, ativam a secreção de renina (FITZSIMONS, 1998).

Estudos clássicos de Fitzsimons et al. (para revisão vide FITZSIMONS, 1998) foram os primeiros a demonstrar que a ANG II eram efetivos como estímulos dipsogênicos. Além de estimular a ingestão de água e de sódio, a ANG II apresenta outras funções fisiológicas, como regulação da pressão arterial, excreção de sódio, e

a secreção de vasopressina, (FITZSIMONS, 1998). Receptores centrais para ações da ANG II já foram demonstrados em diversas áreas encefálicas como órgão subfornical (SFO), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), núcleo paraventricular (PVN), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), área postrema (AP) e núcleo do trato solitário (NTS) (LEWIS et al., 1986; MCKINLEY et al., 1987; ALLEN et al., 1988). Dos vários receptores de ANG II (existem pelo menos quatro) os mais importantes para seu efeito dipsogênico são os receptores AT<sub>1</sub> presentes em órgãos circunventriculares prosencefálicos, tais como SFO e OVLT, podendo haver também alguma participação de receptores AT<sub>2</sub> (FITZSIMONS, 1998). O modelo atual da ação da angiotensina II admite que a quantidade aumentada do hormônio circulante em resposta a uma hipovolemia se difunde para o espaço extracelular parenquimal ativando neurônios do SFO, que então se projetam formando a primeira estação sináptica em estruturas com barreira hematoencefálica como, por exemplo, no MnPO, de onde partem sinais em direção aos circuitos neurais que comandam a ingestão de água (OLDFIELD; MCKINLEY, 1995; JOHNSON; THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al., 2001; MCKINLEY; JOHNSON, 2004).

A aldosterona, um mineralocorticoide, também tem papel fundamental na conservação de sódio (como a ANGII) no organismo, e é o sinal endócrino final do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A secreção de aldosterona pela zona fasciculada da adrenal é regulada pela ANG II e concentração extracelular de potássio. A aldosterona atua nos ductos coletores renais e cólon para regular a (re)absorção de sódio e secreção de potássio (BOOTH et al., 2002). Atuando no SNC, a aldosterona estimula o apetite ao sódio (GALAVARNA et al., 1991; SAKAI et al., 1996; GEERLING; LOEWY, 2009). A angiotensina II e os mineralocorticóides sinergicamente produzem apetite ao sódio em ratos hidratados (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; SAKAI et al., 1996), resposta mediada possivelmente pela ativação de neurônios em áreas prosencefálicas (órgão subfornical e órgão vascular da lâmina terminal), (FITZSIMONS, 1998) e romboencefálicas (núcleo do trato solitário), (GEERLING; LOEWY, 2009).

## 1.1 IMPORTÂNCIA DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL (NPBL) NA INGESTÃO AO SÓDIO HIPERTÔNICO.

No tronco encefálico, um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de água e especialmente de sódio foi descrito para o NPBL, (COLOMBARI et al., 1996; EDWARDS; JOHNSON, 1991; MENANI et al., 1996, 1998a,1998b, 2000; MENANI; JOHNSON, 1995). O NPBL é uma das subdivisões do complexo núcleo parabraquial (NPB) (vide figura 1).

O NPBL possui conexões recíprocas com áreas prosencefálicas, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo central da amígdala e núcleo pré-óptico mediano, e também com áreas bulbares, como a área postrema (AP) e a porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm), (NORGREN, 1981; CIRIELLO et al., 1984; FULWILER; SAPER, 1984; LANÇA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT et al., 1990; KRUKOFF et al., 1993; JHAMANDAS et al., 1996).

As células do NPBL são ativadas após a ingestão de soluções de sódio em animais desidratados ou em ratos que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico, (KOBASHI et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1993; FRANCHINI; VIVAS, 1999), sugerindo que as células do NPBL possam receber sinais inibitórios viscerais e de sabor. Portanto, o NPBL pode receber e integrar sinais viscerais e de sabor que ascendem da AP/NTSm em direção às áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

Os mecanismos inibitórios do NPBL para a ingestão de sódio são modulados por diferentes neurotransmissores como a serotonina, colecistocinina, glutamato, fator liberador de corticotrofina, opióides e noradrenalina (ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010a, 2010b; CALLERA et al., 2005; DE CASTRO E SILVA et al., 2005; DE GOBBI et al., 2000, 2008, 2009; DE OLIVEIRA et al., 2007, 2008; GASPARINI et al., 2009; MENANI et al., 1996, 1998a, 1998b, 2000).

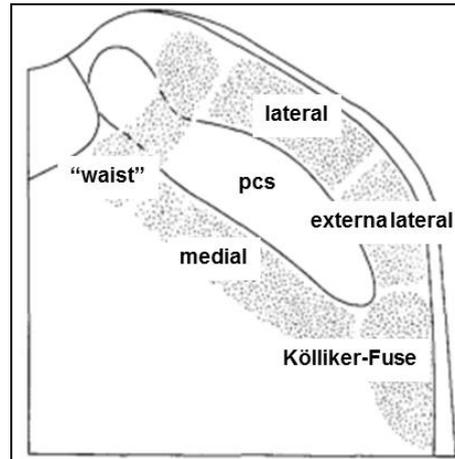


Figura 1 - Desenho esquemático do núcleo parabraquial (NPB) ilustrando suas subdivisões: "waist", medial (NPBM), lateral (NPBL) e núcleo Kölliker-Fuse. Psc: pedúnculo  
 Fonte: HERBERT; FLÜGGE, 1995, modificado

A ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  com injeções bilaterais de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  e imidazólicos) ou noradrenalina produz um potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzido pelo tratamento subcutâneo do diurético furosemida (FURO) combinado com baixa dose do inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (CAP) (ANDRADE et al., 2004; GASPARINI et al., 2009; ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010). O potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pela administração de moxonidina no NPBL (mais do que dez vezes a quantia ingerida pelos controles tratados com FURO + CAP sc e veículo no NPBL) foi completamente abolido pelo RX 821002, um antagonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , indicando que a moxonidina produz um potente, seletivo e específico aumento da ingestão de NaCl hipertônico pela ação em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , (ANDRADE et al., 2004). Em conjunto esses resultados sugerem que a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  do NPBL podem reduzir os efeitos dos mecanismos inibitórios que limitam a ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2004; GASPARINI et al., 2009; ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010a). Como já foi demonstrado, os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no NPBL sobre a ingestão de sódio não são devido a uma facilitação não específica de todos os comportamentos ingestivos, uma vez que a ingestão de

solução de sacarose ou a ingestão de alimento não são alteradas pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL (ANDRADE et al., 2004, 2007).

A ativação de receptores GABA<sub>A</sub> no NPBL com injeções bilaterais de muscimol induz uma potente ingestão de NaCl hipertônico em animais saciados e normoidratados (CALLERA et al., 2005). Muscimol no NPBL também aumenta a ingestão de sódio induzida pelo tratamento FURO + CAP sc, por depleção de sódio por 24 h, ou por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (CALLERA et al., 2005; De OLIVEIRA et al., 2007; KIMURA et al., 2008). O pré-tratamento com bicuculina (antagonista receptor GABA<sub>A</sub>) aboliu os efeitos do muscimol (CALLERA et al., 2005), confirmando a participação dos receptores GABA<sub>A</sub> no controle da ingestão de sódio.

Mais recentemente também foi demonstrada a participação de mecanismos purinérgicos do NPBL no controle da ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (MENEZES et al., 2011). As injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP ( $\alpha,\beta$ -metilenoadenosina 5'-trifosfato), agonista seletivo de receptores purinérgicos P2X, aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio [tratamento com o diurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal) seguido de dieta deficiente de sódio por 24 horas]. A administração bilateral no NPBL do antagonista purinérgico P2 não seletivo, suramin, reduziu a ingestão de sódio induzida por depleção. Já o pré-tratamento no NPBL com o antagonista de receptores purinérgicos P2X, PPADS (ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfúrico), aboliu os efeitos das injeções de  $\alpha,\beta$ -metil ATP sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção. Esses resultados sugerem que a ativação de receptores purinérgicos do NPBL facilita a ingestão de sódio, provavelmente por restringir os mecanismos do NPBL que inibe a ingestão de sódio (MENEZES et al., 2011).

É importante ressaltar que embora esse estudo claramente demonstre o envolvimento do mecanismo purinérgico do NPBL no controle da ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (MENEZES et al., 2011), é possível que este não atue individualmente e sim possa interagir com outros neurotransmissores presentes no NPBL para controlar o comportamento de ingestão de sódio. De fato, o ATP poderia agir como um co-transmissor com a noradrenalina e poderia aumentar a liberação de noradrenalina e GABA (BURNSTOCK, 1972, 1986; ESPALLERGUES et al., 2007), o que facilitaria a ingestão de sódio.

Para verificar uma possível interação entre os mecanismos purinérgico e adrenérgico  $\alpha_2$  do NPBL no controle da ingestão água e NaCl, investigamos se a administração no NPBL de antagonistas purinérgicos modificaria os efeitos do agonista adrenérgico sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água.

Além do papel dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no controle da ingestão de sódio, recentes resultados com injeções de moxonidina no NPBL mostram que há uma alteração do padrão de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M (ANDRADE et al., 2011). O teste de reatividade ao sabor, que determina a frequência de reações comportamentais hedônicas e aversivas em resposta a um estímulo de sabor diretamente infundido na cavidade oral do rato, foi desenvolvido originalmente por Grill e Norgren (1978). Essa metodologia avalia a ocorrência de reações comportamentais afetivas espécie específicas (tal como protrusão da língua relacionada com a ingestão ou abertura aversiva da boca) em resposta a estimulação oral (GRILL; NORGREN, 1978; GRILL; BERRIDGE, 1985). Ambos humanos e ratos exibem expressões faciais estereotipadas em resposta a diferentes sabores aplicados diretamente na cavidade oral, e essas expressões têm sido extensivamente usadas como uma medida comportamental do valor hedônico do sabor (GRILL; NORGREN, 1978). Em humanos, essas expressões podem ser produzidas logo após o nascimento antes mesmo de qualquer experiência de estímulo de sabores na cavidade oral tenha ocorrido (em outras palavras, antes do recém nascido ter recebido qualquer líquido para ingestão) (STEINER, 1973, 1974, 1979). Essas expressões faciais estereotipadas em resposta a diferentes sabores aplicados diretamente na cavidade oral são, portanto consideradas inatas, implicando que os circuitos para a detecção do sabor são determinados durante o desenvolvimento (STEINER, 1973, 1974, 1979; BERRIDGE, 2000).

Em relação ao mecanismo GABAérgico do NPBL, ainda não tem estudos sobre o papel do GABA nesse núcleo em relação à palatabilidade ao sódio hipertônico em animais saciados. Para responder se a ativação de receptores GABAérgicos do NPBL poderia alterar as respostas aversivas ou as respostas hedônicas em ratos saciados, investigamos os possíveis efeitos da administração bilateral de muscimol (agonista de receptores GABA<sub>A</sub>) sobre a palatabilidade ao sódio hipertônico em ratos saciados.

## 1.2 PAPEL DO NTS ROSTRAL (NTSr) NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO HIPERTÔNICO.

O NTS é formado por um conjunto heterogêneo de neurônios localizados na porção dorso-medial do bulbo, estendendo-se rostrocaudalmente como duas colunas bilaterais que se unem na porção mais caudal. O NTS pode ser dividido de acordo com a sua disposição no sentido rostro-caudal em: NTS rostral, NTS intermediário e NTS caudal. O NTS é um grande núcleo sensorial do bulbo que recebe informação cardiovascular, visceral, respiratória, gustatória e informação tátil da cavidade oral (LOEWY, 1990).

Toda a informação sensorial da cavidade oral é transmitida para o sistema nervoso central pelos nervos facial, glossofaríngeo, vago e trigêmeo até o NTS rostral (HAMILTON; NORGREN, 1984), vide Figura 2. As sensações gustatórias chegam ao sistema nervoso central por meio de três principais vias: inervação vagal (X) da faringe, inervação glossofaríngea (IX) da parte posterior da língua e inervação facial (VII) da parte anterior da língua. É por meio desta última que o sabor do sódio chega ao SNC (FRANK et al., 1983). Secção do ramo corda do tímpano do nervo facial, mas não a secção do nervo glossofaríngeo, interrompe drasticamente a discriminação do NaCl de outros cloretos, enquanto a discriminação aos outros sabores permanece intacta, (BRESLIN et al., 1993). As fibras do nervo corda do tímpano terminam no NTSr, (HAMILTON; NORGREN, 1984).

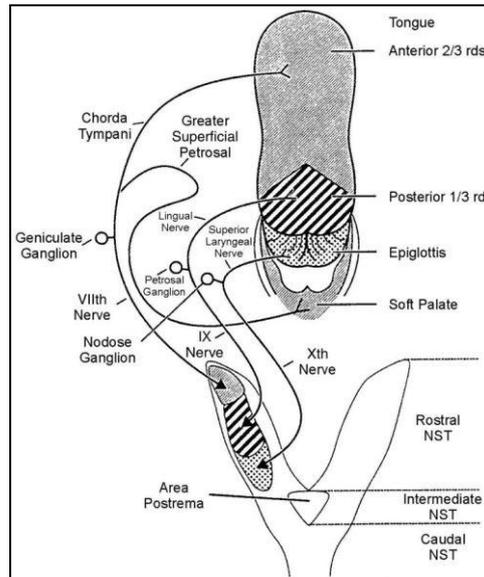


Figura 2 - Esquema das projeções de vias gustatórias para o NTSr  
 Fonte: BRADLEY, 2007, modificado.

Como a primeira estrutura central que recebe informação orosensorial, um dos papéis principais do NTSr é disseminar a informação oral e sensorial para diversas áreas do SNC envolvidas com a percepção sensorial e a geração de respostas e comportamentos fisiológicos adequados. Uma importante projeção do NTSr se dirige para a formação reticular parvocelular (BECKMAN; WHITEHEAD, 1991; TRAVERS, 1988; SHAMMAH-LAGNADO et al., 1992; STREEFLAND; JANSEN, 1999), uma área que contém neurônios que se projetam para núcleos oromotores do tronco encefálico. Outras projeções do NTSr terminam no NTS caudal, núcleo salivatório e diretamente nos núcleos oromotores do tronco encefálico (TRAVERS, 1988; TRAVERS, 1995).

Além de projeções mencionadas, o NTSr também envia projeções ascendentes para o núcleo parabraquial (NPB). Estudos eletrofisiológicos estimam que entre 31 a 80% dos neurônios do NTSr responsivos ao estímulo de sabor aplicado na cavidade oral se projetam para o NPB (MCPHEETERS et al., 1990; CHO et al., 2002; MONROE; Di LORENZO, 1995; BRADLEY, 2007). Como revisado previamente (NORGREN, 1995), partindo do NPB, maior parte dessa informação sensorial prossegue para regiões talâmicas, como o núcleo talâmico posteromedial ventral parvocelular (VPMpc), a qual envia projeções passando pela zona incerta até

relevantes regiões corticais. Além disso, algumas projeções do NPB se dirigem para o hipotálamo lateral, núcleo da estria terminal (BNST) e núcleo central da amígdala (NORGREN, 1976, 1974; BERNARD, 1993).

Por meio do uso do teste de reatividade ao sabor, já foi verificado que animais saciados e normovolêmicos exibem uma mistura de comportamentos hedônicos e aversivos em resposta a infusão intraoral de NaCl 0,5 M, enquanto que a depleção de sódio promove uma mudança desse perfil, aumentando o número de respostas hedônicas e reduzindo as respostas aversivas ao sódio hipertônico infundido oralmente (BERRIDGE et al., 1984; GRILL; BERNSTEIN, 1988). Trabalhos com lesões eletrolíticas estudaram a importância de estruturas da via gustatória central para o aparecimento do apetite ao sódio. Lesões eletrolíticas realizadas tanto no NTSr, NPB ou VPMpc interromperam a mudança na reação ao sabor observada em animais intactos após a depleção de sódio, (FLYNN et al., 1991). Já as lesões eletrolíticas do NPB e NTSr, mas não do tálamo bloquearam a expressão comportamental do apetite ao sódio, observada em animais intactos após a depleção de sódio, (FLYNN et al., 1991). Apesar da limitação de que lesões eletrolíticas destroem tanto corpos celulares como fibras de passagem, esse estudo mostrou que o NTSr e o NPB, a primeira e segunda estação sináptica das aferências gustatórias do sabor ao sódio em ratos, são importantes na reatividade ao sabor do sódio em situações de deficiência de sódio, (FLYNN et al., 1991).

Em relação ao NTSr, apesar de vários estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram a participação dessa área no processamento das informações sensoriais (para revisão vide BRADLEY, 2007), os efeitos do bloqueio reversível exclusivamente dos neurônios NTSr na modulação do comportamento ingestivo induzida pela depleção de sódio ainda permanecem desconhecidos. Considerando a) a lesão eletrolítica do NTSr bloqueia a expressão comportamental do apetite ao sódio; b) que o NTSr envia e recebe projeções de diferentes áreas encefálicas envolvidas com o equilíbrio hidroleletrolítico e c) a importância do NTSr como primeira estação sináptica para a integração da informação sensorial ao sódio, investigamos os possíveis efeitos do bloqueio farmacológico reversível ou do bloqueio farmacológico da transmissão sináptica do NTSr sobre a ingestão de NaCl 0,3 M em animais depletados de sódio.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos.

### 2.1 GERAIS

Investigar se o NTSr está envolvido na modulação do apetite ao sódio hipertônico induzido por depleção de sódio, se a inibição do NPBL altera a palatabilidade ao sódio hipertônico em animais saciados e se há uma interação entre os mecanismos adrenérgicos e purinérgicos do NPBL para controlar a ingestão de sódio hipertônico induzida por depleção de sódio.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar se o bloqueio da transmissão sináptica ou ativação de receptores GABA<sub>A</sub> do NTSr altera o comportamento de ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio;
- Estudar se a ativação de receptores GABA<sub>A</sub> no NPBL altera a palatabilidade ao NaCl 0,3 M em animais saciados;
- Estudar se há uma interação entre os receptores purinérgicos e adrenérgicos  $\alpha_2$  no NPBL no controle da ingestão água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O material e metodologia utilizados para a realização deste trabalho são descritos a seguir.

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar e Holtzman com peso de 280g a 320g provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas e da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso a ração comercial, água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos permaneceram em salas climatizadas com ciclo claro-escuro 12h-12h (luz 7h00 – 19h00h). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL (Protocolo nº: 370/2011) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo nº: 15/2011).

#### 3.2 CIRURGIA PARA O IMPLANTE DE CÂNULAS NO NPBL e NTSr

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos ratos. Utilizando-se o bregma, foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Para o NPBL, utilizaram-se as coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 4,1 mm abaixo da dura-máter bilateralmente. Para

o NTSr, foram utilizadas as coordenadas: 12,5 mm caudal ao bregma, 3,2 mm lateral à linha mediana e 6,2 mm abaixo da dura-máter bilateralmente. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica. Imediatamente após o término do procedimento cirúrgico, administrou-se por via subcutânea o analgésico cetoprofeno 1% (0,03 ml/rato) e antibiótico (pentabiótico para animais de pequeno porte, Fort Dodge, 0,2 ml/rato) por via intramuscular.

### 3.3 INJEÇÃO DAS DROGAS NO ENCÉFALO

As injeções no NPBL e NTSr foram feitas utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no encéfalo pela cânula guia previamente fixada. A agulha injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia.

### 3.4 DROGAS UTILIZADAS

- cloreto de cobalto (Sigma), bloqueador da transmissão sináptica.
- cloridrato de moxonidina, agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ /imidazólicos, (Sigma).
- furosemida (FURO, Sigma), diurético salurético, (20 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea).
- muscimol, agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, (Sigma).
- PPADS (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2X, Sigma).
- suramin (antagonista purinérgico P2 não seletivo, Tocris Bioscience).

O cloreto de cobalto reduz o influxo pré-sináptico de cálcio, causando uma inibição da liberação de neurotransmissores com um consequente bloqueio sináptico, sem alterar as fibras de passagem (KRETZ, 1984). O cloreto de cobalto foi administrado no NTSr na dose de 1 mM/0,1 µl e foi dissolvido em salina. A

concentração de cloreto de cobalto utilizada no presente estudo (1 mM) foi baseada em estudos de Crestani et al. (2010) e Granjeiro et al. (2012).

A moxonidina foi administrada no NPBL na dose de 0,5 nmol/0,2 µl com base em prévios estudos (ANDRADE et al., 2004, 2006, 2011, 2012), dissolvida em uma mistura de propilenoglicol e água 2:1 (veículo).

A furosemida (FURO), diurético salinúrico, (20 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea) foi dissolvida em salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Muscimol foi administrado no NPBL na dose de 0,5 nmol/0,2 µl de acordo com estudos prévios (CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2007) e foi dissolvido em salina. Para as injeções no NTSr foi utilizada a dose de 120 µmol de muscimol com base em estudos prévios de Moreira et al. (2005) e Takakura et al. (2007). O PPADS e suramim foram administrados no NPBL nas doses de 4nmol/0,2µl e de 2nmol/0,2µl, respectivamente, dissolvidos em salina isotônica estéril. As doses de PPADS e suramim foram baseadas em prévios estudos (DE PAULA et al., 2004; MENEZES et al., 2011).

Salina isotônica estéril ou veículo (propilenoglicol/água 2:1) foram injetados no NPBL e NTSr nos experimentos controles.

### 3.5 TESTE DE REAÇÃO AO SABOR

Essa técnica foi realizada de acordo com Andrade et al., 2011. Ratos Holtzman, receberam implantes de uma cânula intraoral. A cânula intraoral (PE 50) foi inserida na cavidade oral do rato lateralmente ao primeiro molar maxilar, ascendeu pela lateral do crânio, foi conduzida subcutaneamente e exteriorizou-se pelo dorso do animal. Essa cânula não interfere com o comportamento alimentar normal do animal e permite infusão direta de soluções no interior da boca.

Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a um período de habituação por 4 dias, e expostos por 10 minutos à gaiola onde se realizou o teste da reação ao sabor e, a seguir, foi feita infusão de 1 ml de água pela cânula intraoral.

No momento do experimento, a cânula intraoral foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50), para a infusão da solução diretamente na cavidade oral do rato.

O rato foi então colocado na gaiola-teste, e em seguida realizou a infusão da solução de NaCl 1,8% na cavidade oral do rato (1 ml/min). Os comportamentos do rato em resposta à infusão intraoral de NaCl 0,3 M foram gravados por meio de uma filmadora, com o auxílio de um espelho montado abaixo do fundo transparente da gaiola, que permitiu a câmera aproximar a imagem de tal forma que a face do rato ocupe a tela inteira. Vide figura 3.

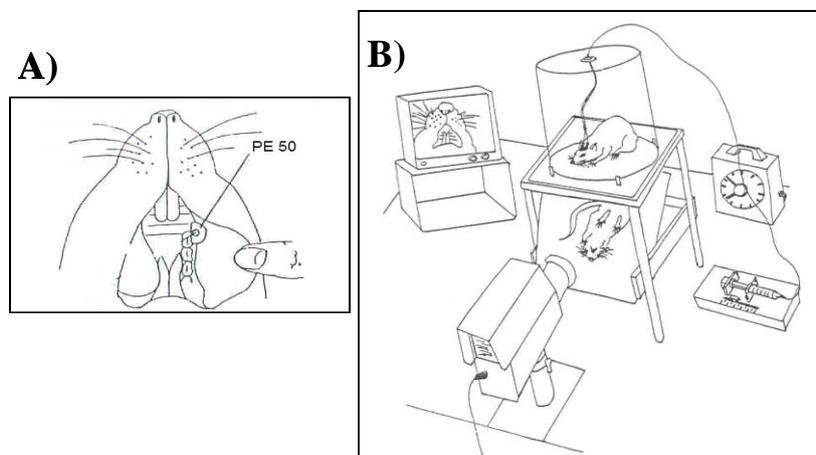


Figura 3 - A) Esquema da localização do implante da cânula intraoral e B) esquema do aparato experimental para o estudo da palatabilidade (reatividade ao sabor) às soluções infundidas diretamente na cavidade oral

Fonte: GRILL; BERRIDGE, 1985, modificado.

O comportamento de cada rato foi avaliado pela ocorrência de comportamentos de reação ao sabor considerados “neutros”, hedônicos ou aversivos (vide GRILL; BERRIDGE, 1985 para uma discussão da análise dos comportamentos de reação ao sabor e classificação). Comportamentos **hedônicos** são: lambidas das patas, protrusões laterais da língua, protrusões rítmicas da língua ao longo da linha mediana com duração de cerca de 160 ms. Comportamentos **neutros** são: movimentos rítmicos da boca e escoamento passivo, ou seja, a saída passiva de líquidos da boca. Comportamentos **aversivos** são: gapes, grande abertura da mandíbula e retração dos lábios inferiores; chin rubbing, ato de trazer a boca em contato direto com o chão da gaiola e projetar o corpo para frente; limpeza da face, ato de passar as patas uma ou várias vezes sobre a face; forelimb flail, movimentos

com os membros anteriores; movimentos da cabeça com frequência maior que 60 Hz, e finalmente rápida locomoção no interior da gaiola. As gravações foram analisadas em câmera lenta em 1/30 a 1/10 da velocidade normal.

### 3.6 DEPLEÇÃO DE SÓDIO

A depleção de sódio foi feita pelo tratamento com uma única dose do diurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal, s.c.), seguido da manutenção dos ratos por 24h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciar o protocolo experimental, de acordo com Menezes et al., 2011. Está bem estabelecido que durante a depleção de sódio com furosemida ocorrem alterações neuroendócrinas, como um elevado nível de angiotensina II (ANG II) e aldosterona circulante (HABER, 1976; SPEILMAN; DAVIS, 1974), redução na reatividade vascular (ARMSWORTH et al., 1986; GERKENS et al., 1987), a desativação de receptores de volume e atenuação do barorreflexo (ROCCHINI et al., 1977; ECHTENKAMP; ANDERSON, 1988).

### 3.7 MEDIDA DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M

Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizadas buretas graduadas com divisão de 0,1ml. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de experimento, os ratos não tiveram acesso à ração.

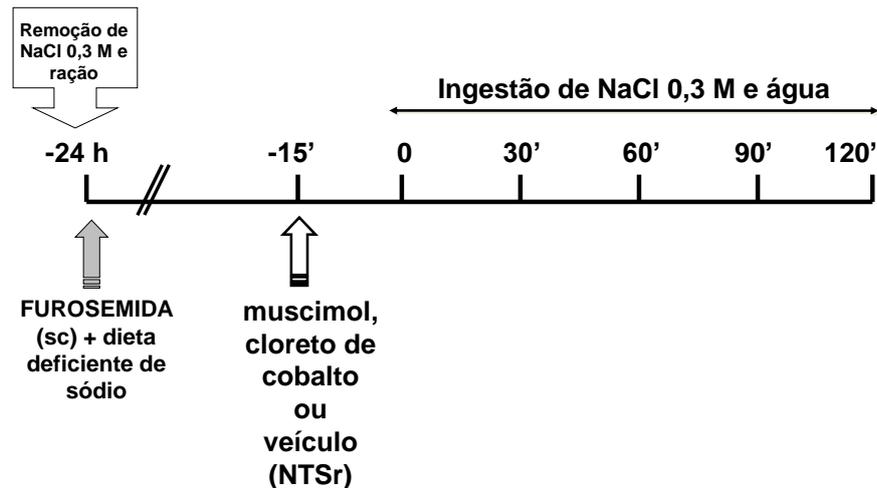
### 3.8 HISTOLOGIA CEREBRAL PARA CONFIRMAÇÃO DOS PONTOS DE INJEÇÃO MEDIDA DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M

Ao final dos experimentos, os ratos receberam injeção de 100 µl de solução de azul de Evans 2% bilateralmente no NTSr e NPBL para confirmar o local de injeção. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução de formalina 10% (40 ml). A seguir, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por 2-4 dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos no ponto de injeção do NTSr ou NPBL com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâminas, foram corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização do sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico.

### 3.9 EXPERIMENTOS REALIZADOS

#### 3.9.1 Efeitos de injeções bilaterais de muscimol ou cloreto de cobalto no NTSr sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio

Os animais com cânulas bilaterais implantadas no NTSr submetidos ao tratamento de depleção de sódio receberam injeções bilaterais de muscimol (120 pmol/0,1 µl), cloreto de cobalto (1 mM/0,1 µl) ou salina no NTSr. Quinze minutos após as injeções no NTSr, buretas graduadas de água e NaCl 0,3 M foram oferecidas aos animais, e foi medida a ingestão de água e de sódio durante 2 horas.

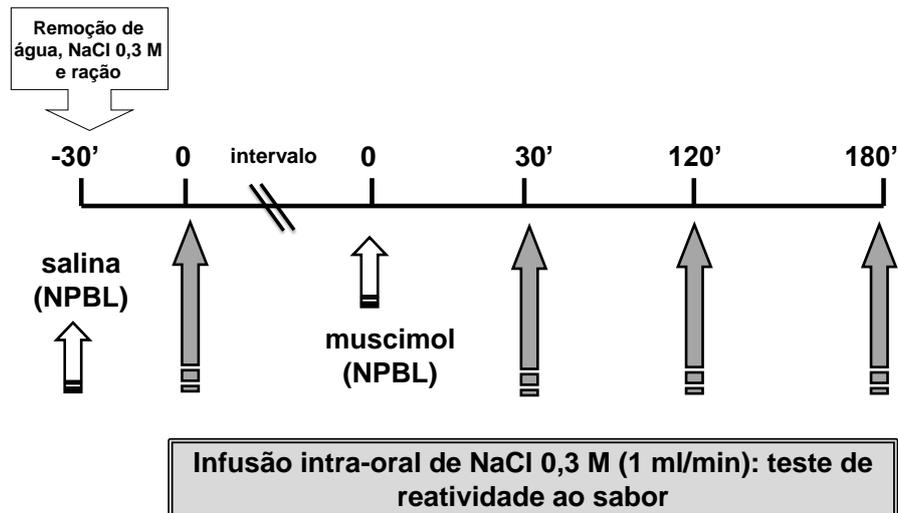


Fonte: Da autora

### 3.9.2 Efeitos da administração bilateral de muscimol no NPBL sobre o teste de reação ao sabor ao NaCl 0,3 M

No momento do experimento os ratos estavam saciados e normohidratados. Água, NaCl 0,3 M e ração foram removidos das gaiolas dos ratos. Cada rato recebeu injeções bilaterais de salina no NPBL e, após 15 minutos, foi submetido ao teste de reação ao sabor a infusão intraoral de NaCl 0,3 M. Em seguida, o rato retornou para sua gaiola-moradia. Posteriormente, os mesmos animais receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL e foram submetidos novamente ao teste de reação ao sabor a infusão intraoral de NaCl 0,3 M aos 30, 120 e 180 minutos após as injeções de muscimol no NPBL. Durante esses intervalos, os animais retornaram e permaneceram nas gaiolas moradias, com livre acesso a água e NaCl 0,3 M.

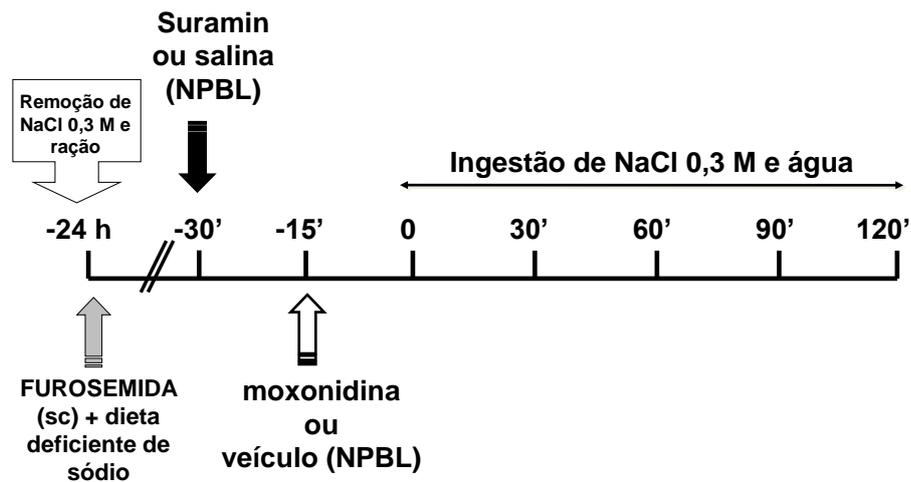
No momento de cada teste de reação ao sabor, a cânula intraoral foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50) para a infusão da solução diretamente na cavidade oral do rato. O rato foi então colocado na gaiola-teste e em seguida realizou-se a infusão da solução de NaCl 0,3 M na cavidade oral do rato (1 ml/min). O comportamento do rato foi filmado com o auxílio de um espelho montado abaixo do fundo transparente da gaiola para posterior análise.



Fonte : Da autora

### 3.9.3 Efeito da prévia administração de antagonista purinérgico P2 (suramin) no NPBL sobre os efeitos da administração de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ /imidazólicos) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M

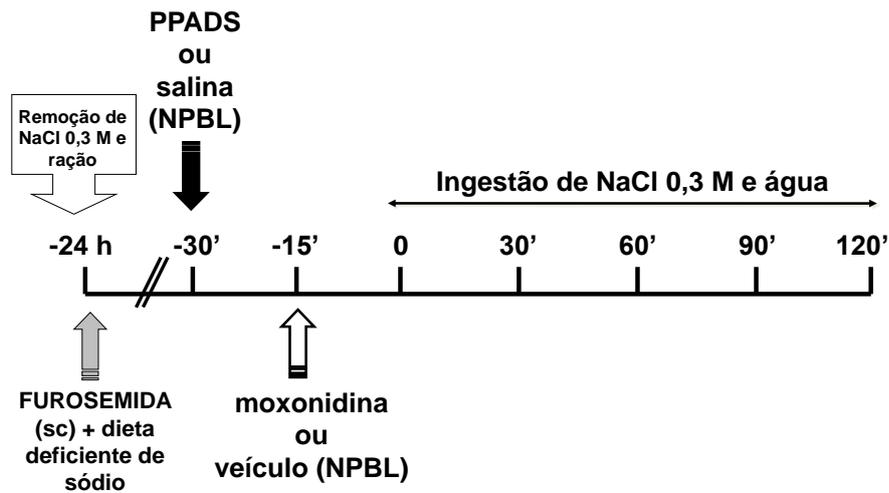
Os animais com cânulas bilaterais implantadas no NPBL submetidos à depleção de sódio receberam injeções bilaterais de suramin (2 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina no NPBL. Quinze minutos depois foram realizadas injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 $\mu$ l) ou veículo no NPBL. Os frascos de água e de NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais 15 minutos após as últimas injeções no NPBL e o volume ingerido foi registrado por 2 horas.



Fonte : Da autora

3.9.4. Efeitos da prévia administração de PPADS (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2X) no NPBL sobre os efeitos da administração de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ /imidazólicos) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M

Os animais com cânulas bilaterais implantadas no NPBL submetidos à depleção de sódio receberam injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina no NPBL. Quinze minutos depois foram realizadas injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 $\mu$ l) ou veículo no NPBL. Os frascos de água e de NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais 15 minutos após as últimas injeções no NPBL e o volume ingerido foi registrado por 2 horas.



Fonte: Da autora

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média estão representados em gráficos. A análise de variância (um ou dois fatores) e o pós-teste de Student Newman Keuls (ou teste de Fischer) foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos. A análise estatística foi realizada utilizando o Software SigmaStat 4, e as diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 LOCALIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS CÂNULAS NO NPBL e NTSr

A Figura 4A e 4B mostram injeções bilaterais típicas no NPBL e NTSr respectivamente. Os pontos de injeção foram localizados principalmente nas porções centro-lateral e dorso-lateral do NPBL. Os pontos de injeção do presente estudo são similares àqueles em que estudos anteriores mostraram os efeitos de moxonidina sobre a ingestão de água e sódio (ANDRADE et al., 2004, 2006, 2007). Injeções que atingiram as porções ventro-lateral e lateral externa, assim como o núcleo Kölliker-Fuse, foram observadas apenas em alguns ratos, e os resultados desses animais foram incluídos na análise.

A região do NTSr pode ser observada desde os cortes histológicos do bulbo onde também se observa o núcleo facial até os cortes histológicos onde se observa o núcleo ambíguo. Toda essa extensão rostro-caudal de cerca de 1 mm foi considerada para a análise dos pontos de injeções que atingiram o NTSr. Foi injetado, no NPBL, 0,2  $\mu$ l e, no NTSr, 0,1  $\mu$ l de cada lado.

A)



B)

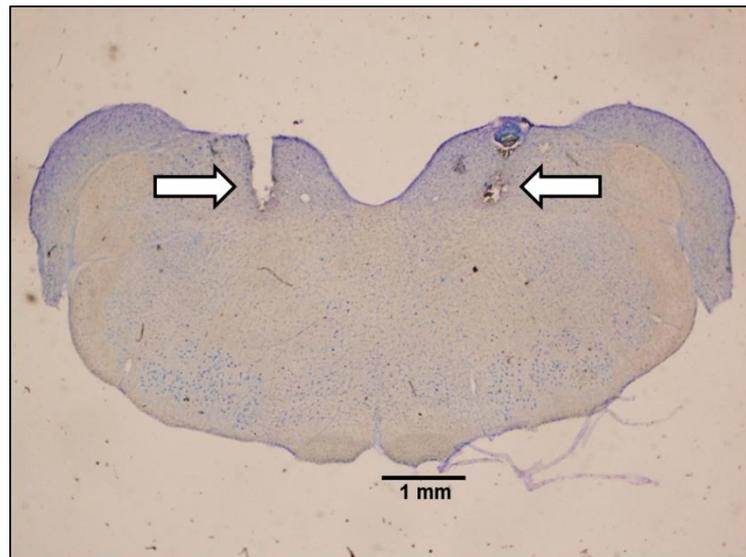


FIGURA 4: Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico, mostrando os sítios de injeções bilaterais no (A) NPBL e no (B) NTSr.

Fonte: Da autora.

#### 4.2 EFEITOS DE INJEÇÕES BILATERAIS DE MUSCIMOL (120 pmol/0,1 µl), CLORETO DE COBALTO (1 mM/0,1 µl) OU SALINA NA REGIÃO DO NTSr SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO

Os animais tratados com cloreto de cobalto no NTSr apresentaram um discreto aumento na ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M, enquanto a administração de muscimol não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M. A ANOVA indicou uma diferença significativa entre os tratamentos [ $F(2,90) = 5,8; p < 0,05$ ] e o pós-teste de Fisher LSD apontou diferença na ingestão de NaCl 0,3 M após o tratamento com salina e cloreto de cobalto aos 60 min de experimento (figura 5A). Em relação à ingestão de água, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos [ $F(2,90) = 0,7; p > 0,05$ ] (figura 5B).

A tabela 1 mostra os valores ingeridos de NaCl 0,3 M e de água em ratos que receberam injeções negativas ou unilaterais no NTSr. Não houve diferença entre os tratamentos na ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M [ $F(8,420) = 0,2; p > 0,05$ ] e [ $F(8,100) = 0,14; p > 0,05$ ], nem de água, [ $F(8,420) = 0,42; p > 0,05$ ] e [ $F(8,100) = 0,47; p > 0,05$ ], respectivamente, do grupo com injeções negativas e unilaterais.

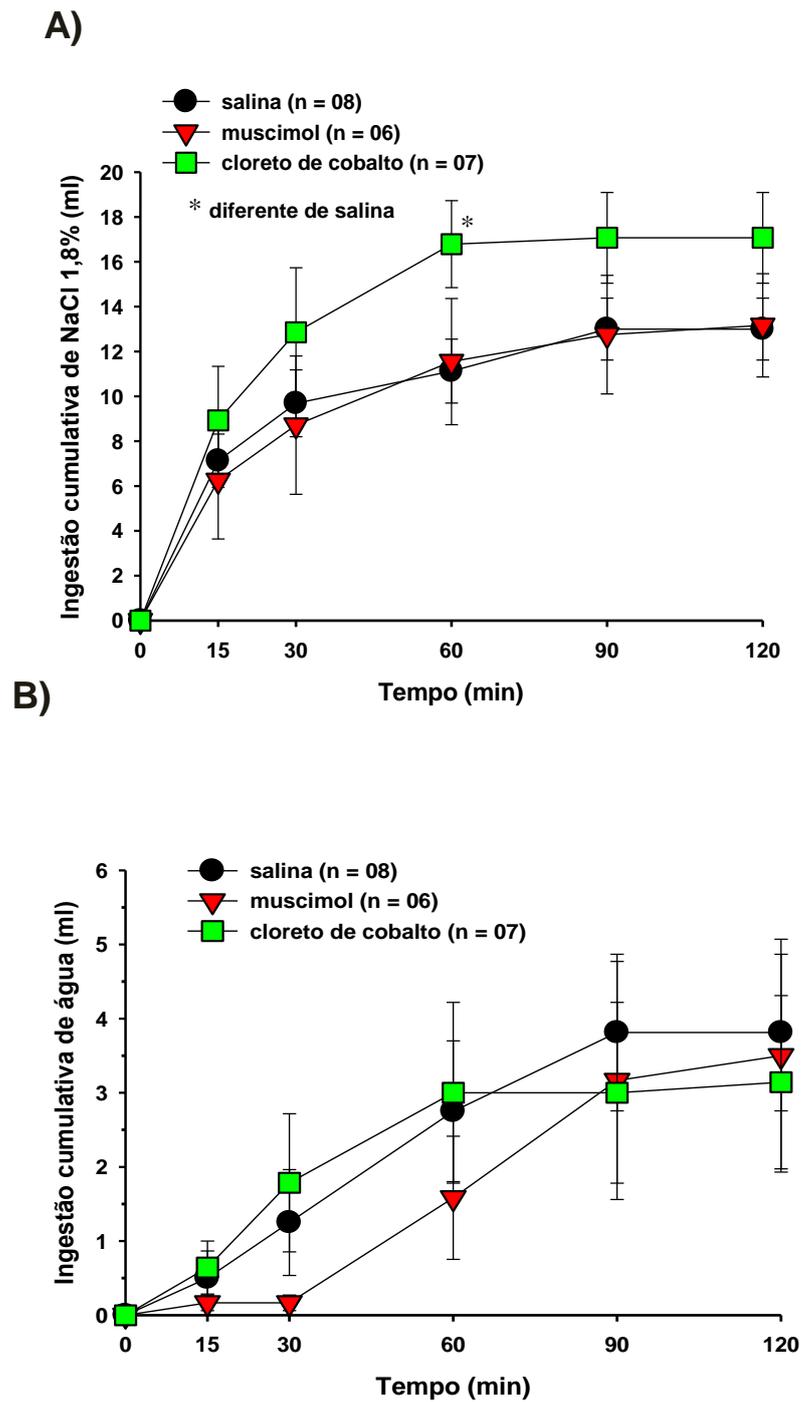


Figura 5: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (ml) e B) ingestão cumulativa de água (ml) em ratos submetidos a depleção de sódio que receberam injeções bilaterais de muscimol (120  $\mu\text{mol}/0,1 \mu\text{l}$ ), cloreto de cobalto (1 mM/0,1  $\mu\text{l}$ ) ou salina na região NTSr. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM n = número de animais.

Fonte: Da autora

TABELA 1: INGESTÃO CUMULATIVA DE ÁGUA E NaCl 0,3 M INDUZIDA POR DEPLEÇÃO DE SÓDIO EM RATOS QUE RECEBERAM INJEÇÕES UNILATERAIS OU EM REGIÕES FORA DO NTSr (INJEÇÕES NEGATIVAS) DE MUSCIMOL, CLORETO DE COBALTO OU SALINA

tratamento NTS	n	30 min	60 min	90 min	120 min
<i>Consumo de NaCl 1,8 % (ml)</i>					
salina (negativo)	32	10,0 ± 0,9	12,0 ± 0,9	12,7 ± 0,9	13,0 ± 0,9
CoCl <sub>2</sub> (negativo)	29	10,1 ± 1,3	11,1 ± 1,3	11,9 ± 1,2	12,0 ± 1,2
muscimol (negativo)	29	8,4 ± 1,3	10,7 ± 1,3	12,2 ± 1,4	12,4 ± 1,4
salina (unilateral)	8	9,0 ± 1,1	11,2 ± 1,0	11,3 ± 1,0	11,6 ± 0,9
CoCl <sub>2</sub> (unilateral)	8	9,8 ± 2,0	10,7 ± 2,2	11 ± 2,0	11,3 ± 2,0
muscimol (unilateral)	7	4,4 ± 2,0	6,6 ± 1,8	8,3 ± 2,2	9,0 ± 2,1
<i>Consumo de água (ml)</i>					
salina (negativo)	32	1,0 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,2 ± 0,5	2,5 ± 0,8
CoCl <sub>2</sub> (negativo)	29	1,3 ± 0,5	2,4 ± 0,6	3,6 ± 0,7	3,7 ± 0,7
muscimol (negativo)	27	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,8 ± 0,4	2,2 ± 0,5
salina (unilateral)	8	1,9 ± 0,4	3,7 ± 0,9	3,8 ± 0,9	3,8 ± 0,9
CoCl <sub>2</sub> (unilateral)	8	1 ± 0,2	1,7 ± 0,5	3,0 ± 0,8	3,0 ± 0,8
muscimol (unilateral)	7	1,1 ± 0,8	2,9 ± 1,2	3,9 ± 1,3	4,5 ± 1,3

Valores expressos como média ± EPM.

Fonte: Da autora

#### 4.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE MUSCIMOL NO NPBL SOBRE O TESTE DE REAÇÃO AO SABOR AO NaCl 0,3 M

Em animais saciados e normovolêmicos, a administração bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL não modificou o número de respostas hedônicas [F(3,12)=1,0; p>0,05] e de respostas aversivas [F(3,12)=0,13; p>0,05] ao NaCl 0,3 M em comparação com a administração de salina (figura 6).

Durante o teste de reação ao sabor, a ingestão de NaCl 0,3 M e de água foi avaliada até os 180 min, e os valores registrados foram 13,2 ± 5,7 ml e 4,5 ± 0,9 ml, respectivamente.

Também não foram verificadas diferenças entre os tratamentos no número de respostas hedônicas [ $F(3,28) = 0,32$ ;  $p > 0,05$ ] e aversivas [ $F(3,28) = 1,1$ ;  $p > 0,05$ ] nos animais que receberam injeções de salina ou muscimol fora do NPBL ( $n = 8$ ).

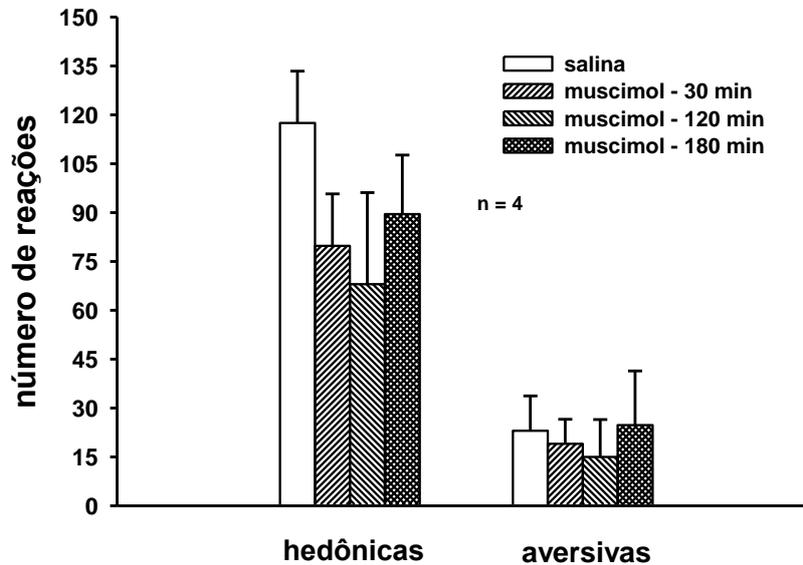


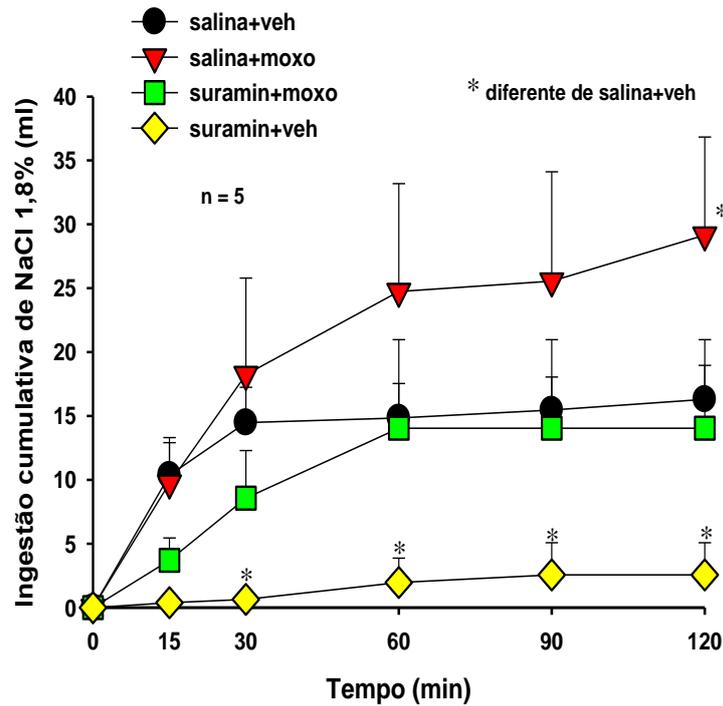
Figura 6 - Número de reações hedônicas e aversivas após injeção de salina ou 30, 120 e 180 min após a administração de muscimol (0,5 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL em ratos saciados. Valores cumulativos expressos como média  $\pm$  EPM.  $n$  = número de animais.

Fonte : Da autora

#### 4.4 EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE INJEÇÕES BILATERAIS DE SURAMIN (2 nmol/0,2 $\mu$ l) E MOXONIDINA (0,5 nmol/0,2 $\mu$ l) NO NPBL SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO

De acordo com a figura 7A e 7B, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M [ $F(3,12) = 5,0$ ;  $p < 0,05$ ] e de água [ $F(3,12) = 8,2$ ;  $p < 0,05$ ], respectivamente, em ratos submetidos à depleção de sódio. A prévia injeção bilateral de suramin (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL reduziu os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e de água. Porém, apenas a injeção de suramin no NPBL reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M e de água em ratos depletados de sódio.

A)



B)

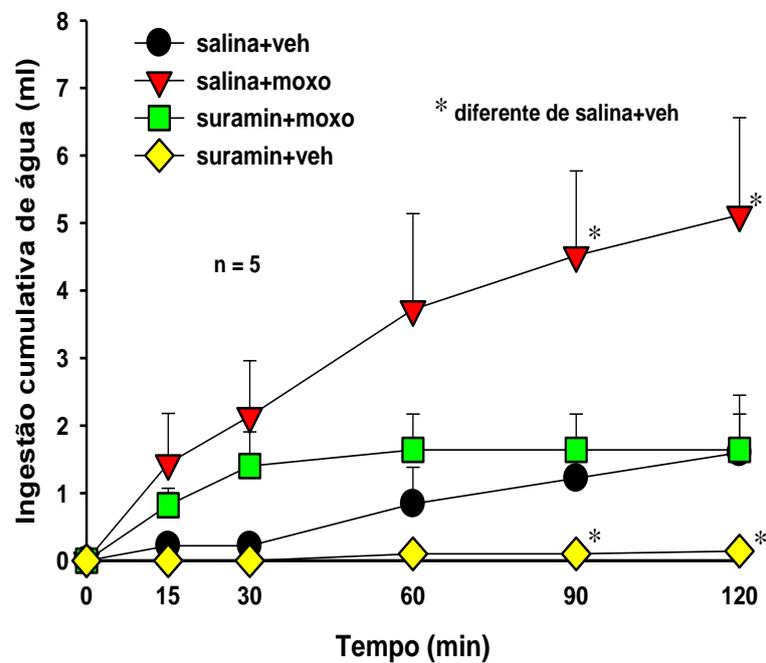


Figura 7 - A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (ml) e B) ingestão cumulativa de água (ml) em ratos submeidos a depleção de sódio que receberam injeções bilaterais de suramin (2 nmol/0,2 ml) ou salina + moxonidina (0,5 nmol/0,2 ml) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais.

Fonte: Da autora

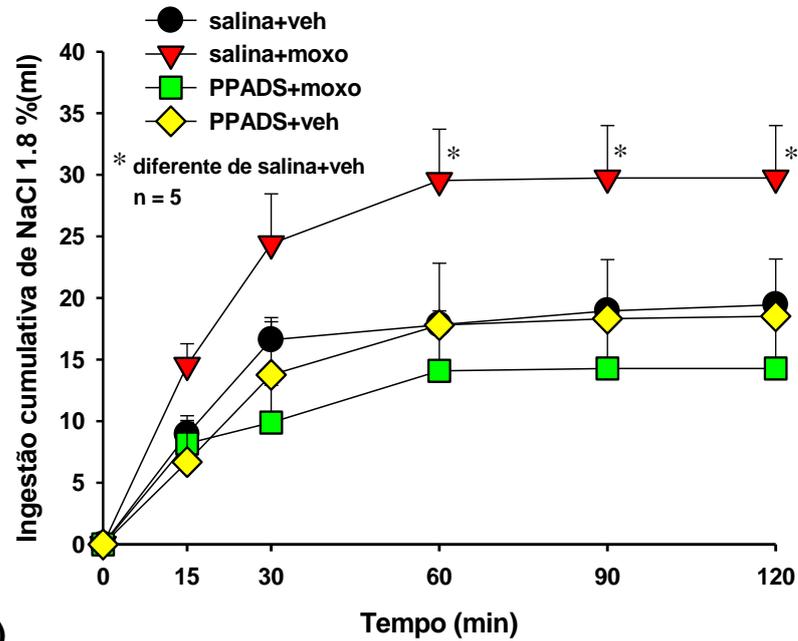
#### 4.5 EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE INJEÇÕES BILATERAIS DE ANTAGONISTA PURINÉRGICO P2X, PPADS (4 nmol/0,2 µl) E MOXONIDINA (0,5 nmol/0,2 µl) NO NPBL SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO

De acordo com a figura 8A, a administração bilateral de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio, [F(3,12)=13,6; p<0,05]. A prévia administração de antagonista purinérgico P2X (PPADS) (4 nmol/0,2 µl) no NPBL aboliu os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de sódio, enquanto que apenas a administração de PPADS no NPBL não alterou a ingestão de sódio.

A figura 8B mostra que nesse grupo de animais os tratamentos realizados no NPBL não alteraram a ingestão de água induzida por depleção de sódio, [F(3,12)=3,0; p>0,05].

Em ratos que receberam injeções bilaterais de PPADS e moxonidina em regiões fora do NPBL (injeções negativas), não houve diferença entre os tratamentos na ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M [F(12,445) = 0,08; p>0,05], e de água, [F(12,445) = 0,26; p>0,05] (tabela 2).

A)



B)

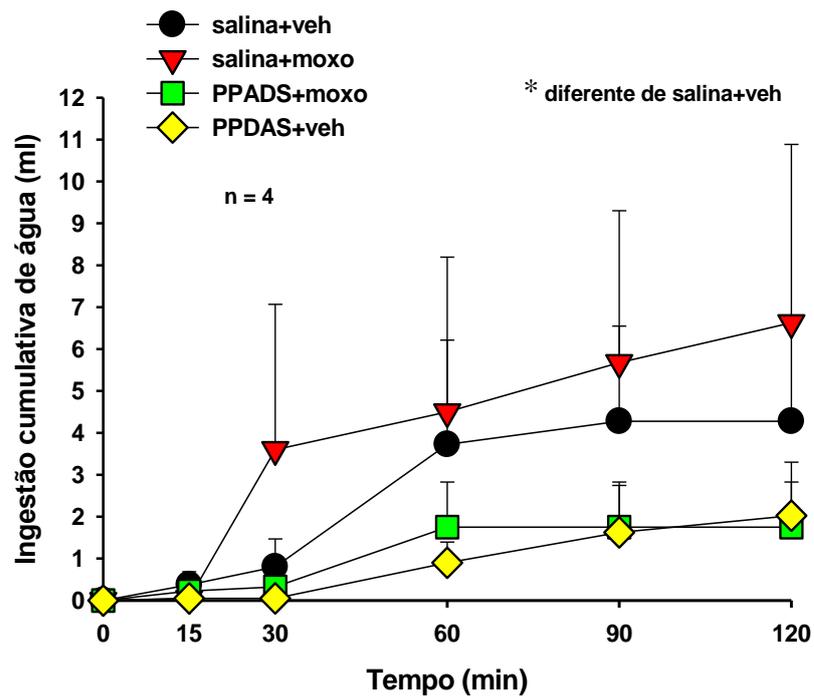


Figura 8 - A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (ml) e B) ingestão cumulativa de água (ml) em ratos submetidos a depleção de sódio que receberam injeções bilaterais de PPADS (4 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina + moxonidina (0,5 nmol/0,2  $\mu$ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais.

Fonte: Da autora

TABELA 2: INGESTÃO CUMULATIVA DE ÁGUA E NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO QUE RECEBERAM INJEÇÕES DE ANTAGONISTA PURINÉRGICO P2 E MOXONIDINA EM REGIÕES FORA DO NPBL (INJEÇÕES NEGATIVAS)

Tratamento NPBL	<i>n</i>	30 min	60 min	90 min	120 min
<b>Consumo de NaCl 1,8 % (ml)</b>					
salina /salina (negativo)	24	12,7 ± 1,4	14,8 ± 1,7	15,0 ± 1,6	15,3 ± 1,6
PPADS e moxonidina (negativo)	24	13,8 ± 1,5	16,0 ± 1,6	17,0 ± 1,4	17,4 ± 1,3
salina e moxonidina (negativo)	23	16,4 ± 1,5	18,8 ± 1,5	19,5 ± 1,5	19,6 ± 1,4
PPADS e veículo (negativo)	22	12,2 ± 1,6	14,2 ± 1,8	15,9 ± 1,4	16,0 ± 1,4
<b>Consumo de água (ml)</b>					
salina /salina (negativo)	24	1,05 ± 0,31	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,5
PPADS e moxonidina (negativo)	24	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,5	2,2 ± 0,5
salina e moxonidina (negativo)	23	1,1 ± 0,3	2,4 ± 0,7	2,7 ± 0,7	3,0 ± 0,7
PPADS e veículo (negativo)	22	0,4 ± 0,2	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,5 ± 0,5

Valores expressos como média ± EPM.

Fonte : Da autora

## 5. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que, em animais submetidos à depleção de sódio, a administração bilateral de cloreto de cobalto (1 mM) no NTSr promoveu um discreto aumento da ingestão de sódio, enquanto que não houve alteração desse parâmetro após as injeções de muscimol (0,5 nmol). Em relação ao NPBL, o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e de água em ratos com depleção de sódio tratados com moxonidina no NPBL foi reduzido pela prévia injeção bilateral de suramin nesta mesma área. Porém, apenas a injeção de suramin no NPBL quase aboliu a ingestão de NaCl 0,3 M e aboliu a ingestão de água em ratos depletados de sódio. O aumento da ingestão de NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio após injeções de moxonidina no NPBL também foi reduzido pela prévia injeção bilateral de PPADS nesta mesma área, sendo que apenas a injeção desse antagonista não alterou a ingestão de sódio induzida por depleção. Em relação ao teste de reação de sabor ao NaCl hipertônico, em animais saciados que tiveram injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol) no NPBL não foram observadas alterações no número de respostas hedônicas ou aversivas a infusão intraoral de NaCl 0,3 M.

### 5.1 PAPEL DO NTSr SOBRE A INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,3 M EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO

O papel da região caudal do NTS sobre o comportamento ingestivo de água e de sódio em animais já foi avaliado em diferentes modelos experimentais. Lesões eletrolíticas agudas e crônicas restritas ao cNTS promoveu um aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e de água induzida por depleção de sódio 24 horas, (OGIHARA et al., 2009). Além disso, recentemente foi publicado um estudo demonstrando que ratos com lesão eletrolítica crônica do cNTS apresentam um aumento da ingestão de água induzida pelo aumento de osmolaridade plasmática quando comparado aos animais com lesão fictícia (BLANCH et al., 2013). Em conjunto, esses trabalhos sugerem um papel inibitório do NTS caudal sobre o comportamento ingestivo.

Sobre o NTSr, já foi verificado que lesões eletrolíticas realizadas no NTSr interromperam o aumento da palatabilidade ao sódio e bloquearam a expressão comportamental do apetite ao sódio normalmente observada em animais intactos após a depleção de sódio (FLYNN et al., 1991). Esse estudo mostrou que o NTSr, a primeira estação sináptica das aferências gustatórias do sabor ao sódio em ratos, é importante para a palatabilidade ao sódio em situações de deficiência de sódio, apesar da limitação de que essas amplas lesões eletrolíticas destroem tanto corpos celulares como fibras de passagem (FLYNN et al., 1991).

Bradley et al. (1996) utilizaram preparações de cortes encefálicos *in vitro* para estudar as propriedades farmacológicas dos neurônios do NTSr. Foi verificado que os neurônios do NTSr respondem tanto à estimulação glutamatérgica quanto à estimulação com o aminoácido inibitório GABA. Por meio do uso de antagonistas, esse estudo verificou que o NTSr apresenta receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, além de receptores GABAérgicos do tipo A e B, (BRADLEY et al., 1996).

Smith e Li (1998), utilizando a técnica de registro extracelular unitário, estudaram os efeitos da ativação e do bloqueio de receptores GABA<sub>A</sub> sobre neurônios do NTS responsivos à estimulação elétrica ou estimulação química (sacarose, ácido cítrico, quinina e NaCl) aplicada na parte anterior da língua de hamsters. Injeção de GABA no NTSr produziu uma inibição dose-dependente da atividade de cerca de 63% dos neurônios responsivos ao sabor aplicado diretamente na superfície da língua. Também foi verificado um aumento da atividade de aproximadamente 61% desses neurônios responsivos ao sabor após a injeção de bicuculina (antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>), sugerindo que esses neurônios do NTS responsivos ao sabor estariam sob tônica inibição GABAérgica. Esses autores demonstraram que mecanismos GABAérgicos medeiam transmissão sináptica inibitória sobre neurônios do NTS responsivos ao sabor (SMITH; LI, 1998).

Apesar de vários estudos *in vivo* e *in vitro* mostrarem a participação dessa área no processamento das informações sensoriais (para revisão, vide BRADLEY, 2007), os efeitos do bloqueio reversível exclusivamente dos neurônios NTSr na modulação do comportamento ingestivo ao sódio em ratos depletados de sódio até então permaneciam desconhecidos.

Em nosso estudo, foi utilizado o muscimol (um agonista de receptores GABA<sub>A</sub>) e também o cloreto de cobalto como ferramentas de estudo em substituição as lesões eletrolíticas na região do NTSr. Foi utilizada a dose de 120  $\mu$ mol de muscimol com base em estudos prévios de Moreira et al. (2005) e Takakura et al. (2007). O cloreto de cobalto reduz o influxo pré-sináptico de cálcio, causando uma inibição reversível da liberação de neurotransmissores com um consequente bloqueio sináptico, sem alterar as fibras de passagem (KRETZ, 1984). A concentração de cloreto de cobalto utilizada no presente estudo (1 mM) foi baseada em estudos de Crestani et al. (2010) e Granjeiro et al. (2012).

Os presentes resultados mostraram um pequeno aumento da ingestão cumulativa de sódio induzida por depleção de sódio após o tratamento com cloreto de cobalto no NTSr. Em outras palavras, a inativação reversível da transmissão sináptica do NTSr (que não afeta as fibras de passagem) durante a depleção de sódio produziu um discreto aumento da ingestão cumulativa de sódio em relação ao tratamento controle apenas aos 60 min de experimento. Considerando que os neurônios do NTSr estariam sob tônica inibição GABAérgica, o bloqueio da transmissão sináptica pelo cloreto de cobalto estaria reduzindo esse tônus inibitório, facilitando assim a ingestão de sódio induzida por depleção.

Por outro lado, a ativação de receptores GABA<sub>A</sub> por meio das injeções de muscimol (120  $\mu$ mol) no NTSr não alterou a ingestão de sódio induzida por depleção. Tal fato indica que a ativação GABAérgica adicional com injeção de muscimol no NTS não altera o comportamento de ingestão em ratos depletados de sódio, sugerindo que os neurônios do NTSr estariam sob tônica inibição GABAérgica. Diferentemente dos demais estudos eletrofisiológicos que avaliaram a atividade neuronal *in vivo* em ratos anestesiados sem nenhum tratamento prévio, nosso estudo foi realizado sob a condição de depleção de sódio. É possível que a neurotransmissão no NTSr durante uma depleção de sódio seja modificada em relação a uma situação basal. Assim sendo, mais estudos serão necessários para se esclarecer o papel do NTSr na modulação do apetite e palatabilidade ao sódio em animais conscientes e submetidos à depleção de sódio.

## 5.2 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES GABAÉRGICOS NO NPBL E A PALATABILIDADE AO NaCl 0,3 M

Estudos *in vitro* indicaram que receptor GABA<sub>A</sub> seria um neurotransmissor inibitório em neurônios gustatórios do NPB (KOBASCHI; BRADLEY, 1998), e que o NTSr envia projeções orais e sensoriais ascendentes para o núcleo parabraquial (NPB) (MCPHEETERS, et al., 1990; CHO et al., 2002; MONROE; Di LORENZO, 1995; BRADLEY, 2007).

A ativação de receptores GABA<sub>A</sub> no NPBL com injeções bilaterais de muscimol induz uma potente ingestão de NaCl hipertônico em animais saciados e normoidratados (DE OLIVEIRA et al., 2007). Muscimol no NPBL também aumenta a ingestão de sódio induzida pelo tratamento FURO + CAP sc e por depleção de sódio por 24 h (CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2007). O pré-tratamento com bicuculina (antagonista receptor GABA<sub>A</sub>) aboliu os efeitos do muscimol (CALLERA et al., 2005), confirmando a participação dos receptores GABA<sub>A</sub> no controle da ingestão de sódio.

A ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  além de aumentar da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pela administração de moxonidina no NPBL (ANDRADE et al., 2004), também promove mudanças no padrão de respostas comportamentais observadas no teste de reação ao sabor de NaCl 0,3 M (ANDRADE et al., 2011). Os resultados deste estudo mostram que ambos os grupos de animais tratados com injeções de moxonidina ou veículo no NPBL apresentaram aumento das respostas hedônicas e diminuição das respostas aversivas após o tratamento com FURO + CAP sc antes do acesso ao sódio e a água. Quando comparado com as injeções de veículo no NPBL, o tratamento com moxonidina nessa área não alterou o número de respostas hedônicas, tampouco o número de respostas aversivas ao NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio antes do acesso ao NaCl 0,3 M e água. Contudo, em comparação com os animais tratados com veículo, os animais tratados com moxonidina no NPBL continuaram a exibir um número aumentado de reações hedônicas e um número reduzido de respostas aversivas após o consumo de grande volume de NaCl 0,3 M e água. Em outras palavras, o tratamento com moxonidina no NPBL parece bloquear o declínio relacionado à saciedade das respostas hedônicas

e/ou aumentar as respostas aversivas que normalmente ocorrem durante e após o consumo de NaCl 0,3 M e água, (ANDRADE et al., 2011). Esses resultados com injeções de moxonidina no NPBL, alterando o padrão de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M sugerem que a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no NPBL reduz os sinais inibitórios ativados em consequência da ingestão de NaCl hipertônico e água (ANDRADE et al., 2011).

Em relação ao teste de reação de sabor ao NaCl hipertônico após as injeções de muscimol nos animais saciados que tiveram injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol) no NPBL não foram observadas alterações no número de respostas hedônicas ou aversivas após a infusão intraoral de NaCl 0,3 M. Apesar de que a ativação gabaérgica no NPBL induz potente ingestão NaCl 0,3 M (CALLERA et al., 2005), não foram observadas alterações no teste ao sabor ao NaCl 0,3 M. Esses resultados sugerem que o bloqueio de receptores GABAérgicos do NPBL, que leva a um bloqueio dos mecanismos inibitórios da ingestão de sódio, não é capaz de alterar as respostas comportamentais oro-faciais de percepção ao sabor ao sódio hipertônico. Assim sendo, o mecanismo pelo qual o muscimol no NPBL produz uma indução da ingestão de sódio em animais saciados não seria por modular a palatabilidade ao sódio hipertônico. Como o NPBL recebe vários tipos de sinais aferentes provenientes de diversas regiões do NTS e da AP, ainda não se sabe qual seria então a informação aferente que estaria sendo modulada pela ativação de receptores GABAérgicos do NPBL para produzir uma resposta tardia de aumento da ingestão de sódio. Estudos investigando os efeitos dos demais mediadores do NPBL envolvidos no controle do comportamento ingestivo (por exemplo, CCK e 5-HT) sobre o teste de percepção ao sabor ajudarão a esclarecer se a ingestão de sódio hipertônico que ocorre após o bloqueio dos mecanismos do NPBL se deve a uma alteração da percepção ao sabor salgado, o que sugeriria um papel do núcleo parabraquial na integração das aferências gustatórias.

### 5.3 INTERAÇÃO ENTRE O MECANISMO PURINÉRGICO E ADRENÉRGICO $\alpha_2$ NO NPBL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl EM RATOS DEPLETADOS DE SÓDIO

Os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  são encontrados no sistema nervoso central e periférico e têm localização tanto pré quanto pós-sináptica, (FRENCH, 1995). No SNC, esses receptores têm importante papel na regulação da liberação de neurotransmissores através de autorreceptores localizados em terminais nervosos noradrenérgicos e de heteroreceptores localizados em outros tipos de neurônios, como a serotonina. Os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  estão acoplados à proteína G, e suas funções são mediadas pelas proteínas Gi/Go. Todos os subtipos estão negativamente acoplados a adenilato ciclase, e o efeito inibitório é mediado pela inibição da produção de AMP cíclico (BYLUND, 1995).

Já o conceito da neurotransmissão purinérgica, em que o ATP e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock em 1972. O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; FREDHOLM, 1995; BURNSTOCK, 1997; KENNEDY, 2000; FAGURA et al., 2000). Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock (1978) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação, os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A1, A2a, A2b e A3, estando todos acoplados à proteína G e dependentes de adenilciclase. Além disso, eles são antagonizados por metilxantinas e seus derivados. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em dois tipos: P2X e P2Y. Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos em sete tipos: (P2X1 a P2X7) e são dependentes de canais iônicos (ionotrópicos). Os P2Y são subdivididos em 5 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) e são acoplados a proteína G e operam via inositol trifosfato (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia-vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por ectonucleotidases, sendo a adenosina o seu principal metabólito. Os receptores purinérgicos P2X são ativados por análogos ou agonistas mais estáveis do que o ATP como o alfa-beta-metileno- adenosina 5'-trifosfato ( $\alpha,\beta$ -metil ATP) e o alfa-gama-metileno-ATP, enquanto os receptores P2Y tem como agonista o 2-metilthio-ATP (2meS-ATP), (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Em relação do núcleo parabraquial lateral (NPBL), sabe-se que a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  com injeções bilaterais de moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  e imidazólicos) ou noradrenalina produz um potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzido pelo tratamento subcutâneo do diurético furosemida (FURO) combinado com baixa dose do inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (CAP) (ANDRADE et al., 2004; GASPARINI et al., 2009; ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010). O potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pela administração de moxonidina no NPBL (mais do que dez vezes a quantia ingerida pelos controles tratados com FURO + CAP sc e veículo no NPBL) foi completamente abolido pelo RX 821002, um antagonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , indicando que a moxonidina produz um potente, seletivo e específico aumento da ingestão de NaCl hipertônico pela ação em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , (ANDRADE et al., 2004). Em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  do NPBL podem reduzir os efeitos dos mecanismos inibitórios que limitam a ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2004; GASPARINI et al., 2009; ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010). Como já demonstrado anteriormente, os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no NPBL sobre a ingestão de sódio não são devido a uma facilitação não específica de todos os comportamentos ingestivos, uma vez que a ingestão de solução de sacarose ou a ingestão de alimento não são alteradas pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL (ANDRADE et al., 2004, 2007).

Mais recentemente, também foi demonstrada a participação de mecanismos purinérgicos do NPBL no controle da ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (MENEZES et al., 2011). As injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -MeATP ( $\alpha,\beta$ -metilenoadenosina 5'-trifosfato), agonista seletivo de receptores purinérgicos P2X, aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio [tratamento com o diurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal) seguido de dieta deficiente de sódio por 24 horas]. A administração bilateral no NPBL do antagonista purinérgico P2 não seletivo, suramin, reduziu a ingestão de sódio induzida por depleção. Já o pré-tratamento no NPBL com o antagonista de receptores purinérgicos P2X, PPADS (ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfúrico) aboliu os efeitos das injeções de  $\alpha,\beta$ -MeATP sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção. Esses resultados sugerem que a ativação de receptores purinérgicos do

NPBL facilita a ingestão de sódio, provavelmente por restringir os mecanismos do NPBL que inibem a ingestão de sódio (MENEZES et al., 2011).

Para se estudar se há uma interação entre os receptores purinérgicos e adrenérgicos  $\alpha_2$  no NPBL no controle da ingestão água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio, testamos se o prévio bloqueio dos receptores purinérgicos poderia alterar os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ . Para tanto, foram utilizados dois antagonistas: suramin e PPADS. Já foi demonstrado que suramin atua em diferentes subtipos de receptores P2 (P2X2, P2X5, P2Y2, P2Y4 e P2Y11), enquanto que PPADS se liga especificamente em subtipos de receptores P2X (P2X3 e P2X5), (BURNTOCK et al., 2007).

Os presentes resultados mostram que o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e de água em ratos submetidos a depleção de sódio tratados com moxonidina no NPBL foi reduzido pela prévia injeção bilateral de suramin nesta mesma área. Porém, apenas a injeção de suramin no NPBL quase aboliu a ingestão de NaCl 0,3 M e aboliu a ingestão de água em ratos depletados de sódio. Por outro lado, a prévia administração de PPADS bloqueou os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio, enquanto que apenas a injeção de PPADS não diminuiu a ingestão de sódio em relação ao tratamento controle. Portanto, considerando que o bloqueio dos receptores purinérgicos, por meio da administração de suramin e PPADS, aboliu os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de sódio, verificamos que há uma interação entre os mecanismos adrenérgicos e purinérgicos no NPBL para o controle da ingestão de sódio durante a depleção de sódio.

Os presentes resultados concordam com estudos prévios que sugerem que o ATP não atua individualmente e sim interagindo com a noradrenalina (ESPALLERGUES et al., 2007; SLADEK; SONG, 2008). No estudo de Espallergues et al. foi verificado que astrócitos do núcleo supra-óptico (SON), que respondem especificamente aos neurotransmissores ATP e noradrenalina com aumentos transientes de cálcio intracelular, passam a apresentar uma resposta sinérgica após a aplicação simultânea de ambos neurotransmissores (ESPALLERGUES et al., 2007). Em revisão feita por Sladek e Song (2008) sobre os mecanismos envolvidos na liberação de vasopressina (AVP), foi verificado que a exposição simultânea ao ATP e fenilefrina (agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ) potencializou a secreção

de AVP, caracterizado pelo aumento no pico e na duração da resposta. De acordo com esse trabalho, os mecanismos intracelulares envolvidos nessa interação entre ativação adrenérgica e ativação de receptores purinérgicos P2X seriam a ativação da proteína quinase C e aumento dos níveis intracelulares de cálcio.

No nosso estudo, não foram avaliados os mecanismos intracelulares pelos quais essa interação entre os mecanismos adrenérgicos e purinérgicos ocorre. Todavia, nossos dados mostram que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2X pelo PPADS aboliu os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ /imidazólicos obtidos pela administração de moxonidina. Os efeitos da moxonidina são atribuídos a sua ação em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , uma vez que o tratamento prévio com o antagonista específico para essa classe de receptores, RX 821002, bloqueou completamente os efeitos da moxonidina. Esses dados sugerem que há uma interação entre os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  e purinérgicos P2X no NPBL para o controle da ingestão de sódio, sendo que ambos apresentam um papel facilitatório para o comportamento ingestivo.

## 6. CONCLUSÕES

Os presentes resultados sugerem que: a) o bloqueio da transmissão sináptica do NTSr pode facilitar a ingestão de sódio; b) o bloqueio de receptores GABAérgicos do NPBL parece não alterar as respostas comportamentais oro-faciais de percepção ao sabor ao sódio hipertônico; e c) há uma importante interação entre o mecanismo purinérgico e adrenérgico  $\alpha_2$  do NPBL para o controle da ingestão de sódio hipertônico.

## REFERÊNCIAS

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

ANDRADE, C. A. F. et al. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, p. 25-34, 2004.

\_\_\_\_\_. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, p. 21-28, 2006.

\_\_\_\_\_. Enhancement of meal-associated hypertonic NaCl intake by moxonidine into the lateral parabrachial nucleus. **Behavioural Brain Res**, v. 183, p. 156-160, 2007.

\_\_\_\_\_. Changes in taste reactivity to intraoral (IO) hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an  $\alpha_2$ -adrenergic receptor agonist. **Physiol. Behav**, v. 24; 104,n.5,p. 702-8, 2011.

\_\_\_\_\_. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. **Neuroscience**, v. 208, p. 69-78, 2012.

ANDRADE-FRANZÉ, G. M. et al. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 165 (3),p. 633-41, 2010a.

\_\_\_\_\_. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165,n.3, p. 633-4; 2010b.

ARMSWORTH, S. J.; GERKENS, J. F.; SMITH, A. J. Furosemide inhibition of sympathetic vasoconstriction in the rat in situ blood perfused mesentery. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, v. 13, p. 495-503, 1986.

BECKMAN, M. E.; WHITEHEAD, M. C.; Intramedullary connections of the rostral nucleus of the solitary tract in hamster. **Brain Res**, v. 557,n.2, p. 265-79, 1991.

BERNARD, J. F.; ALDEN, M.; BESSON, J. M. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J. Comp. Neurol*, v. 329, p. 201–229, 1993.

BERRIDGE, K. C. et al. Sodium depletion enhances salt palatability in rats. **Behav. Neurosci**, v. 98, p. 652-660, 1984.

BERRIDGE, K. C.; Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 173-198, 2000.

BLACKBURN, R. E. et al. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 21, p. 10380-10384, 1993.

\_\_\_\_\_. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol**, v. 269, p. R245-R251, 1995.

BLANCH, G.T. et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 304,n.7, p. R531-42, 2013.

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

BRADELY, R. M. Neurotransmitter and Neuromodulator Activity in the Gustatory Zone of the Nucleus Tractus Solitarius. **Chem. Senses**, v. 21, p. 377-385, 1996.

\_\_\_\_\_. **The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.

BRESLIN, P. A.; SPECTOR, A. C.; GRILL, H. J. Chorda tympani section decreases the cation specificity of depletion-induced sodium appetite in rats. **Am. J. Physiol**, v. 264, p. R319-R323, 1993.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24 (3), p. 509-581, 1972.

\_\_\_\_\_. Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurons, **Prog. Brain Res**, v. 68, 193-203, 1986.

\_\_\_\_\_. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology**, v. 36 (9), p. 1127-1139, 1997.

\_\_\_\_\_. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission **Physiol. Rev**, v. 187, p.659-797, 2007.

BYLUND, D. B. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 763, p. 1-7, 1995.

CALLERA, J. C. et al. GABA<sub>A</sub> receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, p. 725-735, 2005.

CHO, Y. K.; LI, C. S.; SMITH, D. V. Gustatory projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nuclei in the hamster. **Chem. Senses**, v. 27(1), p. 8-90, 2002.

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

COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am. J. Physiol**, v. 271, p. R1470-R1476, 1996.

CRESTANI, C. C. et al. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. **Behav. Brain. Funct**, p. 6-30, jun. 2010.

DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am. J. Physiol**, v. 290, p. R1136-R1141, 2005.

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

DE GOBBI, J. I. et al. Right atrial stretch alters fore- and hind-brain expression of c-fos and inhibits the rapid onset of salt appetite. **J. Physiol**, v. 1,n. 586 (Pt 15), p. 3719-29, 2008.

\_\_\_\_\_. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **J. Physiol**, v. 1,n. 586, (Pt 15), p. 3719-29, 2009.

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

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

DE OLIVEIRA, L. B. et al. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Res. Bull**, v. 73,238-247, 2007.

\_\_\_\_\_. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, 350-358, 2008.

DE PAULA, P. M.; ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Am. J. Physiol**, v. 287(5), p. R1164-71, 2004.

ECHETENKAMP, S. F.; ANDERSON, A. C. Baroreflex modulation by cardiopulmonary receptors during chronic sodium depletion. **Am. J. Physiol**, v. 254, p. H905-11, 1988.

EDWARDS, G. L.; JOHNSON, A. K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am. J. Physiol**, v. 261, p. R1039-R1044, 1991.

EPSTEIN, A. N.; STELLAR, E. The control of salt preference in the adrenalectomized rat. **J. Comp. Physiol. Psychol**, v. 48, p. 167-72, 1955.

ESPALLERGUES, J. et al. Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. **Neuroscience**, v. 148(3), p. 712-23, 2007.

FAGURA, M. S.; JARVIS, G. E.; DOUGALL, I. G.; LEFF, P. Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. **J. Auton. Nerv. System**, v. 81, p. 178-186, 2000.

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

FLUHARTY, S. J.; EPSTEIN, A. N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 5, p. 746-758, 1983.

FLYNN, F. W.; GRILL, H. J.; NORGREN, R. Central gustatory lesions: II. Effects on sodium appetite, taste aversion learning, and feeding behaviors. **Behav. Neurosci**, v. 105, p. 944-954, 1991.

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

FRANK, M.; CONTERAS, R. J.; HETTINGER, T. P. Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. **J. Neurophysiol**, v. 50, p. 941-60, 1983.

FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors in the Central Nervous System. **NIPS**, v. 10, p. 122- 128, 1995.

FRENCH, N.  $\alpha_2$ -adrenoceptors and  $I_2$  sites in the mammalian central nervous system. **Pharmacol. Ther.**, v. 68, p. 175-208, 1995.

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

GALAVARNA, O. et al. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull**, v. 28, n. 1, p. 89-98, 1991.

GASPARINI, S. et al. Adrenergic mechanisms of the Kölliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 1; 164 (2), p. 370-9, 2009.

GERKENS, J. F.; ARMWORTH, S. J.; SMITH, A. J. Inhibition of sympathetic constriction of the ex vivo tail artery perfused with blood from rats given furosemide. **Clin. Exp. Hypertens. A**, v. 9, p. 51-79, 1987.

GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Aldosterone in the brain. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol**, v. 297, p. F559–F576, 2009.

GRANJEIRO, E. M. et al. Bed nucleus of the stria terminalis and the cardiovascular responses to chemoreflex activation. **Auton. Neurosci**, v. 167,n.2, p. 21-6, 2012.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Res**, v. 143, p. 263-279, 1978.

GRILL, H. J.; BERRIDGE, K. Taste reactivity as a measure of the neural control of palatability. In: SPRAGUE, J. M.; EPSTEIN, A. N. (ed.) Progress in Psychobiology and Psychology, Orlando: **Academic Press**; p. 1-61, 1985.

GRILL, H. J.; BERNSTEIN, I., L. Strain differences in taste reactivity to NaCl. **Am. J. Physiol**, v. 255, p. R424-R430, 1988.

HABER, E. The role of renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. **Circulation**, v. 54, p. 849-96, 1976.

HAMILTON, R. B.; NORGREN, R. Central projections of gustatory nerves in the rat. **J. Comp. Neurol**, v. 222, p. 560-577, 1984.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Salt intake, plasma sodium, and worldwide salt reduction. **Ann. Med**, v. 44 Suppl. 1, p. S127-37, 2012.

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

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

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

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, p. 292-353, 1997.

KENNEDY, C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. **J. Auton. Nerv. System**, v. 81, p. 158-163, 2000.

KIMURA, E. H. et al. Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA(A) receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus. **Brain Res**, v. 1190, p. 86-93, 2008.

KOBASHI, M. et al. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci. Lett.**, v. 158, p. 47-50, 1993.

KOBASHI, M.; BRADLEY, R. M. Effects of GABA on neurons of the gustatory and visceral zones of the parabrachial nucleus in rats. **Brain Res**, v. 799, p. 323-328, 1998.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **J. Neurosci. Methods**, v. 11 (2), p. 129-35, 1984.

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

LANÇA, A. J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, p. 1117-1126, 1985.

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

LOEWY, A. D. Central autonomic pathways. In: LOEWY, A. D.; SPYER, K. M. (Ed.). **Central regulation of autonomic functions**. Oxford: Oxford University Press, p. 88-103, 1990.

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

\_\_\_\_\_. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, v. 28, p. 990-992, 2001.

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

MCPHEETER, S.M. et al. Taste-responsive neurons and their locations in the solitary nucleus of the the hamster. **Neuroscience**, v. 34,n.3, p. 745-58,1990.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am. J. Physiol**, v. 269, p. R1044-R1049, 1995.

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

MENANI, J. V. et al. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res**, v. 801, p. 29-35, 1998a.

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

\_\_\_\_\_. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am. J. Physiol**, v. 279, p. R126-R131, 2000.

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

MONROE, S.; DI LORENZO, P. M. Taste responses in neurons in the nucleus of the solitary tract that do and do not project to the parabrachial pons. **J. Neurophysiol**, v. 74, p. 249-257, 1995.

MOREIRA, T. S. et al. Role of pressor mechanisms from the NTS and CVLM in control of arterial pressure. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 289, p. R1416 –R1425, 2005.

NORGREN, R. Gustatory afferents to ventral forebrain. **Brain Res**, v. 81, p. 285-295, 1974.

\_\_\_\_\_. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. **J. Comp. Neurol**, v. 166, p. 17-30, 1976.

\_\_\_\_\_. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. In: KATSUKI Y; NORGRN R; SATO M (Ed.). **Brain mechanisms of sensation**. New York: Wiley, p. 143-160, 1981.

\_\_\_\_\_. Gustatory system. In: PAXINOS, G. (Ed.) **The rat nervous system**. Australia: Academic Press, p. 751-771, 1995.

OGIHARA, C. A. et al. Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 42,n.6, p. 561-566, 2009.

OLDFIELD, B. J.; MCKINLEY, M. J. Circunventricular organs. In: The Rat Nervous System, 2nd edition, Paxinos G. (Ed.), San Diego: **Academic Press**, p. 391-403, 1995.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50,n.3, p. 413-492, 1998.

RICHTER, C. P. Salt taste thresholds for normal and adrenalectomized rats. **Endocrinology**, v. 24:367–71, 1939.

ROCCHINI, A. P.; CANT, JR.; BARGER, A. C. Carotid sinus reflex in dogs with low-to-high-sodium intake. **Am. J. Physiol**, v. 233, p. H196-H202, 1977.

SAKAI, R. R. et al. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendoc**, v. 64, p. 425-429, 1996.

SARNO, F. et al. Estimated sodium intake by the Brazilian population, 2002-2003. **Rev. Saúde Pública**, v. 43,n.2, p. 219-25, 2009.

SHAMMAH-LAGNADO, S. J.; COSTA, M.S.; RICARDO, J. A. Afferent connections of the parvocellular reticular formation: a horseradish peroxidase study in the rat. **Neuroscience** , v. 50,n.2, p. 403-425, 1992.

SLADEK, C. D.; SONG, Z. Regulation of vasopressin release by co-released neurotransmitters: mechanisms of purinergic and adrenergic synergism. **Prog. Brain Res**, v. 170, p. 93-107, 2008.

SMITH, D. V.; LI, C. S. Tonic GABAergic Inhibition of Taste-responsive Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract. **Chem. Senses** , v. 23, p. 159-169, 1998.

SPEILMAN, W. S.; DAVIS, J. O. The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat. **Circulation Research**, v. 35, p. 615-624. 1974.

STEINER, J. E. The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. **Symp. Oral. Sens. Percep**, v. 4, p. 254-78, 1973.

\_\_\_\_\_. Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 237, p. 229-33, 1974.

\_\_\_\_\_. Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. **Adv. Child. Dev. Behav**, v. 13, p. 257-95, 1979.

STREEFLAND, C.; JANSEN, K. Intramedullary projections of the rostral nucleus of the solitary tract in the rat: gustatory influences on autonomic output. **Chem. Senses**, v. 24,n.6, p. 655-64, 1999.

TAKAKURA, A. C. et al. Commissural nucleus of the solitary tract is important for cardiovascular responses to caudal pressor area activation. **Brain Res**, v. 1161, p. 32-7, 2007.

TRAVERS, J. B. Efferent projections from the anterior nucleus of the solitary tract of the hamster. **Brain Res**, v. 457,n.1 p. 1-11, 1988.

TRAVERS, S. P.; NORGREN, R. Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of the rat. **J. Neurophysiol**, v. 73 (6), p. 2144-62, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of a WHO forum and technical meeting, 2006, Paris, France. **Reducing salt intake in populations**. Geneva: WHO, 2007.

YAMAMOTO, T. et al. c-Fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. **Neuroreport**, v. 4, n. 11, p. 1223-1226, 1993.