

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Mariana Gonçalves Penasso

**CARACTERIZAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES DO NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA INGESTÃO DE
ÁGUA E SÓDIO**

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**CARACTERIZAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES DO NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA INGESTÃO DE
ÁGUA E SÓDIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Aluna: Mariana Gonçalves Penasso

Orientador: José Vanderlei Menani

Araraquara

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais e meu irmão, as pessoas mais importantes de minha vida. Meus pais, meus exemplos de caráter, honestidade, esforço e bondade. Meu irmão, um exemplo de alegria e ânimo que sempre foi muito importante nos momentos difíceis.

Dedico-o ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani que me orientou ao longo de toda minha iniciação científica.

Dedico-o também aos meus amigos. Amigos que estão longe, amigos de longa data e amigos que fiz ao longo de minha faculdade, amigos todos estes que contribuíram para eu ser quem sou e que não importa o tempo ou a distância, serão sempre importantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades que tenho tido em minha vida.

Aos meus pais e meu irmão por todo apoio, carinho, força e compreensão ao longo de toda minha graduação.

Ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani pela orientação, paciência e ensinamentos ao longo de toda minha iniciação científica.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, em especial Beatriz F. Menes, Carolina G. Pavan, Laís Z. Ferrari, Lívia Molina, Marianna K. Gouveia e Mariane D. Carradore, amigas com quem dividi muitos momentos e que me ensinaram muito ao longo de nossa convivência.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Fisiologia, que contribuíram para a realização deste trabalho e que estiveram sempre dispostos a me ajudar.

SUMÁRIO

1. RESUMO	6
2. LISTA DE FIGURAS	9
3. LISTA DE TABELAS	11
4. LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
5. INTRODUÇÃO.....	13
6. OBJETIVOS.....	17
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
7.1. Animais	18
7.2. Cirurgia.....	18
7.3. Injeção de drogas no encéfalo	19
7.4. Drogas utilizadas	19
7.5. Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M.....	20
7.6. Histologia encefálica para localização dos pontos das injeções.....	20
7.7. Apresentação dos resultados e estatística.....	21
8. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	22
8.1. Experimento 1. <i>Efeitos das injeções bilaterais de BRL 52537 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.</i>	22
8.2. Experimento 2. <i>Efeitos das injeções bilaterais de SNC 80 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.</i>	22
9. RESULTADOS	23

9.1. Experimento 1. <i>Efeitos das injeções bilaterais de BRL 52537 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.</i>	23
9.2. Experimento 2. <i>Efeitos das injeções bilaterais de SNC 80 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.</i>	27
9.3. <i>Efeitos das injeções bilaterais de BRL 52537 fora do NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.</i>	32
9.4. <i>Efeitos das injeções bilaterais de SNC 80 fora do NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.</i>	34
10. HISTOLOGIA	36
11. DISCUSSÃO	37
12. CONCLUSÃO	41
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. RESUMO

Nosso organismo constantemente perde água e eletrólitos para o meio ambiente, principalmente pela excreção urinária. Porém, a osmolaridade e o volume de líquidos do organismo devem permanecer dentro de uma pequena faixa de variação para que nossas células funcionem perfeitamente e haja manutenção da pressão arterial.

A regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos corporais exige que a entrada de água e eletrólitos seja igual à perda pelo corpo e, para tanto, a regulação envolve a ação integrada dos rins e do comportamento de ingestão de água e sódio que é o principal íon extracelular.

A ingestão de água e sódio é regulada por mecanismos centrais excitatórios e inibitórios. Os mecanismos excitatórios que desencadeiam a ingestão de água e sódio são ativados principalmente pelo peptídeo angiotensina II (ANG II), cuja produção apresenta-se aumentada em situações de hipovolemia e hipotensão. Por outro lado, destacam-se importantes mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio descobertos recentemente no núcleo parabraquial lateral (NPBL).

O NPBL é uma estrutura pontina que recebe projeções aferentes da área postrema (AP) e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) e que faz conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico. Estudos prévios mostraram que injeções bilaterais do agonista opióide inespecífico β -endorfina no NPBL induziram ingestão de água e sódio em ratos saciados e aumentaram a ingestão de água e sódio induzida pelo tratamento com o diurético furosemida (FURO) combinado com baixas doses do bloqueador da enzima conversora de angiotensina captopril (CAP) injetados subcutaneamente (sc). Porém sabe-se que existem três subtipos de receptores opióides (μ , δ e κ) mas não está estabelecido qual ou quais participam do controle da ingestão de água e sódio,

por isso é interessante testar os efeitos de injeções de agonistas específicos destes receptores no NPBL. Portanto no presente estudo foi investigado o envolvimento dos receptores δ e κ opióides do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com o diurético furosemida combinado com o bloqueio da enzima conversora de angiotensina perifericamente com doses baixas de captopril subcutaneamente (sc) em ratos.

Para isso foram utilizados ratos com cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL que receberam injeções bilaterais no NPBL de agonistas específicos de receptores δ e κ opióides SNC 80 e BRL 52537, respectivamente, nas doses de 0,5, 1, 2 e 4 nmol/0,2 μ l.

As injeções bilaterais de BRL 52537 na dose 0,5 nmol/0,2 μ l no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($10,2 \pm 2,1$ ml/2 h, vs. veículo: $9,4 \pm 1,2$ ml/2 h), porém as injeções bilaterais de BRL 52537 nas doses 1 e 4 nmol/0,2 μ l no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M ($14,5 \pm 1,5$ e $14,4 \pm 3,2$ ml/2 h, respectivamente, vs. veículo: $7,4 \pm 0,9$ ml/2 h). Injeções bilaterais de BRL nas doses 0,5, 1 e 4 nmol/0,2 μ l no NPBL não modificaram a ingestão de água ($15,5 \pm 2,4$; $17,4 \pm 2,0$ e $17,3 \pm 2,1$ ml/2 h, respectivamente, vs. veículo: $14,1 \pm 1,7$ ml/2 h).

As injeções bilaterais de SNC 80 nas doses 0,5 e 2 nmol/0,2 μ l no NPBL aumentaram a ingestão de água ($16,2 \pm 1,7$ e $17,0 \pm 2,3$ ml/2 h, respectivamente, vs. veículo: $12,2 \pm 1,4$ ml/2 h), porém SNC 80 nas doses 1 e 4 nmol/0,2 μ l no NPBL não modificaram a ingestão de água ($12,6 \pm 1,7$ e $16,9 \pm 2,7$ ml/2 h, respectivamente, vs. veículo: $12,2 \pm 1,4$ e $16,1 \pm 2,8$ ml/2 h, respectivamente). As injeções bilaterais de SNC 80 em todas as doses testadas 0,5, 1, 2 e 4 nmol/0,2 μ l no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($13,6 \pm 5,1$; $12,9 \pm 4,1$; $13,9 \pm 5,4$ e $12,3 \pm 2,2$ ml/2 h, respectivamente, vs. veículo: $9,8 \pm 2,0$ ml/2 h).

Estes resultados sugerem que a ativação dos receptores κ opióides aumenta seletivamente a ingestão de sódio, enquanto que a ativação dos receptores δ opióides parece

aumentar seletivamente a ingestão de água induzida pelo tratamento com furosemida + captopril. Porém, os efeitos da ativação de receptores δ opióides na ingestão de água não foram consistentes, pois apenas algumas doses produziram efeito. Este aumento da ingestão de água e sódio pela ativação de receptores opióides δ e κ no NPBL provavelmente se deve a desativação dos mecanismos inibitórios do NBPL envolvidos no controle da ingestão de água e sódio.

2. LISTA DE FIGURAS

Figura I: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de BRL (0,5 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....24

Figura II: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de BRL (0,5 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....24

Figura III: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de BRL (1 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....25

Figura IV: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de BRL (1 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....25

Figura V: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de BRL (4 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....26

Figura VI: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilateral de BRL (4 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....26

Figura VII: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (0,5 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....28

Figura VIII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (0,5 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....28

Figura IX: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (1 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....29

Figura X: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (1 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....29

Figura XI: Ingestão cumulativa de NaCl em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (2 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....30

Figura XII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (2 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....30

Figura XIII: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (4 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....31

Figura XIV: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeção de furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC (4 nmol/0,2µl) ou veículo no NPBL.....31

3. LISTA DE TABELAS

Tabela I: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (0,5, 1 e 4 nmol/0,2µl) ou veículo fora do NPBL.....33

Tabela II: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (0,5, 1, 2 e 4 nmol/0,2 µl) ou veículo fora do NPBL.....35

4. LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II	angiotensina II
AP	área postrema
AV3V	região anteroventral do terceiro ventrículo
CAP	captopril
DOCA	desoxicorticosterona
FURO	furosemida
NaCl	cloreto de sódio
NPBL	núcleo parabraquial lateral
NTSm	porção medial do núcleo do trato solitário
OSF	órgão subfornical
sc	subcutânea
SNC	sistema nervoso central

5. INTRODUÇÃO

Constantemente o organismo perde água e eletrólitos, principalmente sódio, para o meio ambiente pela respiração, suor e predominantemente pela excreção urinária. Essa perda é agravada em casos de diarreia, vômitos, etc. Todavia, a osmolaridade e o volume dos líquidos do organismo devem permanecer dentro de uma pequena faixa de variação para que haja um perfeito funcionamento das células e manutenção da pressão arterial. A regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos corporais exige que a entrada de água e eletrólitos seja igual à perda pelo corpo e, para tanto, a regulação envolve a ação integrada dos rins e do comportamento de ingestão de água e sódio que é o principal íon extracelular.

Em certas situações em que a água e/ou sódio estão em falta no organismo, os rins sozinhos não são capazes de normalizar a volemia e/ou a osmolaridade e a rápida recuperação da normalidade só poderá ser obtida pela ingestão de água e de sódio a qual é regulada por mecanismos ativados em situações de hipovolemia ou alterações de osmolaridade. Nessas situações, receptores localizados em diversas partes do organismo ou hormônios produzidos sinalizam para algumas regiões específicas do cérebro, que uma vez ativadas, desencadeiam respostas renais e/ou o comportamento de busca pela água e sódio (Johnson e Edwards, 1990; Thunhorst e Johnson, 1994; Thunhorst e cols., 1994). Durante a desidratação, por exemplo, uma série de mecanismos ativados controlam as ingestões de água e de sódio. Alguns desses, como a produção de angiotensina II (ANG II) e a diminuição das descargas dos receptores cardiovasculares, ativam ou facilitam a ativação desses dois comportamentos. Por outro lado, aumento da osmolaridade sanguínea ou da concentração de sódio ativa apenas o comportamento de ingestão de água e inibe a ingestão de sódio (De Luca e Menani, 1997; De Luca e cols., 2004).

No sistema nervoso central (SNC), mecanismos excitatórios e inibitórios podem ser ativados para se controlar a ingestão de água e sódio. As influências excitatórias de áreas prosencefálicas do cérebro no equilíbrio hidroeletrólítico têm sido bem estudadas, enquanto que os mecanismos centrais inibitórios não são bem compreendidos e têm sido demonstrados tanto em áreas prosencefálicas quanto em áreas do tronco cerebral (Ferrari e cols., 1990; Johnson e Edwards, 1990; Ferrari e cols., 1991; Edwards e cols., 1993; Menani e Johnson, 1995; Menani e cols., 1996; De Paula e cols., 1996; De Luca Jr. e Menani, 1997; De Luca e cols., 2004).

Dentre as substâncias que ativam a ingestão de água e sódio, uma das principais é o peptídeo ANG II, cuja produção está aumentada em situações de hipovolemia e hipotensão. A ANG II atua tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona) como pela ação em algumas áreas do cérebro como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) e o órgão subfornical (OSF), que são as principais áreas do cérebro onde estão localizados os receptores para essa substância (Simpson e Routtenberg, 1973; Brody e Johnson, 1980; Mangiapane e Simpson, 1980). Além do OSF e região AV3V, outras áreas prosencefálicas, que embora não sejam áreas ricas em receptores da ANG II, como a área septal (AS), o hipotálamo lateral (HL) e a amígdala, também integram um circuito cerebral importante no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular (Negro-Villar e cols., 1967; Covian e cols., 1975; Schulkin e cols., 1989; Galaverna e cols., 1991; Luiz e cols., 1991; Colombari e col., 1994; Barbosa e cols., 1995; Colombari e cols., 1996).

Por outro lado, importantes mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio foram recentemente descobertos no núcleo parabraquial lateral (NPBL), (Ohman e Johnson, 1989; Edwards e Johnson 1991; Menani e cols., 1995; Ohman e Johnson, 1995; Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Menani e Johnson, 1998; De Gobbi e cols., 2000; Menani e cols., 2000). O NPBL é uma estrutura pontina que recebe projeções aferentes da área postrema (AP)

e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) e que faz conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico, como núcleos específicos do hipotálamo e amígdala (Ciriello e cols., 1984; Herbert e cols., 1990; Krukoff e cols., 1993; Jhamandas e cols., 1996). Assim, um papel importante do NPBL seria integrar as informações ascendentes do NTSm e AP que por sua vez poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

O papel inibitório do NPBL sobre a ingestão de água e sódio tem sido demonstrado em vários estudos. Lesões eletrolíticas ou químicas (ácido ibotênico) e injeção de lidocaína no NPBL aumentaram a ingestão de água induzida por injeção central ou periférica de ANG II, bem como por outros estímulos relacionados com a formação de ANG II, sugerindo um papel inibitório do NPBL sobre o controle da ingestão de água, (Ohman e Johnson, 1989; Edwards e cols., 1991; Menani e cols., 1995; Ohman e Johnson, 1995). A administração de antagonista de receptor serotoninérgico (metisergida) no NPBL também aumenta a ingestão de água e de solução hipertônica de cloreto de sódio em animais submetidos à depleção de sódio, tratamento com injeções subcutâneas do diurético furosemida + captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina, em baixas doses) e tratamento com deoxicorticosterona (DOCA - composto esteróide com propriedades semelhantes a aldosterona), enquanto que injeções bilaterais do agonista serotoninérgico DOI promove redução dessa ingestão (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e cols., 2000). Esses resultados sugerem a presença de um importante mecanismo serotoninérgico inibitório da ingestão de água e sódio no NPBL. Além do mecanismo serotoninérgico também já foi demonstrado no NPBL a existência de um mecanismo colecistocinérgico que também exerce um papel inibitório sobre a ingestão de água e sódio (Menani e Johnson, 1998).

Recentemente foi demonstrado que injeções bilaterais do agonista opióide inespecífico β -endorfina no NPBL induziu intensa ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e

normovolêmicos, um efeito que foi bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista opióide inespecífico naloxona (De Oliveira et al., 2008).

Os receptores opióides são classificados em subtipos μ , δ e κ . A β -endorfina, assim como a naloxona podem se ligar a qualquer um dos subtipos de receptores opióides. Assim, para saber qual subtipo ou subtipos de receptores opióides do NPBL estariam envolvidos com o controle da ingestão de água e sódio seria interessante testar os efeitos de agonistas e antagonistas de receptores opióides específicos injetados sozinhos ou combinados no NPBL sobre a ingestão de água e sódio em ratos.

No presente estudo investigamos o envolvimento dos receptores δ e κ opióides do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com o diurético furosemida combinado com o bloqueio da enzima conversora de angiotensina periféricamente com doses baixas de captopril subcutaneamente (sc) em ratos, um tratamento que aumenta a ingestão de água e NaCl 0,3 M por causar uma hipotensão e aumento da ANG II central. Para tanto foram testados os efeitos de injeções de agonistas específicos de receptores δ e κ opióides SNC 80 e BRL 52537, respectivamente no NPBL sobre a ingestão de água e sódio induzida pelo tratamento com o diurético furosemida combinado captopril sc.

6. OBJETIVO

Estudar o possível envolvimento dos receptores δ e κ opióides do NPBL no controle da ingestão de água e sódio induzida pelo tratamento com furosemida + captopril sc em ratos.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com pesos em torno de 300 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Fisiologia em gaiolas de aço inoxidável individuais, em salas climatizadas (24 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro 12-12 h, tendo disponível ração Biobase, água e NaCl 0,3 M *ad libitum*.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

7.2. Cirurgia

Para as cirurgias cerebrais, os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos e para se determinar os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável. Nesse ponto foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. As cânulas de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,5 mm e comprimento de 12 mm foram introduzidas no cérebro e fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica aderida a dois parafusos presos na calota craniana.

Foram implantadas cânulas bilateralmente no NPBL, orientadas de acordo com as seguintes coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 4,1 mm abaixo da dura-máter.

Após a cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,1 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato).

7.3. Injeção de drogas no encéfalo

As drogas dissolvidas em solvente adequado (propileno glicol/água 2:1, veículo) foram injetadas no NPBL utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A agulha injetora era 2,0 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção no NPBL foi de 0,2 µl bilateralmente.

7.4. Drogas utilizadas

BRL 52537 (0,5, 1 e 4 nmol/0,2 µl) e SNC 80 (0,5, 1, 2, ou 4 nmol/0,2 µl) adquiridos da Tocris, USA, foram injetados no NPBL. Estas drogas foram dissolvidas em propileno glicol/água 2:1 (veículo). O veículo foi injetado como controle.

Captopril (5 mg/kg de peso corporal) e furosemida (10 mg/kg de peso corporal) obtidos da Sigma Chem. Co., USA, foram injetados sc para induzir ingestão de água e sódio. Captopril foi dissolvido em salina estéril e furosemida foi dissolvido em salina alcalinizada (pH 9,5) com NaOH.

7.5. Medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M

A ingestão de água e de NaCl 0,3 M foi induzida pelo tratamento com o diurético furosemida (10 mg/kg de peso corporal) combinado com o inibidor da enzima conversora captopril (5 mg/kg de peso corporal) injetados sc. Após as injeções de furosemida + captopril, os ratos foram mantidos sem acesso a água e NaCl por uma hora antes de se iniciarem as medidas de ingestão de água e de NaCl 0,3 M. Quinze minutos antes do acesso a água e NaCl, os animais receberam injeções de veículo, SNC 80 ou BRL 52537 no NPBL. Para o registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M foram utilizados tubos graduados (divisão de 0,1 ml). A ingestão de água e sódio foi medida a cada 30 minutos durante 2 h.

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

7.6. Histologia encefálica para localização dos pontos das injeções

Terminados os experimentos, os ratos receberam injeções do corante azul de Evans 2% no NPBL no volume de 0,2 µl, foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml), seguida de solução de formalina 10% (50 ml). A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos foram montados em lâmina e analisados para se localizar os pontos das injeções centrais.

7.7. Apresentação dos resultados e estatística

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

8. EXPERIMENTOS REALIZADOS

8.1. Experimento 1. *Efeitos das injeções bilaterais de BRL 52537 no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.*

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi estudada em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL tratados com furosemida + captopril sc. Os ratos receberam injeções de veículo (propilenoglicol) ou BRL 52537 (0,5, 1 ou 4 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL 45 minutos após as injeções de furosemida + captopril. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 2 h.

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento no NPBL. A seqüência de tratamentos foi aleatória e no final dos experimentos todos os animais do grupo receberam os mesmos tratamentos no NPBL.

8.2. Experimento 2. *Efeitos das injeções bilaterais de SNC 80 no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.*

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi estudada em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL tratados com furosemida + captopril sc. Os ratos receberam injeções de veículo (propilenoglicol) ou SNC 80 (0,5, 1, 2, ou 4 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL 45 min após as injeções de furosemida + captopril. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 2 h.

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento no NPBL. A seqüência de tratamentos foi aleatória e no final dos experimentos todos os animais do grupo receberam os mesmos tratamentos no NPBL.

9. RESULTADOS

9.1. Experimento 1. *Efeitos das injeções bilaterais de BRL 52537 no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.*

Injeções bilaterais de BRL 52537 (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($10,2 \pm 2,1$ ml/2 h, vs. veículo: $9,4 \pm 1,2$ mL/2 h, [F(1,5) = 0,17; $p < 0,05$] e de água ($15,5 \pm 2,4$ ml/2 h, vs. veículo: $13,4 \pm 2,0$ ml/2 h, [F(1,5) = 1,06 $p < 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras I e II).

As injeções bilaterais de BRL 52537 (1 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M ($14,5 \pm 1,5$ ml/2 h, vs. veículo: $7,4 \pm 0,9$ ml/2 h, [F(1,15) = 13,74; $p < 0,05$], mas não alteraram a ingestão de água ($17,4 \pm 2,0$ ml/2 h, vs. veículo: $13,9 \pm 1,2$ ml/2 h, [F(1,15) = 0,52; $p > 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras III e IV).

As injeções bilaterais de BRL 52537 (4 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram ingestão de NaCl 0,3 M ($14,4 \pm 3,2$ ml/2 h, vs. veículo: $6,1 \pm 1,1$ ml/2 h, [F(1,9) = 4,81; $p < 0,05$], mas não alteraram a ingestão de água ($17,3 \pm 2,1$ ml/2 h, vs. veículo: $14,1 \pm 1,7$ ml/2 h, [F(1,9) = 0,81; $p < 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras V e VI).

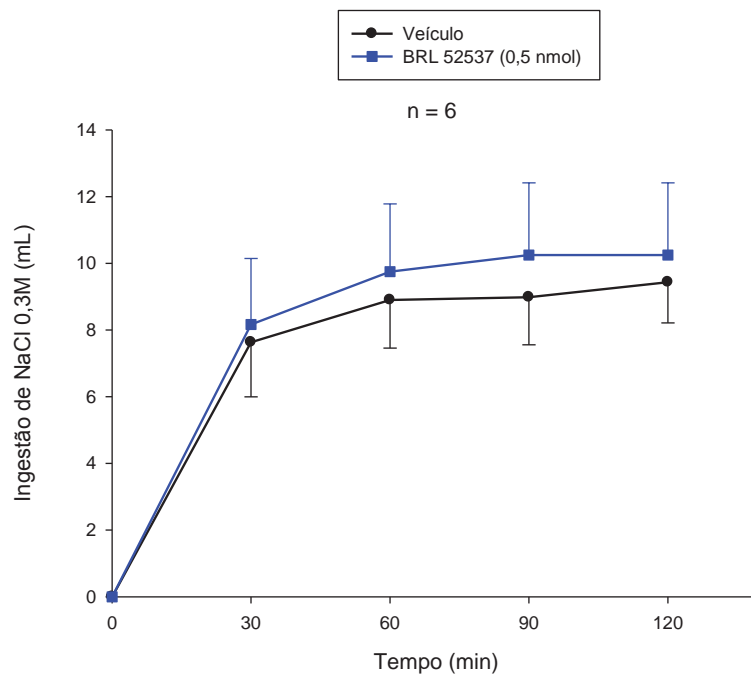


Figura I: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

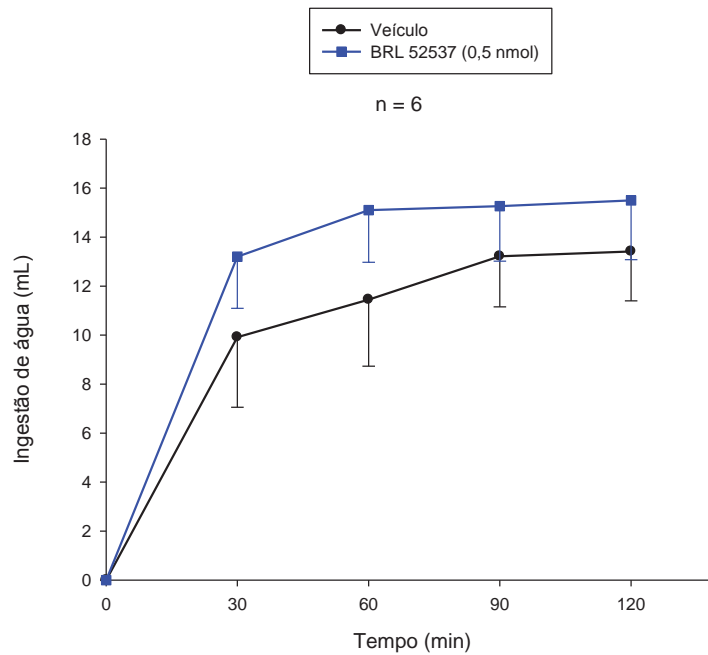


Figura II: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

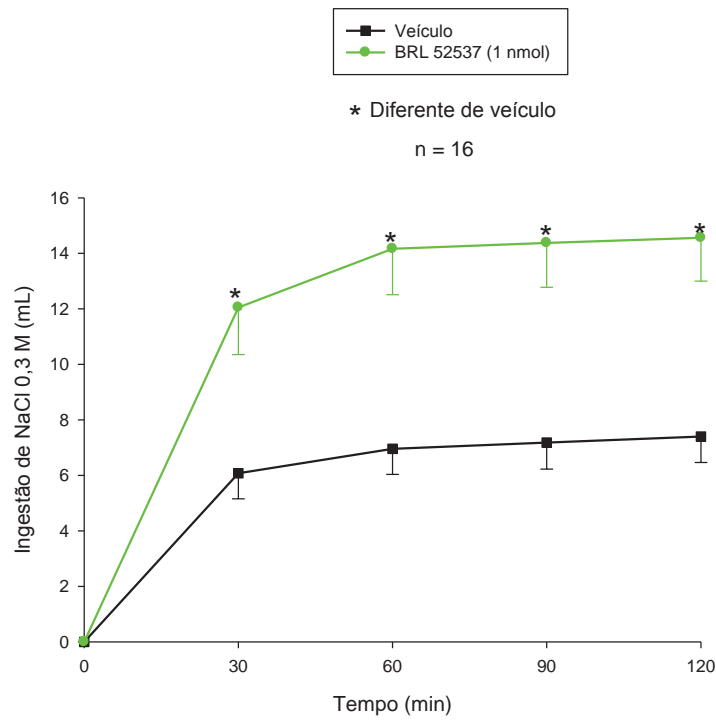


Figura III: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (1 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

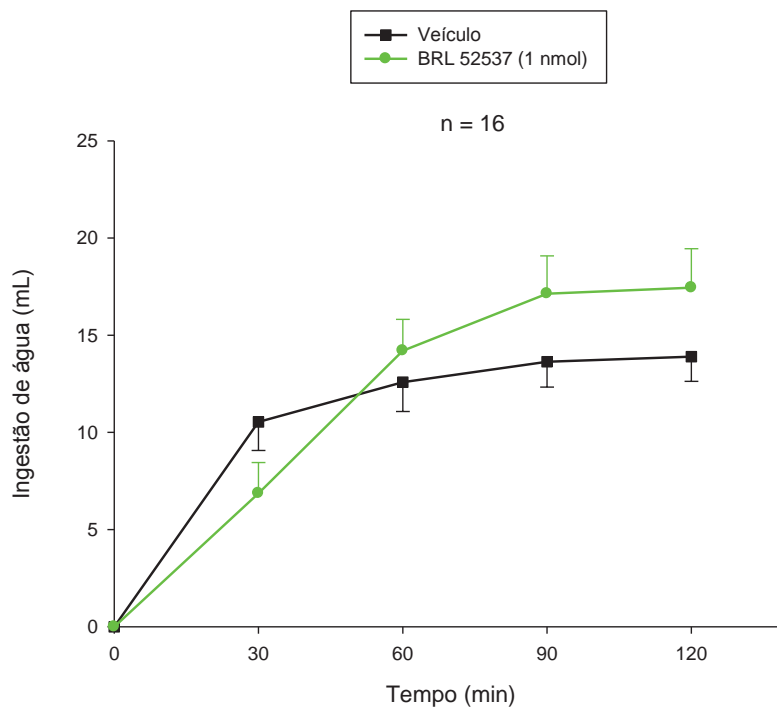


Figura IV: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (1 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

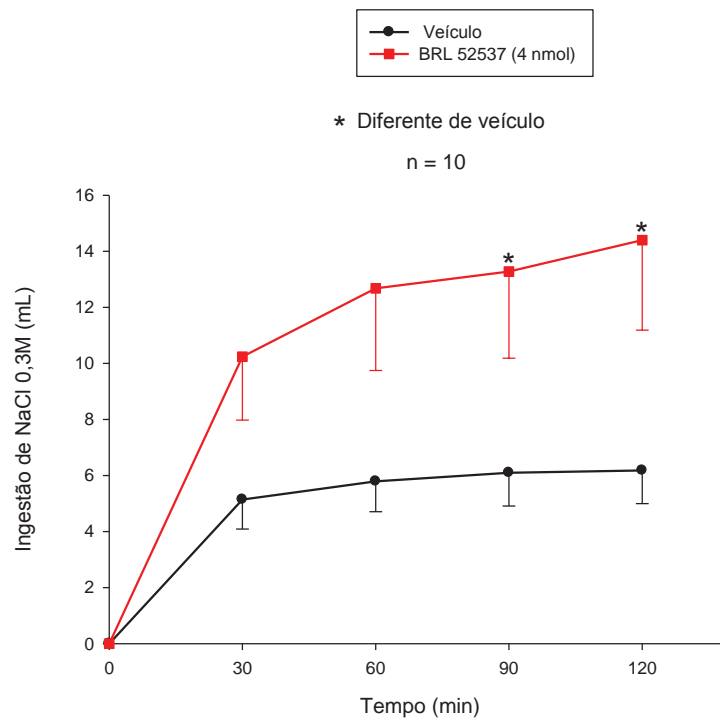


Figura V: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (4 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

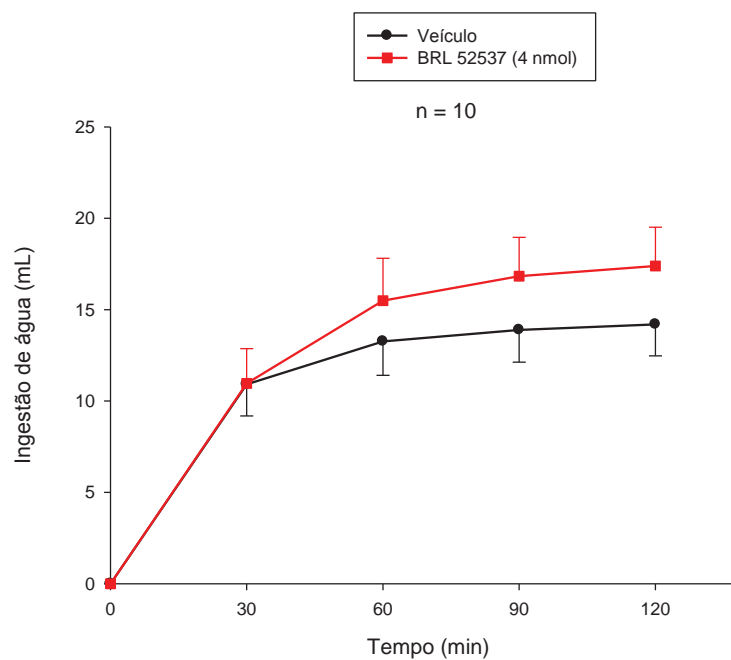


Figura VI: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (4 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

9.2. Experimento 2. Efeitos das injeções bilaterais de SNC 80 no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.

As injeções bilaterais de SNC 80 (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($13,6 \pm 5,1$ ml/2 h, vs. veículo: $9,8 \pm 2,0$ ml/2 h, [F(1,4)= 0,98; $p > 0,05$], mas aumentaram a ingestão de água ($16,2 \pm 1,7$ ml/2 h, vs. veículo: $12,2 \pm 1,4$ ml/2 h, [F(1,4) = 9,12; $p < 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras VII e VIII).

As injeções bilaterais de SNC 80 (1 nmol/0,2 µl) não alteraram a ingestão de água ($12,6 \pm 1,7$ ml/2 h vs. veículo $12,2 \pm 1,4$ ml/2 h, [F (1,4) = 0,051; $p > 0,05$] e de NaCl 0,3 M ($12,9 \pm 4,1$ ml/2 h vs. veículo $9,8 \pm 2,0$ ml/2 h, [F(1,4) =0,61; $p > 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras IX e X).

As injeções bilaterais de SNC 80 (2 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de água ($17,0 \pm 2,3$ ml/2 h, vs. veículo: $12,2 \pm 1,4$ ml/2 h, [F(1,4) = 10,83; $p < 0,05$] mas não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($13,9 \pm 5,4$ ml/2 h, vs. veículo: $9,8 \pm 2,0$ ml/2h, [F(1,4) = 0,91; $p > 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras XI e XII).

As injeções bilaterais de SNC 80 (4 nmol/0,2 µL) não alteraram a ingestão de água ($16,9 \pm 2,7$ ml/2 h vs. veículo $16,1 \pm 2,8$ ml/2 h, [F(1,5) = 0,38, $p > 0,05$] e de NaCl 0,3 M ($12,3 \pm 2,2$ ml/2 h vs. veículo $12,5 \pm 2,8$ ml/2 h, [F(1,5) = 0,008; $p > 0,05$] induzidas por FURO+CAP sc (Figuras XIII e XIV).

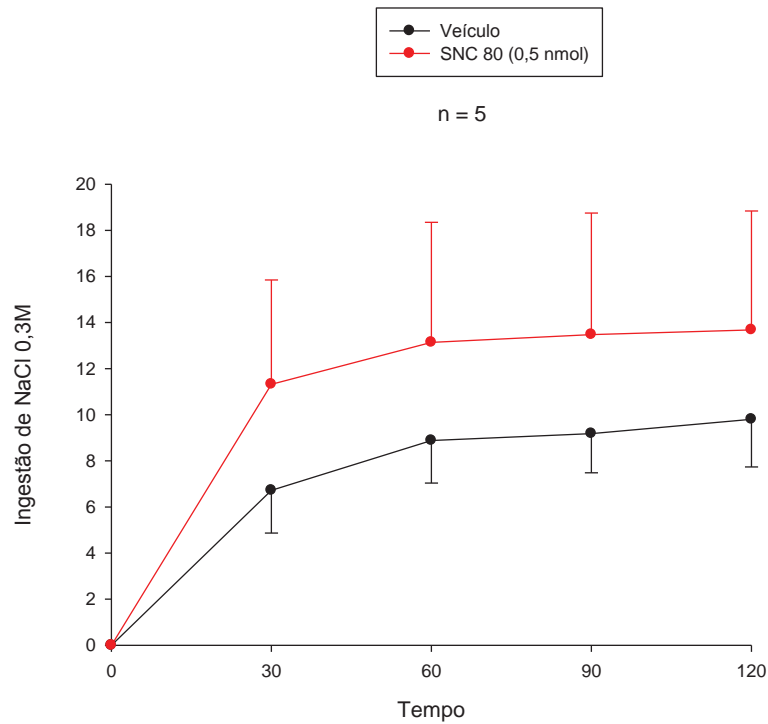


Figura VII: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

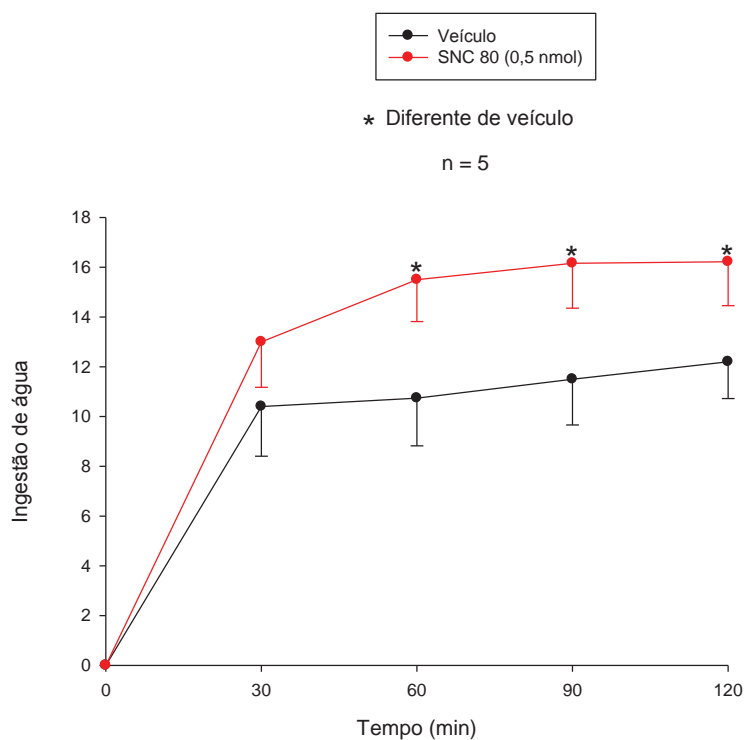


Figura VIII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

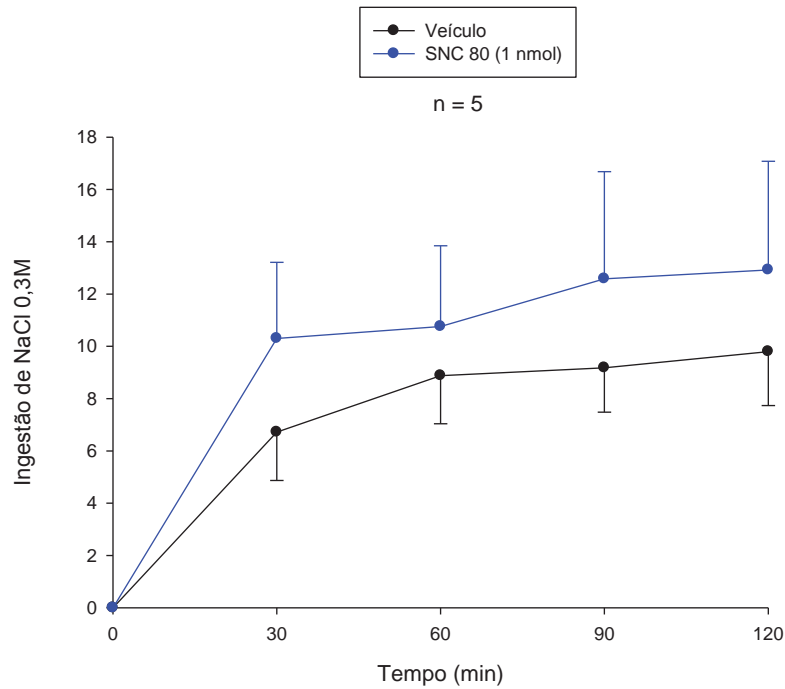


Figura IX: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (1 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

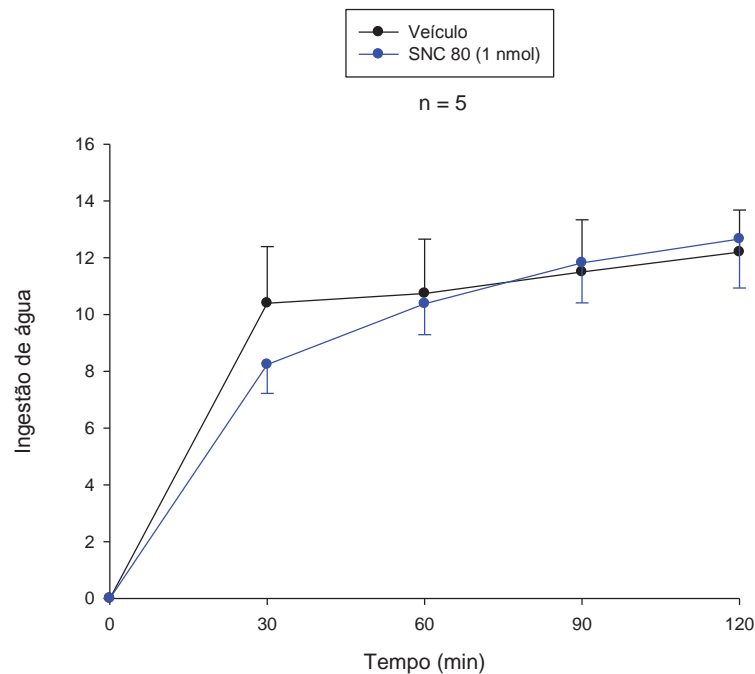


Figura X: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (1 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

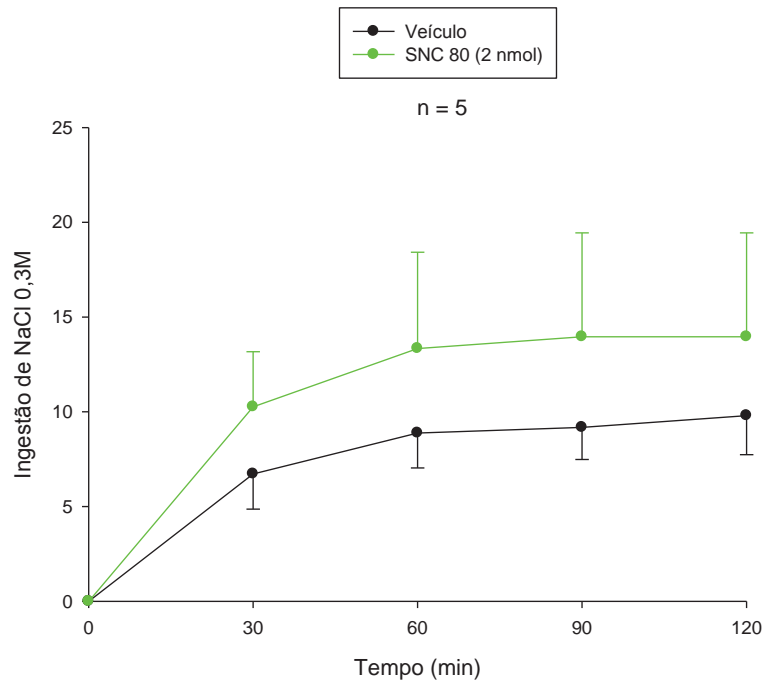


Figura XI: Ingestão cumulativa de NaCl em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (2 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

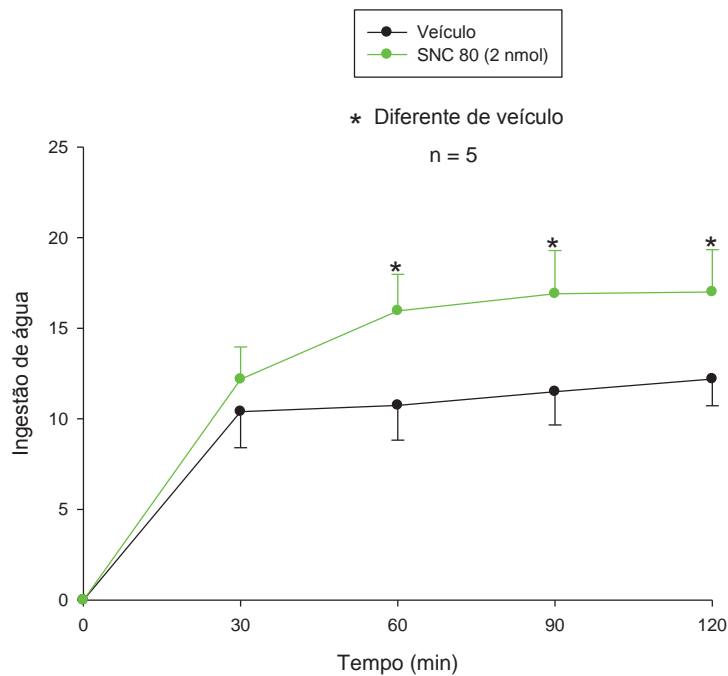


Figura XII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (2 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

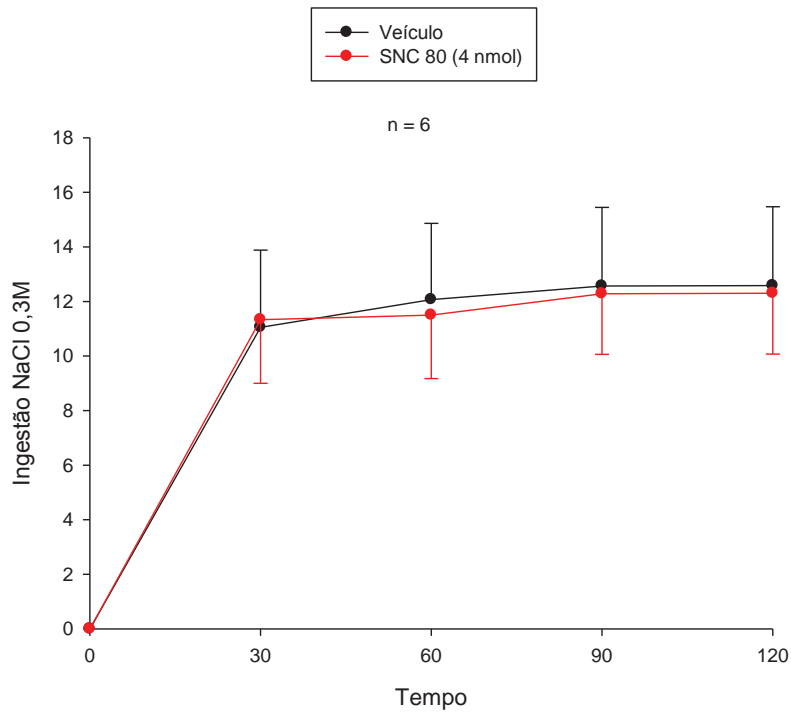


Figura XIII: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3M em ratos tratados com furosemda + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (4 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

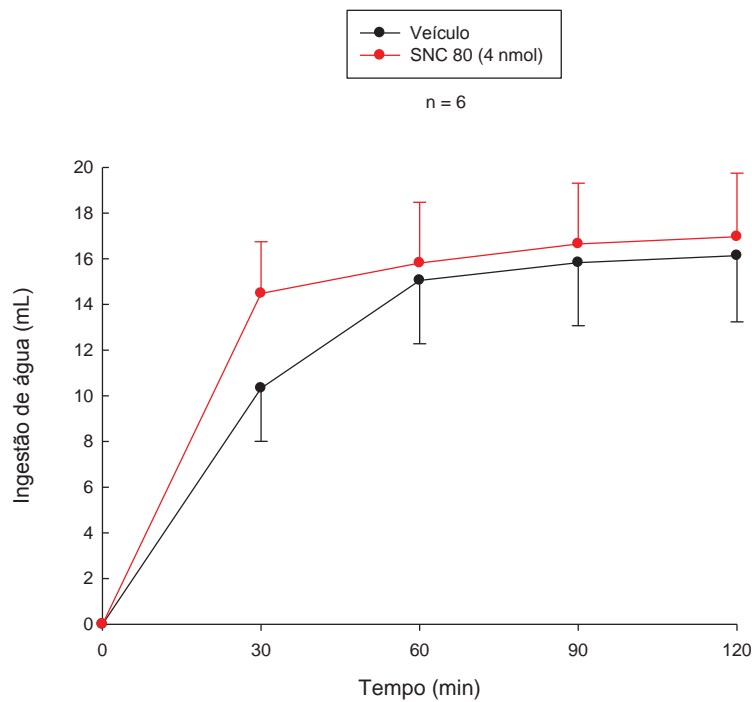


Figura XIV: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemda + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (4 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Os resultados estão expressos como média + EPM.

9.3. Efeitos das injeções bilaterais de BRL 52537 fora do NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com furosemida + captopril sc.

As injeções bilaterais de BRL 52537 (0,5 nmol/0,2 µl) fora do NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($5,2 \pm 1,6$ ml/2 h, vs. veículo: $3,8 \pm 0,9$ ml/2 h, [F(1,9) = 0,89 ; $p < 0,05$] e de água ($10,4 \pm 1,0$ ml/2 h, vs. veículo: $9,3 \pm 0,6$ ml/2 h, [F(1,9) = 1,56 $p > 0,05$] (Tabela I).

As injeções bilaterais de BRL 52537 (1 nmol/0,2 µl) fora do NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M apenas no tempo 120 min ($6,5 \pm 1,0$ ml/2 h, vs. veículo: $3,8 \pm 0,9$ ml/2 h, [F(1,9) = 4,9 ; $p < 0,05$] e alteraram a ingestão de água ($10,7 \pm 0,6$ ml/2 h, vs. veículo: $9,3 \pm 0,6$ ml/2 h, [F(1,9) = 7,53 ; $p < 0,05$] (Tabela I).

As injeções bilaterais de BRL 52537 (4 nmol/0,2 µl) fora do NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($8,3 \pm 1,3$ ml/2 h, vs. veículo: $6,2 \pm 1,1$ ml/2 h, [F(1,6) = 3,0 ; $p < 0,05$] e de água ($9,7 \pm 0,8$ ml/2 h, vs. veículo: $10,5 \pm 0,8$ ml/2 h, [F(1,6) = 2,54 ; $p > 0,05$] (Tabela I).

Tabela I: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de BRL 52537 (0,5, 1 e 4 nmol/0,2µl) ou veículo fora do NPBL.

	Água (ml/2h)	NaCl 0,3 M (ml/2h)
BRL 52537 - 0,5 nmol/0,2 µl (n = 10)	10,4 ± 1,0	5,2 ± 1,6
Veículo (n = 10)	9,3 ± 0,6	3,8 ± 0,9
BRL 52537 - 1 nmol/0,2 µl (n = 10)	10,7 ± 0,6 *	6,5 ± 1,0 *
Veículo (n = 10)	9,3 ± 0,6	3,8 ± 0,9
BRL 52537 - 4 nmol/0,2 µl (n = 7)	9,7 ± 0,8	8,3 ± 1,3
Veículo (n = 7)	10,5 ± 0,8	6,2 ± 1,1

Os resultados estão representados pela média ± EPM.

* Diferente de veículo.

9.4. Efeitos das injeções bilaterais de SNC 80 fora do NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento de furosemida + captopril sc.

As injeções bilaterais de SNC 80 (0,5 nmol/0,2 µl) fora do NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($6,1 \pm 1,9$ ml/2 h, vs. veículo: $3,7 \pm 0,7$ ml/2 h, [F(1,8) = 1,75 ; p < 0,05] e de água ($11,2 \pm 2,5$ ml/2 h, vs. veículo: $6,4 \pm 1,2$ ml/2 h, [F(1,8) = 3,92 ; p < 0,05] (Tabela II).

As injeções bilaterais de SNC 80 fora do NPBL (1 nmol/0,2 µl) não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($5,5 \pm 1,7$ ml/2 h vs. veículo $3,7 \pm 0,7$ ml/2 h, [F(1,8) = 0,7; p < 0,05] e de água ($8,1 \pm 1,3$ ml/2 h vs. veículo $6,4 \pm 1,2$ ml/2 h, [F (1,8) = 0,27 ; p < 0,05] (Tabela II).

As injeções bilaterais de SNC 80 fora do NPBL (2 nmol/0,2 µl) não aumentaram a ingestão de água ($12,0 \pm 1,8$ ml/2 h, vs. veículo: $14,4 \pm 1,8$ ml/2 h, [F(1,6) = 1,9; p < 0,05] e não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M ($7,7 \pm 1,5$ ml/2 h, vs. veículo: $6,7 \pm 1,9$ ml/2h, [F(1,6) = 0,38; p < 0,05] (Tabela II).

As injeções bilaterais de SNC 80 fora do NPBL (4 nmol/0,2 µl) não alteraram a ingestão de água ($15,9 \pm 1,9$ ml/2 h vs. veículo $14,4 \pm 1,8$ ml/2 h, [F(1,6) = 1,20, p < 0,05] e de NaCl 0,3 M ($10,1 \pm 1,7$ ml/2 h vs. veículo $6,7 \pm 1,9$ ml/2 h, [F(1,6) = 3,72 ; p < 0,05] (Tabela II).

Tabela II: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de SNC 80 (0,5, 1, 2 e 4 nmol/0,2 μ l) ou veículo fora do NPBL.

	Água (ml/2h)	NaCl 0,3 M (ml/2h)
SNC 80 - 0,5 nmol/0,2 μ l (n = 9)	11,2 \pm 2,5	6,1 \pm 1,9
Veículo (n = 9)	6,4 \pm 1,2	3,7 \pm 0,7
SNC 80 - 1 nmol/0,2 μ l (n = 9)	8,1 \pm 1,3	5,4 \pm 1,6
Veículo (n = 9)	6,4 \pm 1,2	3,7 \pm 0,7
SNC 80 - 2 nmol/0,2 μ l (n = 7)	12,0 \pm 1,8	7,6 \pm 1,4
Veículo (n = 7)	14,3 \pm 1,8	6,7 \pm 1,9
SNC 80 - 4 nmol/0,2 μ l (n = 7)	15,9 \pm 1,8	10,1 \pm 1,7
Veículo (n = 7)	14,3 \pm 1,8	6,7 \pm 1,9

Os resultados estão representados pela média \pm EPM.

10. HISTOLOGIA

A fotomicrografia abaixo representa um corte transversal de encéfalo, no qual os pontos das injeções (indicados pelas setas) estão marcados com corante azul de Evans. O NPBL é uma estrutura pontina localizada dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior (p.c.s.), indicado pelos círculos tracejados.

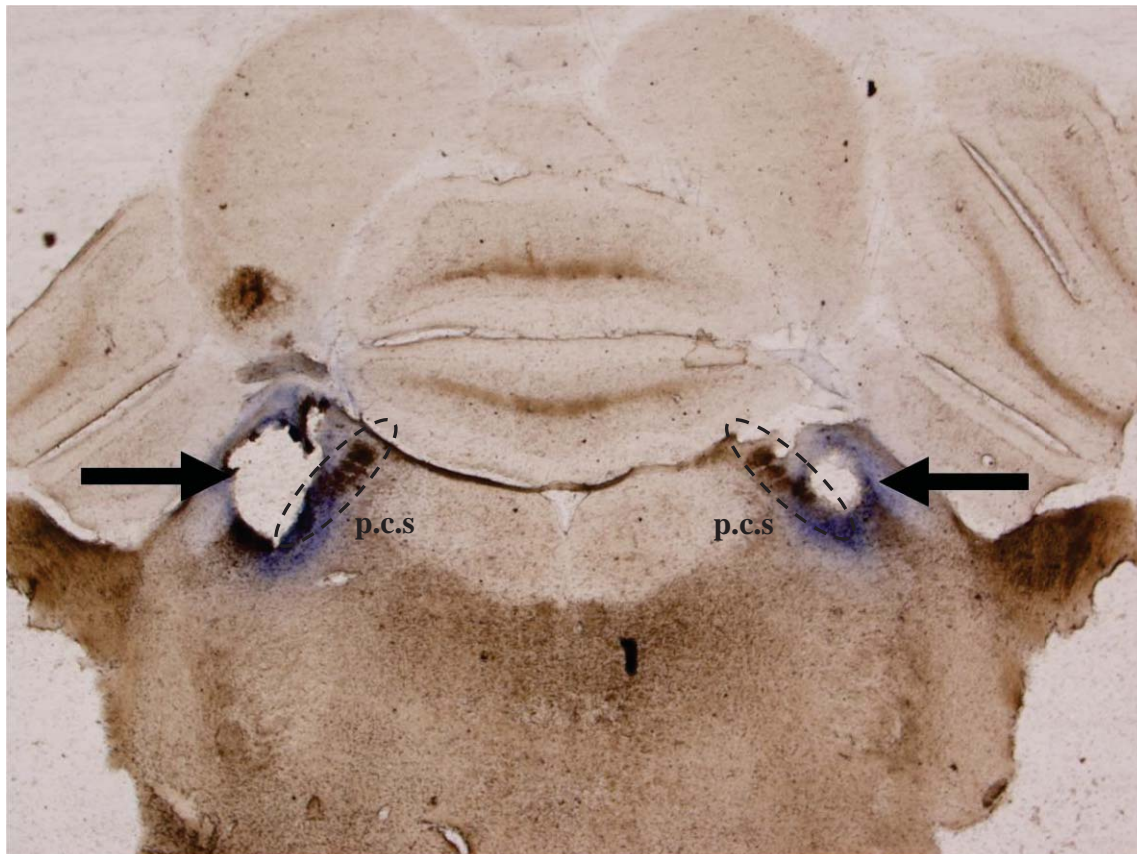


Figura XV: Fotomicrografia representativa mostrando os sítios de injeções no NPBL (setas).

11. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a ativação de receptores opióides do tipo κ pelas injeções bilaterais do agonista específico BRL 52537 (1 ou 4 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentou a ingestão de sódio sem modificações da ingestão de água, enquanto que a ativação dos receptores opióides do tipo δ pelas injeções agonista específico SNC 80 (0,5 ou 2 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentou a ingestão de água, sem modificações na ingestão de NaCl 0,3 M. Os resultados sugerem que a ativação de receptores opióides do tipo κ no NPBL facilita especificamente a ingestão de sódio, enquanto que a ativação dos receptores opióides do tipo δ no NPBL parece facilitar seletivamente a ingestão de água induzida pelo tratamento com furosemida + captopril. Porém, no caso do aumento de ingestão de água pelas injeções de SNC 80 no NPBL é preciso considerar que os efeitos não foram consistentes, pois SNC 80 nas doses de 0,5 e 2 nmol aumentaram a ingestão de água, enquanto que as doses de 1 e 4 nmol de SNC 80 injetadas no NPBL não modificaram a ingestão de água.

O sistema opióide endógeno está envolvido em uma grande variedade de funções no organismo sendo encontrado em diversos sistemas neurais em diferentes regiões do cérebro, especialmente em áreas relacionadas com o comportamento ingestivo e controle cardiovascular e endócrino (Bodnar, 2009; Le Merrer e cols., 2009). A participação do sistema opioidérgico central no controle da ingestão de água e sódio é bastante complexo com ambos os efeitos estimulatórios e inibitórios sendo observados simultaneamente dependendo da localização anatômica, do tipo de receptor opióide envolvido e as doses do agente opioidérgico utilizado.

O antagonista opióide naloxone quando administrado tanto sistemicamente quanto no sistema nervoso central, reduz a ingestão de salina hipertônica, hipotônica e isotônica (Cooper e Gilbert, 1984; Cooper e Gilbert, 1986; Gosnell e Majchrzak, 1990;

Gosnell e Majchrzak, 1990). Além disso, em experimentos anteriores em que foram injetados centralmente antagonistas de receptor μ e κ em animais privados de água ocorreu uma diminuição na ingestão da mesma quando simultaneamente foram oferecidas soluções salinas (NaCl 0,6% e 1,7%). Essa resposta não foi observada injetando-se antagonista específico de receptor opióide δ (Bodnar e cols., 1995). Por outro lado, injeções de agonistas de receptores opióides μ , κ e δ no sistema cerebroventricular e núcleo parabraquial em animais que não passaram por privação hídrica, promoveram um aumento na ingestão de salina (Gosnell e Majchrzak, 1990; Gosnell e Majchrzak, 1990; De Oliveira, 2008).

Estudos anteriores demonstraram que a ativação de receptores opióides do NPBL com o agonista inespecífico β -endorfina induziu uma intensa ingestão de sódio hipertônico em ratos saciados e normohidratados. Além disso, esses animais apresentaram uma maior ingestão de água quando a solução de NaCl 0,3 M estava simultaneamente disponível, sugerindo que a ingestão de água fosse então consequência do aumento da osmolaridade plasmática em virtude da ingestão excessiva de solução hipertônica de NaCl. Por outro lado, injeções bilaterais no NPBL do antagonista opióide inespecífico naloxone aboliram a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelas injeções de β -endorfina. (De Oliveira e cols., 2008). A β -endorfina de maneira similar a ativação gabaérgica no NPBL, pode inibir a atividade neural nessa região reduzindo ou bloqueando os mecanismos inibitórios e deste modo promove a ingestão de sódio.

Diferentes neurotransmissores e receptores do NPBL estão relacionados com os mecanismos inibitórios dessa região cerebral. (Menani e cols., 1996; Xu e cols., 1997; Menani e Johnson, 1998; De Castro e Silva e cols., 2006). Entre os neurotransmissores envolvidos com o controle da ingestão de água e sódio no NPBL existem aqueles que aumentam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL como a serotonina, colecistocinina (CCK), glutamato, fator liberador de corticotrofina (CRF) e outros como GABA, noradrenalina, trifosfato de

adenosina (ATP) que à semelhança dos opióides reduzem ou bloqueiam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL (Colombari e cols., 1996; Menani e cols., 1996; Xu e cols., 1997; Menani e Johnson, 1998; Andrade e cols., 2004; De Castro e Silva e cols., 2006; Callera e cols., 2002; Callera e cols., 2005; De Oliveira e cols., 2008). Os receptores opióides normalmente encontram-se localizados pré-sinápticamente e a ativação dos mesmos poderia reduzir a liberação de neurotransmissores que aumentam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL, ou seja, a ativação dos receptores opióides no NPBL poderia inibir a liberação de serotonina, CCK, glutamato e/ou CRF. Porém, não se descarta também uma possível ação pós-sináptica dos opióides inibindo diretamente os mesmos neurônios do NPBL que seriam ativados pela serotonina, CCK, glutamato e/ou CRF.

Resultados anteriores de nosso laboratório já haviam mostrado que a ativação de receptores μ opióides do NBPL aumenta tanto a ingestão de água como a ingestão de sódio induzida pelo tratamento com furosemida + captopril (Pavan et al., 2012). Comparando-se os efeitos da ativação dos receptores μ opióides do NBPL com os presentes resultados obtidos com ativação dos receptores δ e κ do NPBL pode-se verificar que existem diferenças de efeitos na ingestão de água e sódio. A ativação dos receptores μ opióides do NBPL produz maior aumento da ingestão de sódio e água em comparação com a ativação dos receptores δ e κ do NPBL. Embora aparentemente a ativação dos receptores κ do NPBL facilite especificamente a ingestão de sódio induzida pelo tratamento com furosemida + captopril, é preciso levar em conta que o aumento da ingestão de sódio foi muito menor neste caso do que quando se ativou os receptores μ opióides do NBPL. Como os ratos simultaneamente ingerem água e NaCl hipertônico, o aumento da ingestão de água pode ser uma consequência do efeito osmótico produzido pela ingestão de grandes quantidades de solução hipertônica. Assim, pode ser que a ativação dos receptores μ opióides do NBPL também aumentem especificamente a ingestão de sódio e que o aumento da ingestão de água seja uma

consequência da intensa ingestão de solução hipertônica de NaCl. Estudos nos quais seja testada apenas a ingestão de água durante a ativação dos receptores μ opióides do NPBL permitirão se esclarecer esta dúvida. Por outro lado, como a ativação dos receptores κ do NPBL produz um menor aumento da ingestão de sódio, é possível que o menor efeito osmótico não fosse suficiente para um produzir um aumento significativo da ingestão de água. Os receptores δ do NPBL claramente não estão envolvidos com controle da ingestão de sódio, mas parecem ter um efeito facilitador da ingestão de água. Porém, como os efeitos das injeções de SNC 80 no NPBL na ingestão de água não foram consistentes, também neste caso seriam interessantes mais estudos nos quais fosse testada apenas a ingestão de água durante a ativação dos receptores δ opióides do NPBL. É importante considerar também que os efeitos da ativação dos receptores δ e κ do NPBL na ingestão de água e sódio, respectivamente, precisam ser confirmados com reversão destes efeitos pelo tratamento prévio com antagonistas específicos dos respectivos receptores.

12. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a ativação de receptores opióides δ e κ no NPBL aumenta seletivamente a ingestão de água e sódio, respectivamente, provavelmente devido à desativação dos mecanismos inibitórios do NBPL envolvidos no controle da ingestão de água e sódio.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. A. F.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V. Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**. 129: 25-34, 2004.

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

BODNAR, R. J.; GLASS, M. J.; KOCH, J. E. Analysis of central opioid receptor subtype antagonism of hypotonic and hypertonic saline intake in water-deprived rats. **Brain Res. Bull.** 36: 293-300, 1995.

BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior. **Peptides** 2010. 31: 325-59, 2009.

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

CALLERA, J. C.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR., L. A.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. Activation of GABA receptors in the lateral parabrachial nucleus induces

sodium intake in rats. **Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington, DC: Society for Neuroscience.** program no. 774.16, 2002.

CALLERA, J. C.; OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience.** 134(3):725-35, 2005.

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.** 322, 388–392, 1984.

COLOMBARI, D. S. A.; HAIBARA, A. S.; CAMARGO, L. A. A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; DE LUCA JR. L. A.; MENANI, J. V. Role of medial septal area on the cardiovascular fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. **Brain Res. Bullet.**, 33: 249-254, 1994.

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.** 271, R1470–R1476, 1996.

COOPER, S.J.; GILBERT, D. B. Naloxone suppresses fluid consumption in tests of choice between sodium chloride solutions and water intake in male and female water deprived rats. **Psychopharmacology.** 84: 362-7, 1984.

COVIAN, M. R.; ANTUNES RODRIGUES, J.; GENTIL, C. G.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A.; SILVA NETO, C. R. Central control of salt balance. In: **Neural integration of physiological mechanisms and behavior**, MOGENSON, G. S. E CALARESU, F. R. (eds) University of Toronto Press 267-282, 1975.

DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropinreleasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 290(4): R1136-R1141, 2006.

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

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

DE LUCA JR, L. A.; VIVAS, L.; MENANI, J. V. Controle Neuroendócrino da ingestão de água e sódio. In: RODRIGUES, J. A., MOREIRA, A. C., CASTRO, M.; ELIAS, L. L. K. (Eds.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**, 1ª. ed. Rio de Janeiro, p. 116-134, 2004.

DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA JR, L. A.; MENANI, J. V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience.** 155(2):350-358, 2008.

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

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

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

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

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

FITTS, D. A.; MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behavioral Neuroscience.** 103(4):865-872, 1989.

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

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

GASPARINI, S.; DE LUCA JR, L. A.; COLOMBARI, D. S.; DE PAULA, P. M.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Adrenergic mechanisms of the Kölliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience.** 164(2): 370–37, 2009.

GILBERT, D. B.; COOPER, S. J. Naloxone antagonizes the hyperdipsic effect of sulpiride in a salt-preference test in male and female rats. **Neuropharmacology.** 25: 743-7, 1986.

GOSNELL, B. A.; MAJCHRZAK, M. J. Effects of a selective mu opioid receptor agonist and naloxone on the intake of sodium chloride solutions. **Psychopharmacology.** 100: 66-71, 1990.

GOSNELL, B. A.; MAJCHRZAK, M. J.; KRAHN, D. D. Effects of preferential delta and kappa opioid receptor agonists on the intake of hypotonic saline. **Physiol. Behav.** 47: 601-3, 1990.

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

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.** 39, 115–126, 1996.

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

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.** 30, 163–172, 1993.

LE MERRER, J.; BECKER, J. A.; BEFORT, K.; KIEFFER, B. L. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiol. Rev.** 89: 1379-412, 2009.

LUIZ, A. C.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; RENZI, A.; DE LUCA JR, L. A.; MENANI, J. V. Pressor dipsogenic, natriuretic and kaliuretic responses to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area. **Neurosc. Lett.**, 123: 195-198, 1991.

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

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

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

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

MENANI, J. V.; DE LUCA JR. L. A.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am. J. Physiol.** 279, R126–R131, 2000.

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.** 270, R162–R168, 1996.

MENEZES, M. F., BARBOSA, S. P., DE ANDRADE, C. A., MENANI, J. V, DE PAULA, P. M. Purinergic pabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res.**1372: 49-58, 2011.

NEGRO VILLAR, A.; GENTIL, C. G.; COVIAN, M. R. Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in rats. **Physiol. Behav.**, 2: 167-170, 1967.

NORGREN, R.; KATSUKI, Y.; SATO, M. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. **Brain mechanisms of sensation**, 143–160. New York: Wiley, 1981.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am. J. Physiol.** 256: R264-R269, 1989.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake induced by right atrial stretch. **Brain Res.** 695:275-278, 1995.

PAVAN, C. G.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR. L. A.; DE PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S. A.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V. Envolvimento de receptores opioidérgicos μ do núcleo parabraquial lateral na ingestão de água e sódio em ratos. Apresentado em: XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2012, Araraquara, SP.

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

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

SIMPSON, J. B.; ROUETTENBERG, A. Subfornical organ: Site of drinking elicited by angiotensin. **Science**, 181:1172-1175, 1973.

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

THUNHORST, R. L.; LEWIS, S. J.; JOHNSON, A. K. Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite. **Am. J. Physiol.** 267: R1043-R1049, 1994.

XU, J.; WOODWORTH, C. H.; JOHNSON, A. K. Glutamate and the role of the lateral parabrachial nucleus in the control of water and salt intake in rats. **Soc. Neurosci. Abstr.** 23: 1348, 1997.