

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MIGUEL FURTADO MENEZES**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 DO**  
**NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA**  
**INGESTÃO DE SÓDIO**

**ARARAQUARA**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MIGUEL FURTADO MENEZES**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 DO**  
**NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA**  
**INGESTÃO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Patrícia Maria De Paula

**ARARAQUARA**

**2010**

Menezes, Miguel Furtado

Participação dos receptores purinérgicos P2 do núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio / Miguel Furtado Menezes.– Araraquara: [s.n.], 2010.

69 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador : Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula

1. Trifosfato de adenosina 2. Receptores purinérgicos P2 3. Suramina 4. Núcleo parabraquial lateral I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

**MIGUEL FURTADO MENEZES**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 DO  
NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA  
INGESTÃO DE SÓDIO**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Patricia Maria de Paula

2º Examinador : Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglione Batalhão

3º Examinador : Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira

Araraquara, 30 de Julho de 2010.

## **DADOS CURRICULARES**

### **MIGUEL FURTADO MENEZES**

NASCIMENTO	19.02.1977 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	Joaquim Carlos de Oliveira Menezes Rosana da Cunha Rudge Furtado
2003/2006	Curso de Graduação em Educação Física Universidade Paulista de Araraquara- Unip
2008/2010	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).

**A MINHA ESPOSA,  
MICHELE**

**A MINHA FILHA,  
ANA LUÍZA**

**Obrigado por todos os momentos que passamos juntos.**

## ***Agradecimentos***

*Agradeço especialmente a Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria De Paula, pela orientação, apoio e dedicação a este trabalho. Desde minha iniciação científica tive o privilégio de tê-la como orientadora.*

*A minha filha Ana Luíza, que fez com que tudo valesse a pena.*

*A minha esposa Michele, a você agradeço por todo o amor, carinho e compreensão em todos os momentos bons e difíceis.*

*A minha mãe, Rosana, pelo apoio, amor e carinho.*

*Agradeço aos professores do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelos ensinamentos transmitidos.*

*Agradeço aos meus irmãos e amigos pelo apoio.*

*Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara pelo auxílio na execução deste trabalho.*

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

Menezes MF. Participação dos receptores purinérgicos P2 do núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2010

## Resumo

Estudos recentes demonstram que os receptores purinérgicos estão presentes no núcleo parabraquial lateral (NPBL), uma estrutura pontina envolvida no controle da ingestão de sódio. No presente estudo, investigamos os efeitos das injeções do  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP, agonista dos receptores P2X) sozinho ou combinado com o ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS, antagonista dos receptores P2X) ou suramin (antagonista não seletivo dos receptores P2) no NPBL sobre a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio. Também investigamos os efeitos da injeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com o PPADS no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos saciados e depletados de sódio. Foram utilizados ratos Holtzman com implante de cânulas implantadas bilateralmente em direção ao NPBL. A depleção de sódio foi induzida pelo tratamento com o diurético furosemida (20 mg/kg do peso corporal) acompanhado de uma dieta deficiente em sódio por 24 horas. As injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 e 4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio ( $25,3 \pm 0,8$  e  $26,5 \pm 0,9$  mL/2 h, respectivamente, vs. salina:  $15,2 \pm 1,3$  mL/2 h). O pré-tratamento com o suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou com o PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL aboliu os efeitos do  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP na ingestão de NaCl 1,8% ( $15,2 \pm 1,2$  e  $16,9 \pm 0,9$  mL/2 h, respectivamente). As injeções de PPADS sozinho no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% ( $14,6 \pm 0,8$  mL/2 h vs. salina:  $18,3 \pm 1,8$  mL/2 h). No entanto, as injeções de suramin sozinho no NPBL quase aboliram a ingestão de NaCl 1,8% ( $5,7 \pm 1,9$  mL/120 min, vs. salina:  $15,5 \pm 1,1$  mL/120 min) e aumentaram a ingestão de sacarose 2% somente no tempo de 90 minutos ( $7,1 \pm 1,3$  vs. salina:  $5,3 \pm 0,8$  mL/90 min) sem alterar a ingestão de água induzida por privação hídrica de 24h ( $16,7 \pm 1,8$  mL/2 h vs. salina:  $15,0 \pm 2,1$  mL/2 h). A injeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL aumentou a PAM em ratos saciados e em ratos depletados de sódio ( $\Delta 23 \pm 3$  vs. salina:  $2 \pm 0,3$  mmHg e  $\Delta 26 \pm 2$  vs.



salina:  $1 \pm 1$  mmHg, respectivamente) sem alterar a FC ( $\Delta 9 \pm 5$  vs salina  $1 \pm 2$  bpm e  $\Delta -6 \pm 16$  vs. salina:  $3 \pm 1$  bpm, respectivamente). A resposta pressora observada após a injeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foi atenuada pelo pré-tratamento com o PPADS no NPBL em ratos saciados e depletados ( $\Delta 6 \pm 1$  e  $\Delta 8 \pm 1$  mmHg, respectivamente). A injeção unilateral de PPADS no NPBL de ratos saciados e depletados de sódio não produziu alterações na PAM e FC basais ( $117 \pm 2$  mmHg e  $373 \pm 10$  bpm e  $107 \pm 2$  mmHg e  $405 \pm 28$  bpm, respectivamente) quando comparado com os valores de PAM e FC basais antes das injeções ( $108 \pm 3$  mmHg e  $365 \pm 10$  bpm,  $104 \pm 2$  mmHg e  $396 \pm 29$  bpm, respectivamente). Os resultados sugerem que a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NPBL facilitam a ingestão de sódio provavelmente reduzindo a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL que controlam a ingestão de sódio. Este aumento na ingestão de NaCl 1,8% não é devido aos fatores hemodinâmicos, pois a injeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL promoveu aumento na PAM.

Palavras-chave: Trifosfato de Adenosina, receptores purinérgicos P2, suramina, núcleo parabraquial lateral.

Menezes MF. Involvement of P2 purinergic receptors in the lateral parabrachial nucleus on control of sodium intake [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2010

## **Abstract**

Recent studies have shown that purinergic receptors are present in the lateral parabrachial nucleus (LPBN), a pontine structure involved in the control of sodium intake. In the present study, we investigated the effects of  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate ( $\alpha,\beta$ -methylene ATP, selective P2X purinergic agonist) alone or combined with pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS, P2X purinergic antagonist) or suramin (non-selective P2 purinergic antagonist) injected into the LPBN on sodium depletion-induced by 1.8% NaCl intake. We also investigated the effects of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP alone or combined with PPADS injected into the LPBN on mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) on replete and sodium depleted rats. Male Holtzman rats with stainless steel cannulas implanted into the LPBN were used. Sodium depletion was induced by treating rats with the diuretic furosemide (20 mg/kg of body weight) followed by 24 h of sodium-deficient diet. Bilateral injections of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP (2.0 and 4.0 nmol/0.2  $\mu$ L) into the LPBN increased sodium depletion-induced 1.8% NaCl intake ( $25.3 \pm 0.8$  and  $26.5 \pm 0.9$  mL/2 h, respectively, vs. saline:  $15.2 \pm 1.3$  mL/2 h). Pre-treatment with suramin (2.0 nmol/0.2  $\mu$ L) or PPADS (4 nmol/0.2  $\mu$ L) into the LPBN abolished the effects of  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP on 1.8% NaCl intake ( $15.2 \pm 1.2$  and  $16.9 \pm 0.9$  mL/2 h, respectively). Injections of PPADS alone into the LPBN did not change 1.8% NaCl intake ( $14.6 \pm 0.8$  mL/2 h vs. saline:  $18.3 \pm 1.8$  mL/2 h). However, injections of suramin alone into the LPBN

strongly reduced 1.8% NaCl intake ( $5.7 \pm 1.9$  mL/120 min, vs. saline:  $15.5 \pm 1.1$  mL/2 h) and increased the 2% sucrose intake only at 90 min ( $7.1 \pm 1.3$  vs. saline:  $5.3 \pm 0.8$  mL/90 min), without changing 24h water deprivation-induced water intake ( $16.7 \pm 1.8$  mL/2 h vs. saline:  $15.0 \pm 2.1$  mL/2 h). Injection of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP (2.0 nmol/0.2  $\mu$ L) into the LPBN increased MAP on replete and sodium depleted rats ( $\Delta 23 \pm 3$  vs. saline:  $2 \pm 0.3$  mmHg and  $\Delta 26 \pm 2$  vs. saline:  $1 \pm 1$  mmHg, respectively), without changing HR ( $\Delta 9 \pm 5$  vs saline  $1 \pm 2$  bpm and  $\Delta -6 \pm 16$  vs. saline:  $3 \pm 1$  beats/min, respectively). The pressor response to  $\alpha,\beta$ -methylene ATP was attenuated by previous injection of PPADS into the LPBN on replete and sodium depleted rats ( $\Delta 6 \pm 1$  and  $8 \pm 1$  mmHg, respectively). The unilateral injection of PPADS into the NPBL on replete or depleted of sodium rats produced no changes in basal MAP and HR ( $117 \pm 4$  mmHg and  $373 \pm 10$  bpm,  $107 \pm 2$  mmHg and  $405 \pm 28$  bpm, respectively) in comparasion with basal MAP and HR before injection ( $108 \pm 3$  mmHg and  $365 \pm 10$  bpm,  $104 \pm 2$  mmHg and  $396 \pm 29$  bpm, respectively). The results suggest that purinergic P2X receptor activation in the LPBN facilitates NaCl intake, probably reducing the activity of LPBN inhibitory mechanisms that control sodium intake. This increase in NaCl 1.8% intake is not due to hemodynamic effects, since the injection of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP in the LPBN produced an increase in MAP.

Keywords: Adenosine triphosphate, P2 purinergic receptors, lateral parabrachial nucleus, suramin, .

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	16
1-Introdução.....	18
2- Objetivo.....	24
3- Material e Métodos.....	25
3.1- Animais .....	25
3.2- Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no núcleo parabraquial lateral (NPBL) .....	25
3.3- Injeções no NPBL .....	26
3.4- Drogas e soluções utilizadas .....	26
3.5- Medida da ingestão de NaCl 1,8% e de água.....	27
3.5.1- Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos saciados .....	27
3.5.2- Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos submetidos à depleção de sódio de 24 h ....	27
3.6- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	28
3.7- Histologia cerebral para confirmação dos pontos de injeção .....	28
3.8- Apresentação dos resultados e análise estatística.....	29
4- Protocolos Experimentais.....	30
4.1- Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos saciados e depletados de sódio com injeções bilaterais $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL .....	30
4.1.1- Ratos depletados de sódio .....	30
4.1.2- Ratos saciados .....	30
4.2- Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio com injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com PPADS ou suramin no NPBL. ....	31
4.2.1- Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio com injeções bilate de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com PPADS .....	31
4.2.2- Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio com injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com suramin .....	31

4.3- Ingestão de sacarose 2% e água em ratos com injeções bilaterais de suramin no NPBL .....	32
4.4- Ingestão de água induzida por 24h de privação hídrica em ratos com injeções bilaterais de suramin no NPBL .....	32
4.5- Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos saciados e depletados de sódio (furosemida + alimento deficiente em sódio) que receberam injeções de $\alpha,\beta$ -metileno ATP antes e após PPADS no NPBL. ....	33
5-Resultado.....	34
5.1- Localização histológica das cânulas no NPBL .....	34
5.2- Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos saciados e depletados de sódio .....	36
5.2.1- Ratos depletados de sódio .....	36
5.2.2- Ratos saciados .....	38
5.3- Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com o PPADS ou suramin no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela depleção de sódio .....	38
5.3.1- Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com o PPADS no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela depleção de sódio .....	38
5.3.2- Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com suramin no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela depleção de sódio .....	40
5.4- Efeito das injeções bilaterais de suramin no NPBL na ingestão de sacarose 2% e água .....	42
5.5- Efeito das injeções bilaterais de suramin no NPBL na ingestão água induzida por 24 h de privação hídrica.....	44
5.6- Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP e suramin em áreas adjacentes ao NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzidas pela depleção de sódio .....	44
5.8- Efeito da injeção unilateral de PPADS no NPBL sobre as respostas cardiovasculares promovidas pela injeção unilateral de $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio (furosemida + alimento deficiente em sódio) .....	46
6- Discussão.....	52
7- Conclusão .....	57

8- Referências Bibliográficas .....	58
-------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados mostrando o local das injeções, indicados pelas setas, no núcleo parabraquial lateral (NPBL). pcs: pedúnculo cerebelar superior (destacados pelos círculos pontilhados).....34
- Figura 2.** Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida pela depleção de sódio em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP em diferentes doses (1,0, 2,0 e 4,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina no NPBL.....36
- Figura 3.** Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida pela depleção de sódio em ratos que receberam injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina+ salina no NPBL.....38
- Figura 4.** Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida pela depleção de sódio em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina + salina no NPBL.....40
- Figura 5.** Ingestão cumulativa de sacarose 2% (A) e água (B) em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina no NPBL.....42
- Figura 6.** Traçado de um rato depletado de sódio representativo dos grupos mostrando as alterações de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) após injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) antes e 2 e 30 minutos após o PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL.....47

**Figura 7.** Variações da pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, B) produzidas por injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) antes (barras pretas) e 2, 10, 30 e 60 minutos após (barras hachuradas) PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL de ratos saciados. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP.....48

**Figura 8.** Variações da pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, B) produzidas por injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ l) antes (barra preta) e 2, 10, 30 e 60 minutos após (barras hachuradas) PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL de ratos depletados. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP.....50

**Figura 9.** Modelo esquemático mostrando o mecanismo inibitório do NPBL para o controle da ingestão de sódio e a possível interação com os mecanismos purinérgicos P2X,  $\alpha_2$  adrenérgicos e gabaérgicos presentes nessa área. +, excitação; -, inibição; ANG II, angiotensina II; NOR, noradrenalina; ATP, adenosina 5'-trifosfato; CeA, núcleo central da amígdala; NPBL, núcleo parabraquial lateral; OSF, órgão subfornical; AV3V, região anteroventral do terceiro ventrículo, NTS, núcleo do trato solitário, AP, área postrema.....55



## LISTA DE TABELAS

1. Ingestão cumulativa de água induzida por 24 h de privação hídrica em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin ou salina no NPBL.....44
2. Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% de ratos depletados de sódio que receberam injeções bilaterais de suramin,  $\alpha,\beta$ -metileno ATP ou salina em áreas fora do NPBL.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ANG II** – angiotensina II;

**AP** – área postrema;

**ATP** – Adenosina 5'- trifosfato

**AV3V** – região anteroventral do terceiro ventrículo

**CAP** – captopril

**CCK** – colecistocinina

**CeA** – núcleo central da amígdala

**CRF**– fator liberador de corticotropina

**EPM** – erro padrão da média

**FC** – frequência cardíaca

**FURO** – furosemida;

**g** – grama(s)

**GABA** – ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**Glu** – glutamato

**h** – hora(s)

**i.c.v.** – intracerebroventricular;

**kg** – quilograma

**LCR**– líquido céfalo-raquidiano

**mg** – miligrama(s)

**min** – minuto(s)

**NaCl** – cloreto de sódio

**NPB**– núcleo parabraquial

**NPBL** – núcleo parabraquial lateral;

**NTS** – núcleo do trato solitário;

**OCVs**– órgãos circunventriculares

**OVLT**– órgão vascular da lâmina terminal

**PAM**– pressão arterial média

**pcs** – pedúnculo cerebelar superior

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

**s.c.** – subcutânea

**SFO** – órgão subfornical;

**SNC** – sistema nervoso central;

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

**VP**– vasopressina

**VL** – ventrículo lateral

**5-HT** – serotonina;

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

$\pm$  – mais ou menos

**$\mu\text{g}$**  – micrograma(s)

**$\mu\text{L}$**  – microlitro(s)

**$\mu\text{m}$**  – micrometro(s)

**$\alpha$**  – alfa

**$\beta$**  – beta

## 1 Introdução

Animais terrestres perdem água e eletrólitos constantemente, principalmente o íon sódio, através do suor, respiração e predominantemente pela urina. Desta forma, respostas reflexas e comportamentais são necessárias para corrigir estas perdas e manter a homeostase dos líquidos corporais. Os mecanismos reflexos envolvem o sistema nervoso autônomo e respostas endócrinas [liberação de aldosterona, vasopressina (VP), angiotensina (ANG II), etc] que interferem com as perdas renais de sódio e água durante um estado de desidratação. Estes mecanismos reflexos servem para manter a função cardiovascular, até que as respostas comportamentais ocorram para restaurar a homeostase. As respostas comportamentais incluem a procura e o comportamento de ingestão de água e fluidos ou alimentos que contenham sódio. Estas ingestões de água e sódio servem para corrigir as deficiências orgânicas de água e sal. Sede e apetite ao sódio são estados motivacionais que levam o animal a encontrar e consumir água e substâncias salgadas e são definidos pela medida deste consumo sob condições experimentais adequadas<sup>42</sup>.

A perda de fluido extracelular resulta em deficiência de sódio e água. Esta condição de deficiência em sódio está associada com uma sensação peculiar na boca<sup>49</sup> que algumas vezes é interpretada como sede, mas não é aliviada pela ingestão de água, esta sensação é chamada de apetite ao sódio<sup>50</sup>.

Sede e apetite ao sódio sempre foram considerados comportamentos distintos, embora pudessem compartilhar mecanismos de ativação. Esse compartilhamento logo ficou demonstrado para a ANG II e não tardou muito para que o mesmo se verificasse para os receptores cardiovasculares de volume<sup>28,42</sup>. Apesar de mecanismos comuns, a relação temporal entre o aparecimento da sede e do apetite ao sódio reforça a distinção entre os comportamentos. Tanto durante a hipovolemia como durante a administração de ANG II, a sede, definida por busca e ingestão de água, sempre precede o apetite ao sódio – definido como busca e ingestão de NaCl hipertônico<sup>28</sup>. Essa distinção torna-se ainda mais dramática durante a desidratação intracelular que, se por um lado ativa a sede, por outro inibe o

apetite ao sódio. Essa inibição parece depender de um efeito direto do sódio sobre receptores de sódio ou sobre osmorreceptores conforme demonstrado em experimentos que produzem elevação da concentração intracerebral de sódio ou da osmolaridade sanguínea<sup>08-9, 17, 79</sup>.

## **Circuitos neurais envolvidos no controle da sede e do apetite ao sódio**

Fatores humorais (osmolaridade, concentração de sódio, hormônios) e mecânicos (volemia) agem como sinais-chave para o aparecimento da sede e do apetite ao sódio por meio de duas vias de entrada para o sistema nervoso central (SNC<sup>42,51,61,76</sup>). Uma via envolve fatores humorais que pelo plasma ou líquido céfalo-raquidiano (LCR) sinalizam os órgãos circunventriculares (OCVs), entre os quais podemos destacar o órgão subfornical (OSF) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) localizados no prosencéfalo e a área postrema (AP) localizada no tronco encefálico. A outra via constitui aferências vagais e glossofaríngeas provenientes de receptores viscerais (osmo-sódio receptores hepáticos ou renais, barorreceptores renais ou cardiovasculares) que se dirigem para núcleos integradores do tronco encefálico como o núcleo do trato solitário (NTS) e depois para núcleo parabraquial (NPB). Os OCVs situam-se em posições estratégicas nos ventrículos encefálicos oferecendo uma ampla superfície de contato com os solutos do plasma e do LCR<sup>61</sup>. A presença de neurônios osmo-sódio sensíveis e de receptores de ANG II, permitem aos OCVs detectarem as variações na concentração de sódio e de ANG II circulante, de onde partem informações para os circuitos que controlam a ingestão de água e de sódio ou secreção de VP<sup>42,51,61</sup>.

## **Importância do núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio e água**

O NPB que processa a informação gustatória e visceral que chega ao sistema nervoso central pela AP e NTS tem sido identificado também como uma área de controle inibitório dos comportamentos de sede e apetite ao sódio<sup>54,60</sup>. Como resultados destes estudos, uma grande variedade de fatores endógenos que medeiam e/ou modulam a ingestão de sódio e água foram identificados na última década. Dentro deste contexto,

podemos citar a serotonina (5-HT,<sup>53-54</sup>), peptídeos (por ex. colecistocinina, CCK,<sup>29</sup>) e ácido gama-aminobutírico (GABA)<sup>15</sup> no NPBL, particularmente em sua porção lateral, onde estes mediadores possuem importante envolvimento no controle da ingestão de sódio. Estudos recentes mostraram que injeções bilaterais de metisergida (antagonista dos receptores serotoninérgicos) no NPBL aumentaram a ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por ANG II, administrada intracerebroventricular (i.c.v.) ou no órgão subfornical (OSF)<sup>18,54</sup>. A metisergida injetada bilateralmente no NPBL também aumentou a ingestão de NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com furosemida (FURO) combinado com o captopril (CAP) (inibidor da enzima conversora de angiotensina), ambos injetados subcutaneamente (s.c.), enquanto 2,5-dimetoxi-4-iodoamphetamine hydrobromide (DOI) (agonista serotoninérgico dos receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) no NPBL reduziu a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO+CAP<sup>54</sup>. Além disso, 5-HT e CCK injetadas no NPBL inibem a ingestão de água e NaCl<sup>57</sup>. Estes estudos sugerem que sinais que inibem a ingestão de sódio são integrados no NPBL mediados pela liberação de 5-HT e CCK.

Além dos receptores da 5-HT e da CCK, também os receptores de glutamato, fator liberador de corticotropina (CRF), noradrenalina, GABA e opióides estão envolvidos no controle da ingestão de sódio no NPBL<sup>3,15-16,29,33-35,53-56,62</sup>. Alguns desses neurotransmissores, como a 5-HT, CCK, glutamato e o CRF inibem a ingestão de água e sódio<sup>16,29,34-35,54-56</sup>, enquanto agonistas gabaérgicos, opioidérgicos e noradrenérgicos facilitam a ingestão de sódio<sup>3,15,27,62</sup>. A facilitação ou a inibição da ingestão de sódio está provavelmente relacionada com a ativação ou a desativação dos mecanismos inibitórios presentes no NPBL.

Adicionalmente, estudos recentes de imunohistoquímica<sup>83</sup> evidenciam a densa marcação de uma classe relativamente nova de receptores chamados de purinérgicos em várias regiões envolvidas com o controle hidro-mineral, dentre elas o NPBL. No entanto, o papel destes receptores na regulação da ingestão de água e sódio e nos ajustes cardiovasculares em ratos saciados e em ratos depletados de sódio ainda não haviam sido investigados.

## Neurotransmissão purinérgica

O conceito da neurotransmissão purinérgica, onde o ATP (adenosina 5'-trifosfato) e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock<sup>10</sup> (1972). O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos<sup>13,25,30,45,69</sup>. Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock<sup>11</sup> (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 são 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 2 tipos: P2X e P2Y. Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos em 7 tipos: (P2X1 a P2X7) e são dependentes de canais iônicos (ionotrópicos). Os receptores P2Y são subdivididos em 5 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) e são acoplados à proteína G e operam via inositol trifosfato<sup>69</sup>. 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 ecto-nucleotidases, 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-ATP e o alfa-gama-metileno-ATP, enquanto os receptores P2Y têm como agonista o 2-metilthio-ATP (2meSATP). O agonista alfa-beta-metileno-ATP e o alfa-gama-metileno-ATP são inativos para os receptores P2Y<sup>69</sup>.

Recentemente vários estudos têm demonstrado que o ATP extracelular atuando nos receptores P2X está envolvido em vários mecanismos centrais de regulação cardiovascular, respiratória e de temperatura corporal<sup>37-39,41,63-64,68,70-71</sup>. Existem evidências de que o ATP, atuando no bulbo ventrolateral desempenha um importante papel no controle vasomotor e da atividade simpática<sup>41,71</sup>. Além disso, os receptores P2X desta área, participam também da resposta ventilatória à hipercapnia<sup>75</sup>. Adicionalmente, estudos mostraram que as purinas também participam do controle cardiovascular e respiratório atuando especificamente no NTS<sup>04-05,63-65,68,75</sup>. Ainda neste contexto, estudos de Gourine<sup>37-39</sup> et al., (2004, 2005, 2002),

mostraram o envolvimento da neurotransmissão purinérgica no controle da temperatura corporal, onde a microinjeção i.c.v. ou intra-hipotalâmica de agonistas purinérgicos P2X, promovem uma queda da temperatura corporal de ratos.

Em vista das evidências, de que os receptores purinérgicos estão envolvidos nos mecanismos centrais de controle cardiovascular, respiratório e de temperatura corporal, e sabendo que estes sistemas estão intimamente relacionados com a regulação da ingestão de líquidos, é possível que os receptores purinérgicos participem também do controle hidro-mineral. Esta possibilidade é reforçada pelos estudos imunohistoquímicos e de hibridização *in situ*, indicando que os receptores P2 de diferentes tipos estão densamente presentes em áreas importantes para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo, como os OCVs, hipotálamo e tronco encefálico<sup>44,46,73-74,78,82-83</sup>.

Alguns estudos funcionais indicam que os receptores purinérgicos podem estar envolvidos no controle hidro-mineral<sup>19,47,59</sup>. De acordo com Mori et al.<sup>59</sup> (1992), a injeção de ATP no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) diminui de maneira dose e tempo dependente o fluxo urinário e aumenta os níveis de VP no plasma. Estes efeitos são bloqueados pela injeção no mesmo sítio de antagonista purinérgico P2 (suramin), mas não pelo antagonista purinérgico P1. Estes efeitos também foram bloqueados pela injeção intravenosa (iv) de antagonista vasopressinérgico V1/V2. Assim, os autores sugerem que o ATP injetado no PVN estimula os receptores P2X, liberando VP que promove o seu efeito de antidiurese através de receptores renais V2. Por outro lado, a ativação periférica de receptores do subtipo P1 (A1, A2a, A2b e A3), promovem efeitos opostos aos observados quando da ativação dos receptores P2. Estudos de Coupar e Tran<sup>19</sup> (2002) mostraram que as injeções subcutâneas de agonistas específicos A1 e A2 de adenosina em ratos promovem um aumento da ingestão de água acompanhado por diurese. Adicionalmente, estudos recentes de Kishore et al.<sup>47</sup> (2005), mostraram que a estimulação dos receptores P2Y do ducto renal coletor de ratos hidratados e desidratados, pode modular a excreção de água, sódio e ureia por um mecanismo independente de vasopressina.

No entanto, existem poucos estudos mostrando o envolvimento da sinalização purinérgica em vias comportamentais. Burnstock<sup>14</sup> (2007), relatou o envolvimento da sinalização purinérgica em vias comportamentais, tais como, sono e vigília<sup>7,21,27</sup>,



aprendizagem e memória<sup>20,31,80</sup>, humor e motivação<sup>81</sup>, ingestão de alimento<sup>48</sup>, onde foi demonstrado que a adenosina administrada centralmente atenua a ingestão de alimentos, porém comportamentos como a sede e o apetite ao sódio foram pouco estudados. Estudo de nosso laboratório<sup>26</sup> mostrou a participação dos receptores purinérgicos centrais em mecanismos de sede. Neste trabalho, onde animais receberam injeções i.c.v. de ATP, observou-se a atenuação na ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica, por sobrecarga intragástrica de NaCl 12% e ANG II administrada também i.c.v., embora a injeção de ATP i.c.v. não modificou a ingestão de sódio e água induzida por depleção de sódio. Estes resultados sugerem o envolvimento dos receptores purinérgicos P2 nos mecanismos centrais de regulação da sede e essa inibição não é generalizada para todos os comportamentos ingestivos, pois a injeção de ATP i.c.v. não modificou a ingestão de alimento induzida por 24 h de privação de alimento.

Desta forma, considerando que os receptores purinérgicos P2 centrais estão envolvidos na regulação da sede, a importância do mecanismo inibitório para ingestão de água e sódio do NPBL e a presença de receptores purinérgicos no NPBL, nossa hipótese é que os receptores purinérgicos do NPBL estão envolvidos no controle da ingestão hidromineral. Assim, no presente estudo investigamos os efeitos das injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (agonista dos receptores purinérgicos P2X), suramin (antagonista não seletivo dos receptores purinérgicos P2) e PPADS (antagonista específico dos receptores purinérgicos P2X) sozinhos ou combinados no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida por depleção de sódio. Além disso, também investigamos os efeitos das injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP antes e após PPADS sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos saciados e depletados de sódio.

## 2 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi investigar o possível envolvimento de receptores purinérgicos P2 do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos. Para tanto, foram investigados os efeitos de injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (agonista dos receptores purinérgicos P2X), de suramin (antagonista não seletivo dos receptores purinérgicos P2) e de PPADS (antagonista específico dos receptores purinérgicos P2X) sozinhos ou combinados no NPBL sobre a ingestão de NaCl 1,8% e água induzida por depleção de sódio. Adicionalmente, foi também estudado os efeitos das injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP antes e após PPADS no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC).

## **3 Material e Método**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 290-310 g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração Guabi (Paulínia, SP), água e NaCl 1,8% e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e umidade de  $50 \pm 10\%$ ), com ciclo claro-escuro de 12 h no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA (Proc. CEEA nº 03/2008) da FOAr – UNESP.

### **3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no núcleo parabraquial lateral (NPBL)**

Para o implante das cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso corporal, Cristália, Itapira, SP, Brasil,) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil,) intraperitonealmente (i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizados como referência para nivelar os crânios dos ratos. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nos crânios dos ratos. Nestes pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Duas cânulas-guia de aço inoxidável (12 x 0,5 mm d.i.) foram implantadas bilateralmente em direção ao NPBL de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas: 9,6 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 5,3 mm abaixo do osso<sup>67</sup>. A extremidade das cânulas-guia foi posicionada no encéfalo 2 mm acima do NPBL. As cânulas-guia foram fixadas utilizando resina acrílica aderida a parafusos presos na calota

craniana. Exceto durante as injeções, um mandril de metal foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão e infecção. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia cerebral, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 mL/rato) de pentabiótico veterinário – pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,1 mL/rato). Os animais ficaram em observação e recuperação durante 6 dias.

### 3.3 Injeções no NPBL

As injeções no NPBL foram feitas utilizando-se seringas Hamilton de 5 µL, conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora. Essa agulha injetora foi introduzida no encéfalo pelas cânulas-guia previamente fixadas no encéfalo. A agulha injetora (14 x 0,3 mm d.i.) era 2 mm mais longa que a cânula-guia. O volume de injeção foi de 0,2 µL (em cada lado).

### 3.4 Drogas e soluções utilizadas

- Solução fisiológica (NaCl 0,9% - veículo);
- Furosemida (20 mg/kg do peso corporal, diurético/saliurético, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi administrada subcutaneamente (sc);
- sal hexasódio do ácido 8,8'- [Carbonylbis [imino-3,1-phenylenecarbonylimino (4-methyl-3,1-phenylene)carbonylimino]] bis-1,3,5-naphthalene trisulfonic [suramin (2,0 nmol/0.2 µL, antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2) Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EUA].
- ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico [PPADS (4.0 nmol/0.2 µL, antagonista dos receptores purinérgicos P2X) Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA];
- $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5' triphosphate sal de lítio [ $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,0; 2,0 e 4,0 nmol/0.2 µL, agonista dos receptores purinérgicos P2X) Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA].

As doses utilizadas foram retiradas de dados da literatura, bem como de estudos realizados no laboratório de Paula e cols.,<sup>24</sup> (2004). Solução fisiológica foi injetada nos experimentos controles.

### **3.5 Medida da ingestão de NaCl 1,8% e de água**

#### **3.5.1 Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos saciados**

Após a cirurgia, os animais tiveram 6 dias de recuperação, tendo à disposição ração, água e NaCl 1,8%. No dia do experimento buretas graduadas contendo água e NaCl 1,8% estiveram à disposição dos animais. Dez minutos após as injeções no NPBL foram iniciadas as medidas da ingestão de água e NaCl 1,8%. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 15 minutos durante 2 horas. Foi guardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de NaCl 1,8% os ratos não tiveram acesso à ração.

#### **3.5.2 Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos submetidos à depleção de sódio de 24 h**

A ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pela depleção de sódio foi medida a cada 15 min durante 2 horas. A depleção de sódio foi feita pelo tratamento com o diurético furosemida (20 mg/kg) s.c., seguido de manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciarem as medidas de ingestão de água e de NaCl 1,8%. Após esse período, a água e o fubá foram retirados e então fizemos as microinjeções de drogas no NPBL. 10 minutos depois, os animais tiveram acesso a água e NaCl 1,8%. Para o registro da ingestão de água e de NaCl 1,8% foram utilizados tubos graduados (divisão de 0,1 mL). A ingestão cumulativa de água e de NaCl 1,8% foi medida nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Foi guardado sempre um intervalo de no mínimo de 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de

registro da ingestão de água e de NaCl 1,8%, os ratos não tiveram acesso à ração. Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição tubos com NaCl 1,8% desde pelo menos seis dias antes do início dos experimentos.

### **3.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca**

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados. Sob a anestesia com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) combinada com xilazina (7 mg/kg) ip, um tubo de polietileno (PE 10 soldado ao PE 50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral do rato um dia antes dos experimentos. A cânula foi conduzida subcutaneamente e exteriorizada pelo dorso do animal. No dia seguinte, para o registro da pressão arterial pulsátil a cânula foi conectada ao transdutor de pressão (Stathan P23 Db) acoplado a um pré amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier) que foi conectado ao sistema de aquisição de dados Power Lab (modelo Power Lab 16/30, ADInstruments) que fornecia os sinais para o computador. Após um período de 20 minutos de registro controle da PAM e FC, os animais receberam as microinjeções de agonista ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP, 2 nmol/ 0,2  $\mu$ L) e antagonista (PPADS, 4 nmol/ 0,2  $\mu$ L) dos receptores P2X e de salina no NPBL e o registro foi mantido por 60 min. A PAM e FC foram registradas em ratos saciados (controles, sem tratamento) e ratos submetidos a 24h de depleção de sódio com furosemida. Os registros continuaram por mais 60 minutos após as microinjeções.

### **3.7 Histologia cerebral para confirmação dos pontos de injeção**

Ao final dos experimentos, os ratos receberam injeção de 0,2  $\mu$ l de solução 2% de azul de Evans em cada cânula-guia para confirmar o sítio de microinjeção no NPBL. 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% (50 mL). A seguir, os encéfalos foram retirados e fixados com formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50  $\mu$ m de espessura) foram feitos nos pontos de injeção do NPBL com auxílio de um criostato

(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.

### **3.8 Apresentação dos resultados e análise estatística**

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

## **4 Protocolos Experimentais**

### **4.1 Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos saciados e depletados de sódio com injeções bilaterais $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL**

#### **4.1.1 Ratos depletados de sódio**

Para que pudéssemos estudar os efeitos do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP em diferentes doses (1,0; 2,0 e 4,0 nmol/0,2  $\mu$ L), um grupo de ratos foi submetido a 4 experimentos. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em 2 e cada grupo recebeu salina ou uma das 3 doses do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL. A seqüência dos tratamentos no NPBL em cada animal foi aleatória. Ao final dos 4 experimentos todos os ratos haviam recebido os 4 tratamentos. O intervalo entre os experimentos foi de 48 h.

#### **4.1.2 Ratos saciados**

Para testarmos se as injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL em ratos saciados (que não receberam o tratamento com a furosemida) poderiam produzir qualquer efeito na ingestão de água e de NaCl 1,8%, um outro grupo de animais que não haviam sido tratados com a furosemida recebeu injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2.0 nmol/0.2  $\mu$ L) ou salina no NPBL e após 10 minutos os animais tiveram livre acesso a água e NaCl 1,8%. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em 2 e cada grupo recebeu salina ou  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2.0 nmol/0.2  $\mu$ L) no NPBL. A seqüência dos tratamentos no NPBL em cada animal foi aleatória. Ao final dos 2 experimentos todos os ratos haviam recebido os 2 tratamentos. O intervalo entre os experimentos foi de 48 horas.



## **4.2 Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio com injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com PPADS ou suramin no NPBL.**

### **4.2.1 Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio com injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com PPADS**

PPADS (4 nmol/0.2  $\mu$ L) ou salina foi injetado bilateralmente no NPBL 10 minutos antes de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2 nmol/0.2  $\mu$ L) ou de salina no NPBL. Os ratos foram submetidos a 4 combinações de tratamentos no NPBL: salina + salina; salina +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, PPADS + salina e PPADS +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A seqüência dos tratamentos em cada rato nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final de todos os experimentos cada rato havia recebido os quatro tratamentos. O intervalo entre os experimentos foi de 48 h.

### **4.2.2 Ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio com injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com suramin**

Em outro grupo animais submetidos à depleção de sódio, suramin (2 nmol/0.2  $\mu$ L) ou salina foi injetado bilateralmente no NPBL 10 minutos antes de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2 nmol/0.2  $\mu$ L) ou de salina no NPBL. Os ratos foram submetidos a 4 combinações de tratamentos no NPBL: salina + salina; salina +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, suramin + salina e suramin +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A seqüência dos tratamentos em cada rato nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final de todos os experimentos cada rato havia recebido os quatro tratamentos. O intervalo entre os experimentos foi de 48 h.

### **4.3 Ingestão de sacarose 2% e água em ratos com injeções bilaterais de suramin no NPBL**

Para testar a especificidade das injeções de suramin no NPBL sobre a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio em comparação com outros tipos de comportamentos ingestivos, realizamos o protocolo experimental: ingestão de sacarose 2% após a injeção de suramin no NPBL. Desta forma, um grupo de ratos que recebeu ração e água *ad libitum* teve também acesso à solução de sacarose 2% por 2 h diariamente durante uma semana. Após esse período, suramin (2,0 nmol/ 0,2 µL) ou salina foi injetado bilateralmente no NPBL 10 minutos antes dos animais terem acesso à solução de sacarose 2%. A ingestão cumulativa de água e sacarose 2% foram medidas a cada 15 minutos por 2 horas. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em 2 e cada grupo recebeu salina ou suramin (2,0 nmol/ 0,2 µL) no NPBL. A seqüência dos tratamentos no NPBL em cada animal foi aleatória. Ao final dos 2 experimentos todos os ratos haviam recebido os 2 tratamentos. O intervalo entre os experimentos foi de 48 h.

### **4.4 Ingestão de água induzida por 24h de privação hídrica em ratos com injeções bilaterais de suramin no NPBL**

Para testar a especificidade das injeções de suramin no NPBL sobre a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio em comparação com outros tipos de comportamentos ingestivos, realizamos outro protocolo experimental: ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica após a injeção de suramin no NPBL. Estes animais tiveram acesso apenas a ração por 24 h e após esse período, a ração foi removida e o suramin (2.0 nmol/0.2 µL) ou a salina foi injetada bilateralmente no NPBL. Após 10 minutos os animais receberam as buretas contendo água. A ingestão cumulativa de água foi medida a cada 15 minutos por 2 h. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em 2 e cada grupo recebeu salina ou suramin (2,0 nmol/ 0,2 µL) no NPBL. A seqüência dos tratamentos no NPBL em cada animal foi aleatória. Ao final dos 2 experimentos todos os ratos haviam recebido os 2 tratamentos. O intervalo entre os experimentos foi de 48 h.

#### **4.5 Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos saciados e depletados de sódio (furosemida + alimento deficiente em sódio) que receberam injeções de $\alpha,\beta$ -metileno ATP antes e após PPADS no NPBL.**

Após 24 horas de canulação da artéria femoral, os ratos saciados e não anestesiados com cânulas bilateralmente implantadas no NPBL foram conectados ao sistema de registro de PAM e FC. Após um período controle de registro basal, as injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foram feitas antes e 2, 10, 30 e 60 minutos após a injeção do PPADS (4,0 nmol/0,2 $\mu$ L). Um outro grupo de animais foi submetido à depleção de sódio com furosemida (20 mg/kg) s.c. e passaram pelo mesmo protocolo experimental 24 horas após a depleção.

## **5 Resultado**

### **5.1 Localização histológica das cânulas no NPBL**

A Figura 1 mostra injeções bilaterais típicas no NPBL. Os pontos de injeção foram localizados principalmente na porção lateral dorsal e central do NPBL (vide Fulwiler e Saper<sup>32</sup> para definições dos sub núcleos do NPBL). Os pontos de injeção no NPBL são similares àqueles em que estudos anteriores mostraram os efeitos da moxonidina (agonista alfa-2- adrenérgico) na ingestão de água e sódio<sup>01,02</sup>.

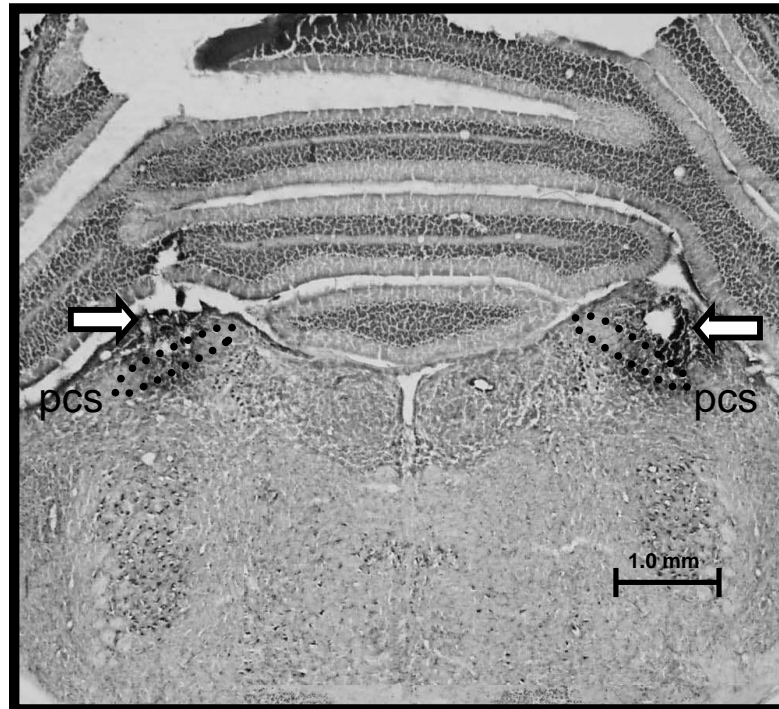


FIGURA 1- Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados mostrando o local das injeções, indicados pelas setas, no núcleo parabraquial lateral (NPBL). pcs: pedúnculo cerebelar superior (destacados pelos círculos pontilhados).

## **5.2 Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos saciados e depletados de sódio**

### **5.2.1 Ratos depletados de sódio**

As injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 e 4,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio ( $25,3 \pm 0,8$  e  $26,5 \pm 0,9$  mL/2 h, respectivamente, vs. salina:  $15,2 \pm 1,3$  mL/2 h) [ $F(3,24) = 13.39$ ;  $p < 0.001$ ] (Figura 2A). As injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio ( $19,7 \pm 1,5$  mL/2 h) (Figura 2A). As injeções  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,0, 2,0 e 4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) não modificaram a ingestão de água ( $3,5 \pm 1,1$ ,  $1,3 \pm 0,8$ ,  $4,4 \pm 1,2$  mL/2 h, respectivamente, vs. salina:  $3,3 \pm 1,4$  mL/2 h) [ $F(3,24) = 1.56$ ;  $p > 0.05$ ] (Figura 2B).

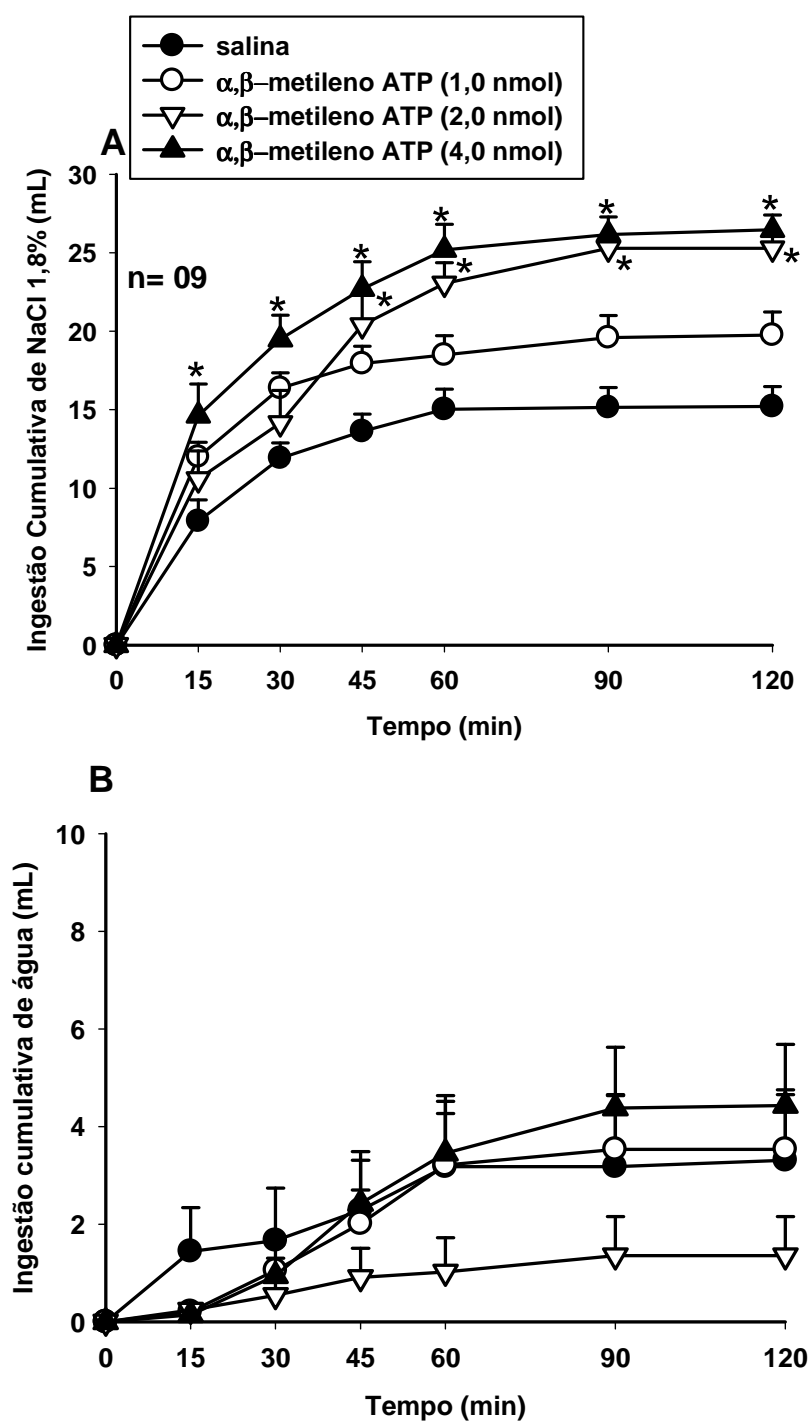


FIGURA 2- Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida pela depleção de sódio em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP em diferentes doses (1,0, 2,0 e 4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina no NPBL.

### **5.2.2 Ratos saciados**

As injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL de ratos saciados não modificou a ingestão de NaCl 1,8% ( $1,3 \pm 0,9$  vs. salina:  $0,8 \pm 0,4$  mL/2 h) ou a ingestão de água ( $0,2 \pm 0,1$  vs. . salina:  $0,6 \pm 0,3$  mL/2 h).

### **5.3 Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com o PPADS ou suramin no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela depleção de sódio**

#### **5.3.1 Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com o PPADS no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela depleção de sódio**

Injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio ( $23,8 \pm 0,8$  vs. salina:  $18,3 \pm 1,8$  mL/2 h) [ $F(3,27) = 10.97$ ;  $p < 0.001$ ], enquanto o PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) sozinho no NPBL não modificou a ingestão de NaCl 1,8% ( $14,6 \pm 0,8$  mL/2 h) (Figura 3A). O pré-tratamento com o PPADS injetado bilateralmente no NPBL aboliu o efeito do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio ( $16,9 \pm 0,9$  mL/2 h,  $p < 0.05$ ) (Figura 3A).

As injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP ou PPADS sozinhos ou combinados no NPBL não modificaram a ingestão de água em ratos depletados de sódio ( $1,7 \pm 1,5$ ;  $3,0 \pm 0,8$  e  $2,4 \pm 0,7$  e respectivamente vs. salina:  $2,2 \pm 0,5$  mL/2 h) [ $F(3,27) = 0.13$ ;  $p > 0.05$ ] Figura 3B).



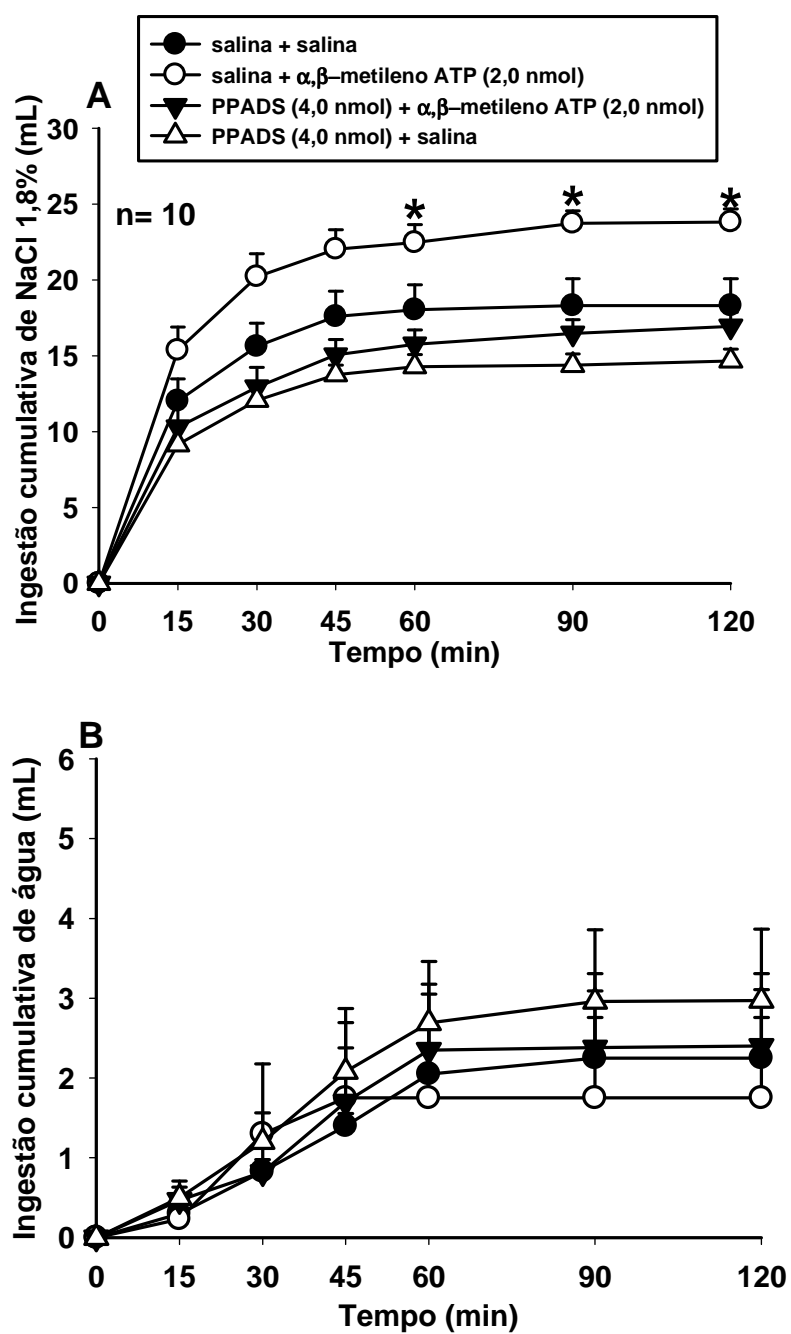


FIGURA 3- Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida pela depleção de sódio em ratos que receberam injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou salina +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina + salina no NPBL.

### **5.3.2 Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP sozinho ou combinado com suramin no NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela depleção de sódio**

Injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio ( $23,9 \pm 1,0$  vs. salina:  $15,5 \pm 1,1$  mL/2 h) [ $F(3,24) = 35.47$ ;  $p < 0.001$ ], enquanto injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0.2  $\mu$ L) no NPBL diminuíram a ingestão de NaCl 1.8% ( $5,7 \pm 1,9$  ml/2 h) (Figura 4A). A ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio não foi modificada após a combinação de suramin +  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP no NPBL ( $15,2 \pm 1,2$  mL/2 h) (Figura 4A).

As injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP ou suramin sozinhos ou combinados no NPBL não modificaram a ingestão de água em ratos depletados de sódio [ $F(3,24) = 1.88$ ;  $p > 0.05$ ] (Figura 4B).

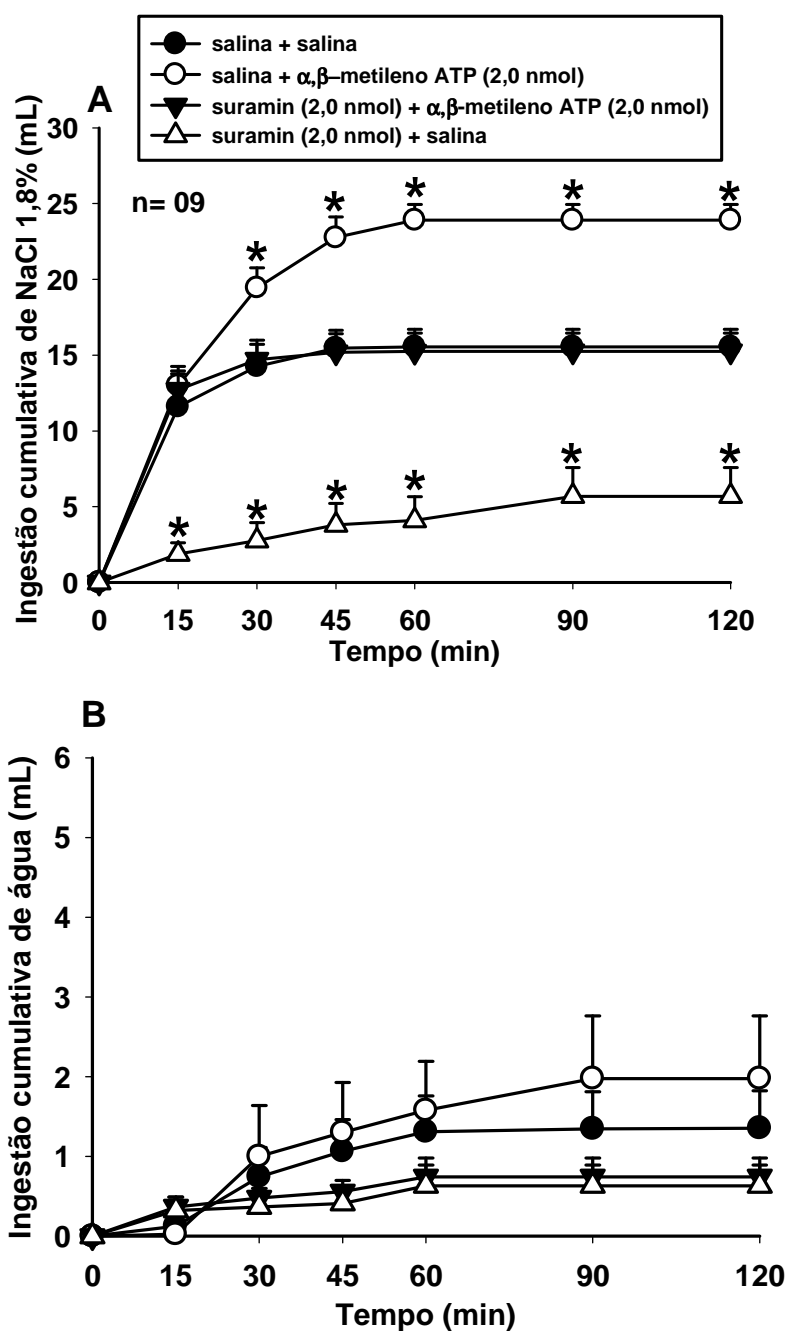


FIGURA 4- Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida pela depleção de sódio em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou salina +  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina + salina no NPBL.

#### **5.4 Efeito das injeções bilaterais de suramin no NPBL na ingestão de sacarose 2% e água**

Injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL aumentaram a ingestão de sacarose 2% somente no tempo de 90 minutos ( $7,1 \pm 1,3$  vs. salina:  $5,3 \pm 0,8$  mL/90 min) como foi sugerido pela significativa interação entre os tratamentos e os tempos [F(5,35) = 4.42;  $p < 0.05$ ] (Figura 5A). Porém, as injeções bilaterais de suramin no NPBL não produziram efeitos na ingestão de água ( $0,3 \pm 0,1$  vs. salina:  $0,1 \pm 0,1$  mL/2 h) [F(1,7) = 1.42;  $p > 0.05$ ] (Figura 5B).

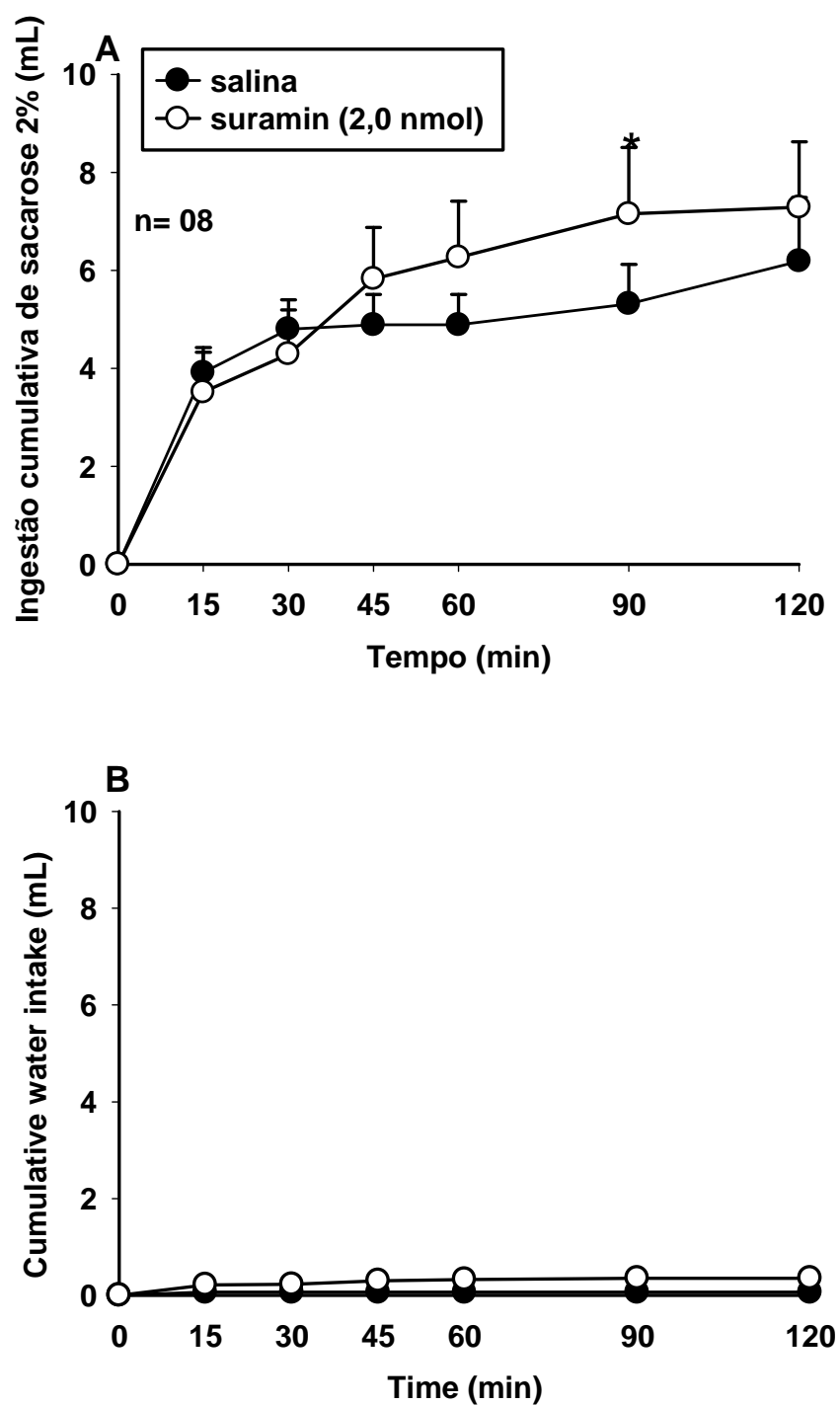


FIGURA 5- Ingestão cumulativa de sacarose 2% (A) e água (B) em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou salina no NPBL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de salina no NPBL.

### **5.5 Efeito das injeções bilaterais de suramin no NPBL na ingestão água induzida por 24 h de privação hídrica**

Injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L cada lado) no NPBL não produziram alterações na ingestão de água induzida por privação hídrica [F(1,6) = 0.37;  $p > 0,05$ ] (tabela 1).

### **5.6 Efeito das injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metileno ATP e suramin em áreas adjacentes ao NPBL na ingestão de NaCl 1,8% e água induzidas pela depleção de sódio**

A especificidade do NPBL como local de ação do agonista e antagonista purinérgicos foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos que receberam injeções de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP e suramin fora do NPBL. Injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) ou suramin (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) em áreas adjacentes ao NPBL não produziram alterações na ingestão de NaCl 1,8% [F(1,7) = 2.44;  $p > 0,05$ ] , [F(1,7) = 1.01;  $p > 0,05$ ] e água [F(1,7) = 1.30;  $p > 0,05$ ] , [F(1,7) = 3.26;  $p > 0,05$ ] (Tabela 2).

Tabela 1 - Ingestão cumulativa de água induzida por 24 h de privação hídrica em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin ou salina no NPBL

<b>Tratamento no NPBL</b>	<b>ingestão de água</b> <b>(mL/2 h)</b>
salina	15,0 ± 2,1
suramin	16,7 ± 1,8

Valores expressos em média ± E.P.M. n = 07 ratos. A dose de suramin foi 2,0 nmoL/0,2 µL.

Tabela 2 - Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% de ratos depletados de sódio que receberam injeções bilaterais de suramin,  $\alpha,\beta$ -metileno ATP ou salina em áreas fora do NPBL

<b>Tratamento no NPBL</b>	<b>Ingestão NaCl 1,8%</b> <b>(mL/2 h)</b>	<b>Ingestão de água</b> <b>(mL/2 h)</b>
salina	16,9 ± 1,0	4,1 ± 1,4
suramin	16,0 ± 1,4	1,0 ± 0,6
salina	18,9 ± 1,5	2,6 ± 1,2
$\alpha,\beta$ -metileno ATP	16,8 ± 1,1	0,9 ± 0,4

Valores expressos pela média ± E.P.M. n = 08 ratos/grupo. As doses de suramin e  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foram de 2,0 nmol/0,2 µL.

### **5.7 Efeito da injeção unilateral de PPADS no NPBL sobre as respostas cardiovasculares promovidas pela injeção unilateral de $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio (furosemida + alimento deficiente em sódio)**

A figura 6 apresenta traçados de um rato depletado de sódio, representativo dos grupos, mostrando os efeitos cardiovasculares promovidos pela injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) antes e aos 2 e 30 minutos após a injeção unilateral de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL.

A figura 7 apresenta os resultados relativos às respostas cardiovasculares promovidas pela injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) antes e aos 2, 10, 30 e 60 minutos após a injeção unilateral de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL em ratos depletados de sódio. Injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL aumentou a PAM ( $\Delta 26 \pm 2$  mmHg, vs. salina:  $1 \pm 1$  mmHg) (Figura 8A), esta resposta pressora foi atenuada dois minutos após a injeção de PPADS no NPBL ( $8 \pm 1$  mmHg) (Figura 8A). Porém, aos 10, 30 e 60 min após a injeção de PPADS a resposta pressora ao  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL voltou ao valor controle ( $\Delta 28 \pm 5$ ;  $19 \pm 5$ ;  $19 \pm 3$  mmHg, respectivamente) (Figura 7A).

Injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL antes e 2, 10, 30 e 60 min após PPADS não promoveram alterações na FC ( $\Delta -6 \pm 16$ ;  $9 \pm 3$ ;  $23 \pm 17$ ,  $11 \pm 6$ ,  $-3 \pm 22$  bpm, respectivamente) quando comparados com a injeção de salina no NPBL de ratos depletados de sódio ( $3 \pm 1$  bpm) (Figura 7B).

Injeção unilateral de PPADS no NPBL de ratos depletados de sódio não produziu alterações na PAM e FC basais ( $107 \pm 2$  mmHg e  $405 \pm 28$  bpm, respectivamente) quando comparado com os valores de PAM e FC basais antes das injeções ( $104 \pm 3$  mmHg e  $396 \pm 29$  bpm, respectivamente).

A depleção de sódio não produziu alterações na PAM e FC basais ( $102 \pm 2$  mmHg e  $384 \pm 11$  bpm, respectivamente) quando comparado com os valores de PAM e FC basais dos ratos saciados ( $103 \pm 2$  mmHg e  $371 \pm 7$  bpm, respectivamente). A depleção de sódio



também não alterou as respostas cardiovasculares produzidas pelo  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL.

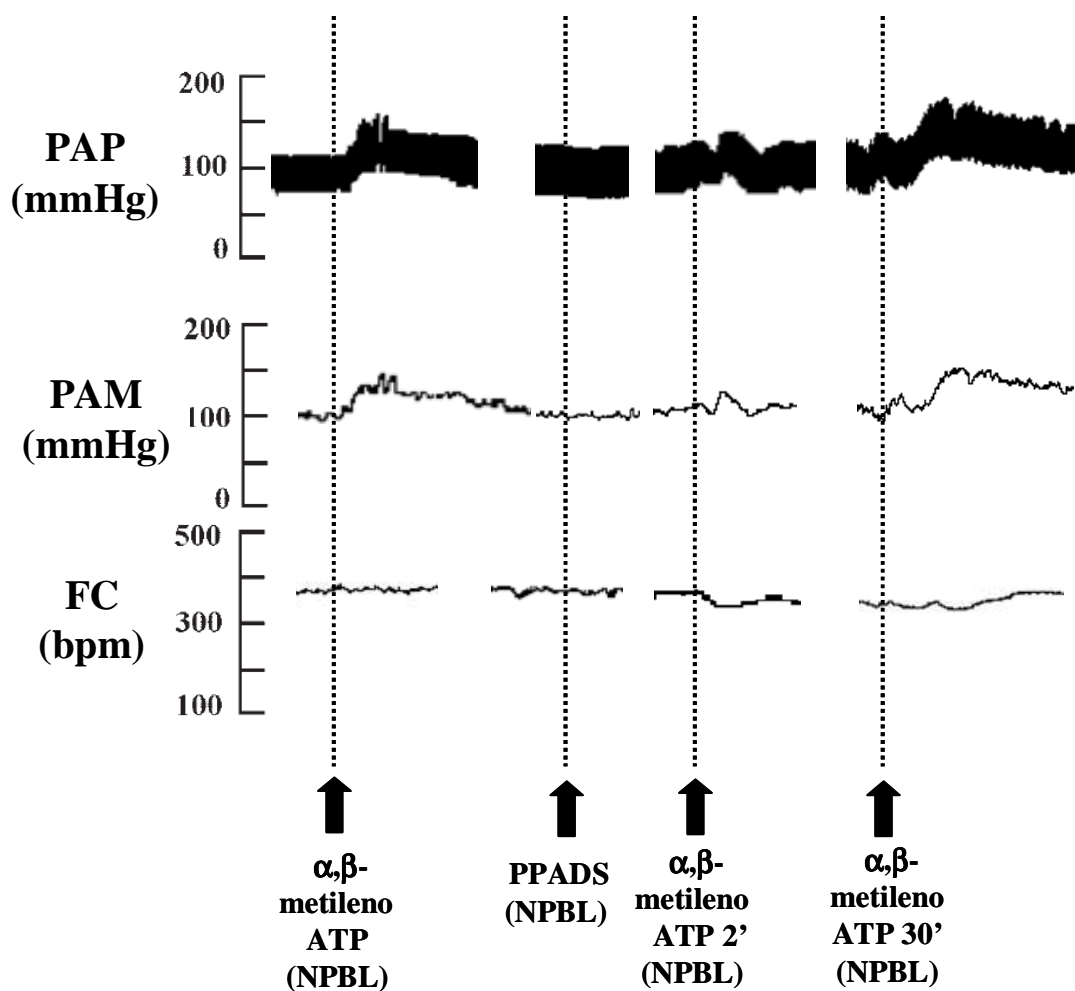


FIGURA 6- Traçado de um rato depletado de sódio representativo dos grupos mostrando as alterações de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) após injeção unilateral de  $\alpha, \beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) antes e 2 e 30 minutos após o PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL.

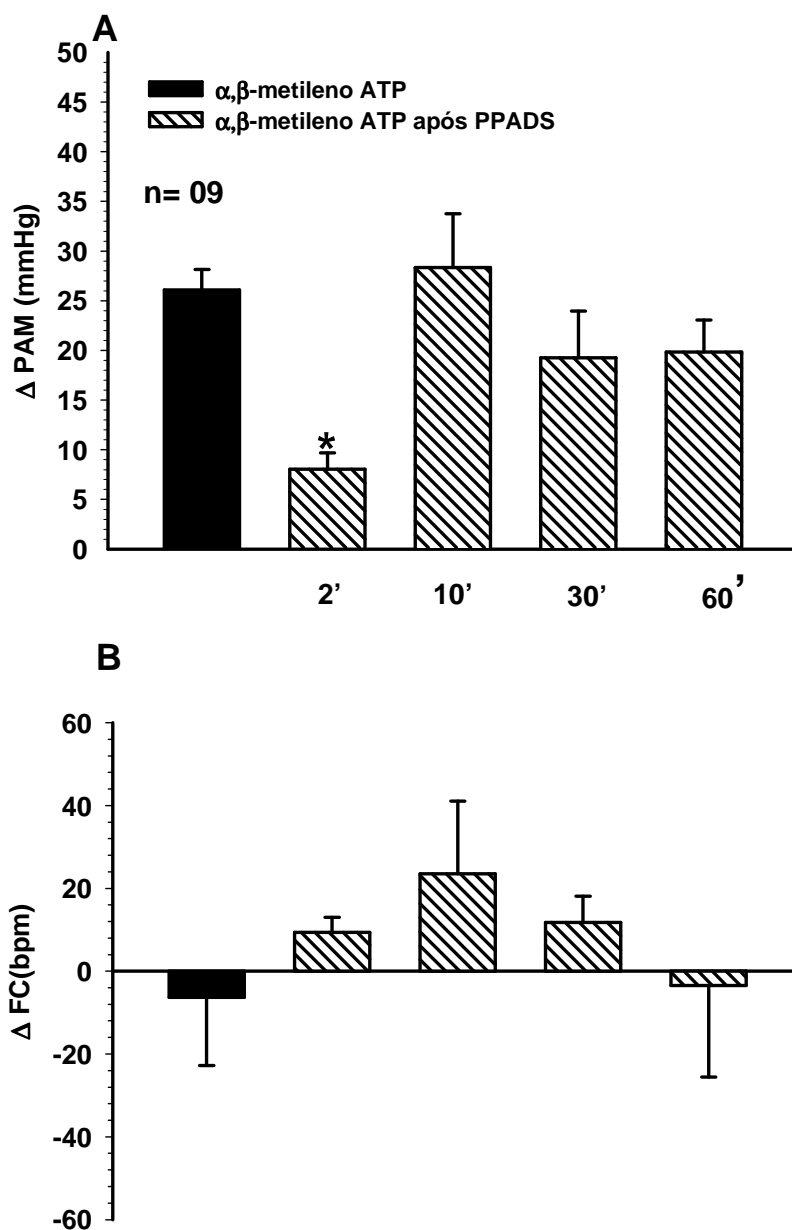


FIGURA 7- Variações da pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, B) produzidas por injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) antes (barra preta) e 2, 10, 30 e 60 minutos após (barras hachuradas) PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL de ratos depletados. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP.

A figura 8 apresenta os resultados relativos às respostas cardiovasculares promovidas pela injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) antes e aos 2, 10, 30 e 60 minutos após a injeção unilateral de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL em ratos saciados. Injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL aumentou a PAM ( $\Delta 23 \pm 3$  mmHg, vs. salina:  $2 \pm 0,3$  mmHg) (Figura 8A), esta resposta pressora foi atenuada dois minutos após a injeção de PPADS no NPBL ( $6 \pm 1$  mmHg) (Figura 8A). Porém, aos 10, 30 e 60 min após a injeção de PPADS a resposta pressora ao  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL voltou ao valor controle ( $\Delta 16 \pm 1$ ;  $18 \pm 1$ ;  $16 \pm 1$  mmHg, respectivamente). (Figura 8A).

Injeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL antes e 2, 10, 30 e 60 min após PPADS não promoveram alterações na FC ( $\Delta 9 \pm 5$ ;  $-6 \pm 9$ ;  $-1 \pm 13$ ;  $-8 \pm 12$ ;  $11 \pm 8$  bpm, respectivamente) quando comparados com a injeção de salina no NPBL de ratos saciados ( $-1 \pm 2$  bpm) (Figura 8B).

Injeção unilateral de PPADS no NPBL de ratos saciados não produziu alterações na PAM e FC basais ( $117 \pm 4$  mmHg e  $373 \pm 10$  bpm, respectivamente) quando comparado com os valores de PAM e FC basais antes das injeções ( $108 \pm 3$  mmHg e  $365 \pm 10$  bpm, respectivamente).

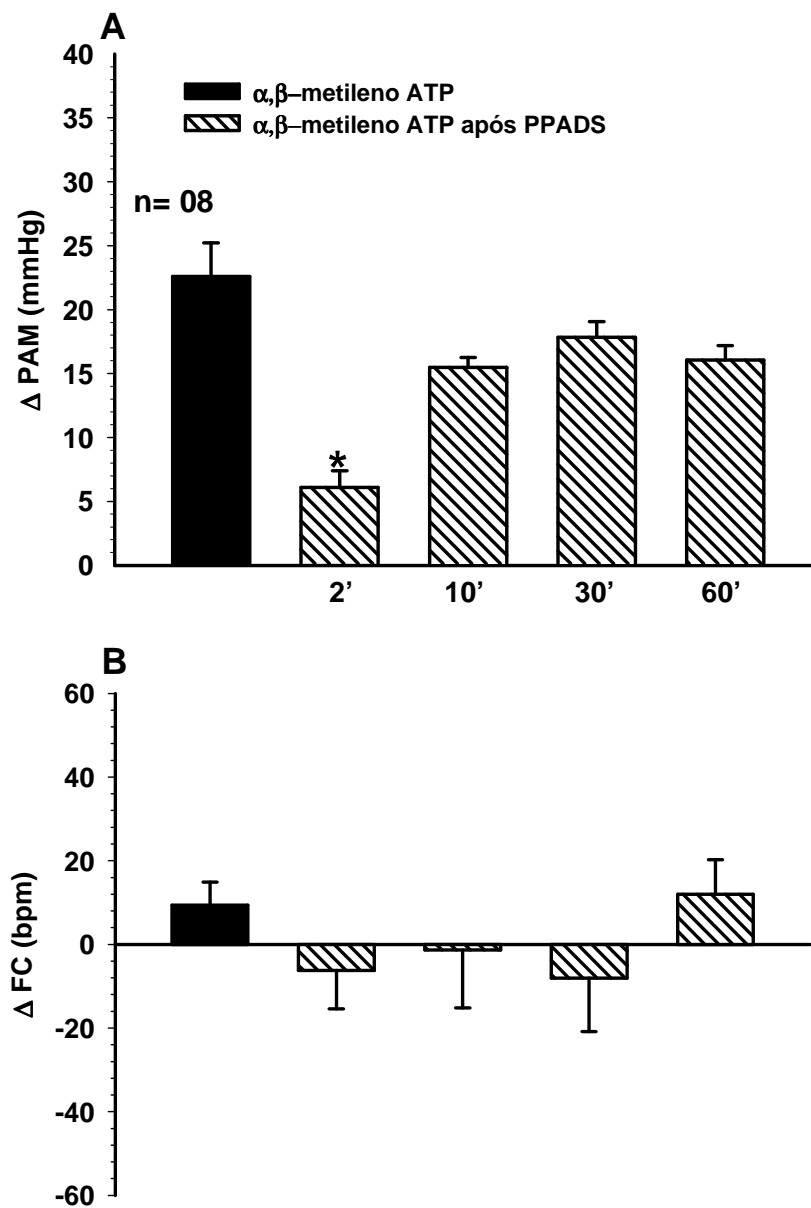


FIGURA 8- Variações da pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, B) produzidas por injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) antes (barras pretas) e 2, 10, 30 e 60 minutos após (barras hachuradas) PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL de ratos saciados. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. n = número de animais. \* diferente de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP.

## 6 Discussão

Os dados do presente estudo mostram que as injeções bilaterais do agonista dos receptores purinérgicos P2X ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP) no NPBL aumenta a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio, e esse efeito foi abolido pelo pré-tratamento com as injeções bilaterais dos antagonistas purinérgicos PPADS e suramin no NPBL, sugerindo que a ativação dos receptores purinérgicos P2X no NPBL facilitam a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio provavelmente reduzindo a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL que controlam a ingestão de sódio. A injeção bilateral de PPADS sozinho no NPBL não produziu efeitos na ingestão de NaCl 1,8%, no entanto, a injeção bilateral de suramin sozinho no NPBL reduziu a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio, sugerindo que os receptores purinérgicos P2 facilitam tonicamente a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio. A ingestão de sódio hipertônico em ratos depletados de sódio normalmente faz com que os ratos ingiram pequenas quantidades de água, que não foi afetada pelos tratamentos com o agonista e os antagonistas dos receptores purinérgicos no NPBL. O suramin injetado no NPBL aumentou discretamente a ingestão de sacarose 2% no tempo de 90 minutos e não afetou a ingestão de água, sugerindo que a inibição da ingestão de NaCl 1,8% provocada pelo suramin no NPBL, não é devido a um efeito sedativo da droga e também não é devido a uma inibição não específica generalizada para comportamentos ingestivos. Injeções de suramin ou  $\alpha,\beta$ -metileno ATP em áreas adjacentes ao NPBL não produziram efeitos na ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio, que confirma a especificidade da área das injeções no NPBL que produziram efeitos na ingestão de NaCl 1,8%.

Evidências para o envolvimento do NPBL no controle da ingestão de água resultam de estudos mostrando que lesões químicas (ácido ibotênico) ou eletrolíticas do NPBL aumentam a ingestão de água induzida por ANG II<sup>22,43,60</sup>. Semelhante às lesões, outros resultados também mostraram que injeções bilaterais de lidocaína ou metisergida (antagonista dos receptores serotoninérgicos) no NPBL também aumentaram a ingestão de água induzida por ANG II<sup>58</sup>. Estudos recentes também mostraram que injeções bilaterais de metisergida no NPBL aumentou a ingestão de NaCl induzida por diferentes estímulos, como ANG II administrada i.c.v. ou injetada no órgão subfornical (SFO), em ratos tratados

com diversos protocolos, como a associação FURO + CAP s.c., depleção de sódio, privação hídrica de 24 horas, ou desoxicorticosterona (DOCA) s.c.<sup>35,53-55</sup>. Semelhante a metisergida, as injeções bilaterais de proglumide (antagonista dos receptores de CCK) no NPBL também aumentou a ingestão de NaCl hipertônico induzido por ANG II i.c.v. ou FURO + CAP s.c.<sup>57</sup>. No entanto, o bloqueio dos mecanismos serotoninérgicos e colecistocinérgicos no NPBL em ratos saciados/normovolêmicos que não receberam tratamentos para induzir a ingestão de sódio, não produziram alterações na ingestão de NaCl hipertônico. Estes resultados sugerem que a serotonina e a CCK secretadas no NPBL durante a ingestão de sódio e água, ativam um mecanismo inibitório para a ingestão de sódio e água.

Além da serotonina e da CCK no NPBL, outros estudos mostraram que também o glutamato e o CRF, atuam no NPBL, inibindo a ingestão de sódio e de água, enquanto agonistas gabaérgicos, opioidérgicos e noradrenérgicos, atuam no NPBL facilitando a ingestão de sódio<sup>3,15-16,33-34,62</sup>. A inibição ou a facilitação na ingestão de sódio e ocasionalmente também na ingestão de água ocorre através da ação de diferentes neurotransmissores sobre o mecanismo inibitório do NPBL. Os presentes resultados sugerem que a ativação dos receptores purinérgicos P2X no NPBL facilitam a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio. Portanto, do mesmo modo que os receptores gabaérgicos, opioidérgicos e adrenérgicos, a ativação dos receptores purinérgicos P2 no NPBL facilitam a ingestão de NaCl através da provável desativação do mecanismo inibitório presente no NPBL.

Vários estudos funcionais sugerem o envolvimento dos mecanismos purinérgicos na regulação cardiovascular, respiratória e temperatura corporal<sup>4-6,23,36-39,64,68,72</sup>. Porém, estes resultados são os primeiros que sugerem o envolvimento de mecanismos purinérgicos do NPBL no controle do equilíbrio hidroeletrólítico ou mais especificamente na ingestão de sódio. Semelhante ao bloqueio de mecanismos serotoninérgicos e colecistoninérgicos no NPBL, a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NPBL aumentou a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio, no entanto, o mesmo tratamento no NPBL não produziu alterações na ingestão de NaCl 1,8% em ratos saciados/normohidratados. Portanto, a ativação dos mecanismos purinérgicos do NPBL facilitam a ingestão de sódio induzida pela ativação de um mecanismo excitatório como aqueles ativados pela depleção de sódio. Além

disso, os resultados também mostram que o suramin no NPBL reduziu a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção, sugerindo que a ativação dos mecanismos purinérgicos do NPBL são essenciais para a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados. Desse modo, parece que diante de uma condição de depleção de sódio, além da ativação de mecanismos excitatórios como a liberação de angiotensina II, ocorre também um bloqueio do mecanismo inibitório do NPBL depende dos mecanismos purinérgicos presentes nesta área.

Embora o suramin no NPBL quase tenha abolido a ingestão de NaCl 1,8%, injeções de PPADS sozinho no NPBL na mesma dose que bloqueou os efeitos do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP não produziu alterações na ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio. Portanto, embora a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NPBL facilitem a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio, parece que a desativação desses receptores não é necessária para a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio. Diferentemente do PPADS, o suramin que é um antagonista purinérgico não seletivo P2 (atua em receptores purinérgicos P2X e P2Y), poderia estar agindo em outros receptores purinérgicos, os receptores P2Y, e assim promover o seu efeito de atenuação na ingestão de sódio. Porém, mais estudos serão necessários para confirmar esta hipótese.

Nossos resultados mostraram claramente o envolvimento dos mecanismos purinérgicos do NPBL no controle da ingestão de sódio, porém, é importante considerar que estes receptores provavelmente não estão atuando sozinhos e sim interagindo com outros neurotransmissores no NPBL para controlar este comportamento. Noradrenalina, e opióides no NPBL, semelhante ao  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, facilitam a ingestão de NaCl em protocolos que estimulam a ingestão de sódio hipertônico<sup>1-3,33,62</sup>, desta forma, sabendo-se que os receptores purinérgicos P2 no encéfalo estão localizados pré- e pós-sinápticamente<sup>69</sup>, o ATP poderia estar atuando como um co-transmissor<sup>12,24</sup> com a noradrenalina, opióides e GABA no NPBL ou talvez aumentando a liberação de noradrenalina, opióides e GABA no NPBL (Figura 9). Portanto, sem excluir a possibilidade de interação com outros neurotransmissores, a ativação de receptores purinérgicos do NPBL poderia facilitar a ingestão de NaCl através da liberação de noradrenalina ou GABA. No entanto, a interação entre os diferentes neurotransmissores no NPBL necessita de mais estudos.



Sabe-se que a ingestão de NaCl pode ser potencializada pela redução da pressão arterial<sup>77</sup>. No entanto, o aumento da ingestão de NaCl observado após as injeções bilaterais do agonista purinérgico P2X, não resulta de uma redução na pressão arterial, visto que injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL causa um aumento da pressão arterial média sem alterar a frequência cardíaca. Desta forma, nossos resultados sugerem que a facilitação na ingestão de sódio após a ativação dos mecanismos purinérgicos em ratos depletados de sódio não é dependente de fatores hemodinâmicos.

Vale ressaltar que estudo de nosso laboratório<sup>26</sup> mostrou que injeção i.c.v. de ATP atenua a ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica e não altera a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio, sugerindo que os receptores purinérgicos (P1 e P2) centrais estão envolvidos especificamente com mecanismos de controle da ingestão de água mas não de sódio. Estes resultados são contrários aos observados no presente estudo, onde demonstramos que a ativação dos receptores P2X do NPBL facilitam a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio mas não alteram a ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica. Resultados semelhantes são observados nos trabalhos com ativação dos receptores adrenérgicos alfa 2<sup>1-2,66</sup> quando a ativação destes receptores ocorre em regiões prosencefálicas<sup>26</sup> ocorre um efeito inibitório para sede e apetite ao sódio, porém quando a ativação dos receptores adrenérgicos alfa 2 é no NPBL<sup>1,2</sup> ocorre um efeito facilitatório principalmente para a ingestão de sódio.

Os presentes resultados sugerem que os mecanismos purinérgicos do NPBL facilitam a ingestão de NaCl em ratos depletados de sódio. Mais estudos são necessários para investigarmos as possíveis interações entre os mecanismos purinérgicos e outros mecanismos do NPBL envolvidos no controle da ingestão de sódio.

## POSSÍVEL MECANISMO INIBITÓRIO DO NPBL

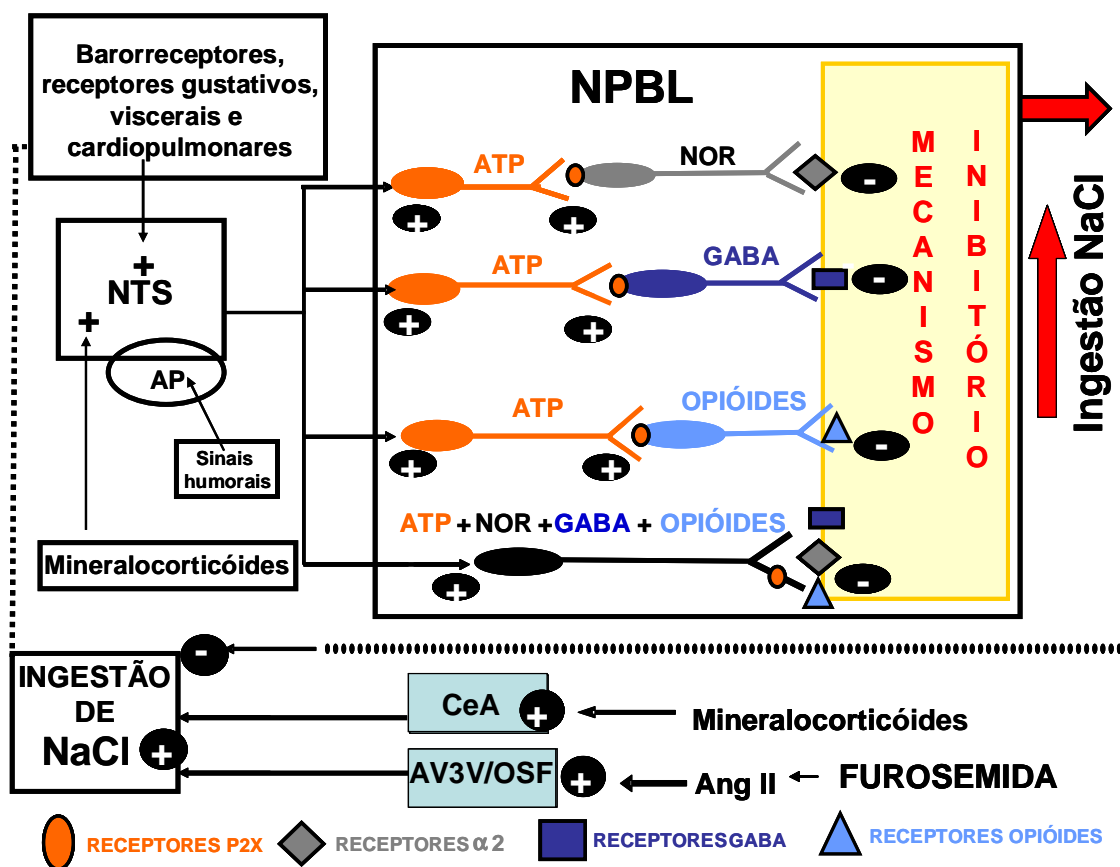


FIGURA 9- Modelo esquemático mostrando o mecanismo inibitório do NPBL para o controle da ingestão de sódio e a possível interação com os mecanismos purinérgicos P2X, adrenérgicos  $\alpha 2$  e gabaérgicos presentes nessa área. A ativação dos receptores purinérgicos P2X que foram classificados segundo as suas características bioquímicas e farmacológicas, como excitatórios, poderiam ativar mecanismos gabaérgicos ou adrenérgicos  $\alpha 2$  no NPBL e assim facilitar a ingestão de NaCl. +, excitação; -, inibição; ANG II, angiotensina II; NOR, noradrenalina; ATP, adenosina 5'trifosfato; CeA, núcleo central da amígdala; NPBL, núcleo parabraquial lateral; OSF, órgão subfornical; AV3V, região anteroventral do terceiro ventrículo, NTS, núcleo do trato solitário, AP, área postrema.

A ativação de receptores purinérgicos P2X com injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL promove aumento da ingestão de NaCl hipertônico induzida por 24 h de depleção de sódio. Esse efeito foi abolido pelo pré-tratamento com as injeções bilaterais dos antagonistas purinérgicos PPADS e suramin no NPBL, sugerindo que a ativação dos receptores purinérgicos P2X no NPBL facilitam a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio.

A injeção bilateral de PPADS sozinho no NPBL não produziu efeitos na ingestão de NaCl 1,8%, no entanto, a injeção bilateral de suramin sozinho no NPBL reduziu a ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio, sugerindo que os receptores purinérgicos P2 facilitam tonicamente a ingestão de NaCl 1,8% em ratos depletados de sódio. A ingestão de água não foi afetada pelos tratamentos com o agonista e os antagonistas dos receptores purinérgicos no NPBL.

Suramin injetado bilateralmente no NPBL aumentou a ingestão de sacarose 2% aos 90 minutos e não afetou a ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica, sugerindo que a inibição da ingestão de NaCl 1,8% provocada pelo suramin no NPBL, não é devida a uma inibição generalizada para todos os comportamentos ingestivos.

Injeções unilaterais de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP no NPBL promoveu aumento da pressão arterial média, sugerindo que a facilitação na ingestão de sódio após a ativação dos mecanismos purinérgicos em ratos depletados de sódio não é dependente de fatores hemodinâmicos.

## **7 Conclusão**

Os resultados sugerem que a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NPBL facilitam a ingestão de sódio provavelmente reduzindo a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL que controlam a ingestão de sódio.

## 8 Referências\*

1. Andrade CA, Barbosa SP, De Luca Jr. LA, Menani JV. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neuroscience*. 2004; 129: 25-34.
2. Andrade CA, De Luca Jr. LA, Colombari DS, Menani JV. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. *Neuroscience*. 2006; 142: 21-8.
3. Andrade-Franzé GM, Andrade CA, De Luca Jr. LA, De Paula PM, Colombari DS, Menani JV. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. *Brain Res*. 2010; 1332: 57-64.
4. Antunes VR, Braga VA, Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32: 467-72.
5. Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res*. 2005; 1032: 85-93.
6. Barraco RA, O'Leary DS, Ergene E, Scislo TJ. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J Auton Nerv Syst*. 1996; 59: 113-24.
7. Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol*. 2004; 73: 379-96.<sup>1</sup>

---

\* De acordo com o estilo Vancouver:

Disponível no site:

[http://www.nlm.nih.gov/bad/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bad/uniform_requirements.html)

8. Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 10380-4.
9. Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: R245-51.
10. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews.* 1972; 24: 509-81.
11. Burnstock G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol.* 1978; 11: 205-22.
12. Burnstock G. Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurons. *Prog Brain Res.* 1986; 68: 193–203.
13. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology.* 1997; 36: 1127-39.
14. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87: 659-797.
15. Callera JC, Oliveira LB, Barbosa SP, Colombari DS, De Luca LA Jr, Menani JV. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. *Neuroscience.* 2005; 134: 725-35.
16. De Castro e Silva E, Fregoneze JB, Johnson AK. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290: 1136-41.

17. Chiaraviglio E, Perez-Guaita MF. The effect of intracerebroventricular hypertonic infusion on sodium appetite in rats after peritoneal dialysis. *Physiol Behav.* 1986; 37: 695-99.
18. Colombari DSA, Menani JV, Johnson AK. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am J Physiol.* 1996; 271: R1470-76.
19. Coupar IM, Tran BL. Effects of adenosine agonists on consumptive behaviour and body temperature. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54: 289-94.
20. Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem.* 1996; 67: 2180–87.
21. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 31-55.
22. Edwards GL, Johnson AK. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1991; 261: 1039-44.
23. Ergene E, Dunbar JC, O'Leary DS, Barraco RA. Activation of P2-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediates depressor responses. *Neurosci. Lett.* 1994; 174: 188-92.
24. Espallergues J, Solovieva O, Técher V, Bauer K, Alonso G, Vincent A, et al. Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience.* 2007; 148: 712-23.

25. Fagura MS, Jarvis GE, Dougall IG, LEFF P. Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J Auton Nerv System*. 2000; 81: 178-86.
26. Faria DRG, Santana JS, Menani JV, De Paula PM. Antidipsogenic effects of central adenosine-5'-triphosphate. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42: 105-13.
27. Feldberg W, Sherwood PD. Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J Physiol*. 1954; 123: 148-67.
28. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*. 1998; 78: 583-686.
29. Fratucci De Gobbi JI, De Luca Jr LA, Johnson AK, Menani JV. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 280: 1301-07.
30. Fredholm BB. Adenosine receptors in the Central Nervous System. *NIPS*. 1995; 10: 122-8.
31. Fujii S, Sasaki H, Mikoshiba K, Kuroda Y, Yamazaki Y, Mostafa TA, et al. A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res*. 2004; 999: 20-8.
32. Fulwiler CE, Saper CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res Rev*. 1984; 7: 229-59.
33. Gasparini S, De Luca Jr LA, Colombari DS, De Paula PM, Barbosa SP, Menani JV. Adrenergic mechanisms of the Kölliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. *Neuroscience*. 2009; 164: 370-9.



34. De Gobbi JI, Beltz TG, Johnson RF, Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. *Brain Res.* 2009; 1301: 44-51.
35. De Gobbi JIF, De Luca Jr. LA, Menani JV. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on doca-induced sodium intake. *Brain Res.* 2000; 880: 131–8.
36. Gourine AV, Atkinson L, Deuchars J, Spyer KM. Purinergic signaling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurons express the P2X2 receptor subunit. *J Physiol.* 2003; 552: 197-211.
37. Gourine AV, Dale N, Gourine VN, Spyer KM. Fever in systemic inflammation: roles of purines. *Front Biosci.* 2004; 9: 1011-22.
38. Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature.* 2005; 436: 108-11.
39. Gourine AV, Melenchuk EV, Poputnikov DM, Gourine VN, Spyer KM. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 2047-55.
40. Gourine AV, Poputnikov DM, Zhernosek N, Melenchuk EV, Gerstberger R, Spyer KM, et al. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br J Pharmacol.* 2005; 1-7.
41. Horiuchi J, Potts PD, Tagawa T, Dampney RA. Effects of activation and blockade of P2x receptors in the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 76: 118-26.

42. Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol.* 1997; 18: 292-353.
43. Johnson AK, Edwards GL. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: Johnson AK, Edwards GL. *Current topics in neuroendocrinology*, Springer, Berlin. 1990. 149-90.
44. Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, et al. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 1999; 407: 11-32.
45. Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J Auton Nerv System.* 2000; 81: 158-63.
46. Kidd EJ, Grahames CB, Simon J, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PP. Localization of P2X purinoceptor transcripts in the rat nervous system. *Mol Pharmacol.* 1995; 48: 569-73.
47. Kishore BK, Krane CM, Miller RL, Shi H, Zhang P, Hemmert A, et al. P2Y2 receptor mRNA and protein expression is altered in inner medullas of hydrated and dehydrated rats: relevance to AVP-independent regulation of IMCD function. *Am J Physiol.* 2005; 288: F1164-72.
48. Levine AS, Morley JE. Purinergic regulation of food intake. *Science.* 1982; 217: 77-9.
49. McCance RA. Experimental sodium chloride deficiency in man. *Proc R Soc London.* 1936; 119b: 245-68.

50. McCance RA. Medical problems in mineral metabolism. III. Experimental human salt deficiency. *Lancet*. 1936; 1: 823–30.
51. McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D, et al. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001; 28: 990-2.
52. Menani JV, De Luca LA Jr, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol*. 1998; 274(2 Pt 2): R555-60.
53. Menani JV, De Luca LA Jr, Thunhorst RL, Johnson AK. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. *Am J Physiol* 2000; 279: R126-31.
54. Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am J Physiol*. 1996; 270: R162-8.
55. Menani JV, Colombari DSA, Beltz TG, Thunhorst RL, Johnson AK. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain. Res.* 1998; 801: 29–35.
56. Menani JV, De Luca Jr. LA, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol*. 1998; 274: R555–60.
57. Menani JV, Johnson AK. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. *Am J Physiol*. 1998; 275: R1431-7.

58. Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol.* 1995; 269: R1044–9.
59. Mori M, Tsushima H, Matsuda T. Antidiuretic effects of purinoceptor agonists injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of water-loaded, ethanol-anesthetized rats. *Neuropharmacology.* 1992; 31: 585-92.
60. Ohman LE, Johnson AK. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol.* 1986; 251: R504-9.
61. Oldfield BJ, McKinley, MJ. Circunventricular organs. In: Paxinos, G, editor. *The rat nervous system*, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1995. p. 391-403.
62. de Oliveira LB, De Luca Jr. LA, Menani JV. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. *Neuroscience.* 2008; 155: 350-8.
63. Paton JF, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH, Boscan P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol.* 2002; 543: 995-1005.
64. De Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am J Physiol.* 2004; 287: R1164-71.
65. De Paula PM, Machado BH. Antagonism of adenosine A(1) receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol.* 2001; 281: R2072-8.

66. De Paula PM, Sato MA, Menani JV, De Luca Jr. LA. Effects of central alpha-adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosci Lett.* 1996; 214: 155-8.
67. Paxinos G, Watson C. *The brain in stereotaxic coordinates.* New York: Academic Press, 1998.
68. Phillis JW, Scislo TJ, O'Leary DS. Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24: 738-42.
69. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-92.
70. Ralevic V, Thomas T, Burnstock G, Spyer KM. Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience.* 1999; 94: 867-78.
71. Ralevic V. P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81: 205-11.
72. Scislo TJ, Augustyniak RA, Barraco RA, Woodbury DJ, O'Leary DS. Activation of P2X-purinoceptors in the nucleus tractus solitarii elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. *J Auton Nerv Syst.* 1997; 62: 103-10.
73. Seguela P, Haghghi A, Soghomonian JJ, Cooper E. A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci.* 1996; 16: 448-55.

74. Shibuya I, Tanaka K, Hattori Y, Uezono Y, Harayama N, Noguchi J et al. Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *J Physiol.* 1999; 514: 351-67.
75. Spyer KM, Thomas T. Sensing arterial CO levels: a role for medullary P2X receptors. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81: 228-35.
76. Schulkin J. Sodium hunger: the search for a salty taste. Cambridge: Cambridge University Press. 1991.
77. Thunhorst RL, Johnson AK. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1994; 266: R458-65.
78. Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, et al. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 8063-7.
79. Weisinger RS, Denton DA, McKinley MJ, Muller AF, Tarjan E. Cerebrospinal fluid sodium concentration and salt appetite. *Brain Res.* 1985; 326: 95-105.
80. Wieraszko A, Ehrlich YH. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J Neurochem.* 1994; 63:1731-8.
81. Williams M. Purinergic receptors and central nervous system function. In: *Psychopharmacology: the third generation of progress.* New York: Raven. 1987; p. 289-301.
82. Xiang Z, Bo X, Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett.* 1998; 256: 105-8.

83. Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups. *J Comp Neurol* 2000; 427: 485-507.

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de Julho de 2010.

MIGUEL FURTADO MENEZES