

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

**RODRIGO ANDERSON TOMEIO**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DO**  
**NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO NO CONTROLE DA**  
**INGESTÃO HIDRO-MINERAL**

**ARARAQUARA**

**2010**

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

**RODRIGO ANDERSON TOMEIO**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DO**  
**NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO NO CONTROLE DA**  
**INGESTÃO HIDRO-MINERAL**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Área de Fisiologia 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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Maria De Paula

**ARARAQUARA**

**2010**

## **DADOS CURRICULARES**

### **RODRIGO ANDERSON TOMEIO**

NASCIMENTO	21/01/1980 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	Pedro Aparecido Tomeo Sueli Aparecida T. Tomeo
1999/2002	Curso de Graduação em Educação Física Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
2003/2004	Curso de Pós-Graduação Lato sensu em Fisiologia do Exercício, na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.
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).

## **Agradecimentos**

*Agradeço especialmente a Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria De Paula, pela orientação, confiança e dedicação durante a realização deste trabalho.*

*A minha esposa Elaine, pela paciência, amor, carinho, palavras de incentivo e compreensão nos momentos em que estive ausente.*

*A Malú, pela alegria transbordante de todos os dias quando me encontrava.*

*Muito obrigado aos meus pais, Pedro e Sueli e a minha irmã Cristiane, pelo exemplo, carinho, respeito e amor que me fizeram seguir em frente. Obrigado por serem os pilares da minha vida.*

*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.*

*Aos membros da Banca Examinadora, Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade e Profa. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi, pelas excelentes sugestões que contribuíram muito para a versão final deste trabalho.*

*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.*

## Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos.....	6
Lista de figuras .....	8
Lista de tabelas .....	10
Resumo .....	101
Abstract.....	103
1 Introdução .....	105
2 Objetivos.....	215
3 Material e Métodos .....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guias de aço inoxidável dirigidas para o núcleo do trato solitário (NTS) .....	22
3.3 Injeções no NTS .....	23
3.4 Drogas e soluções utilizadas.....	23
3.5 Histologia .....	24
3.6 Apresentação dos resultados e análise estatística .....	25
4 Protocolos Experimentais .....	26
4.1 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP e suramin no NTS sobre a ingestão de sódio hipertônico (0,3 M) em ratos submetidos à depleção de sódio.....	26
4.2 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à privação hídrica por 24 h.....	26
4.3 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. ....	27
5 Resultados.....	29
5.1 Localização histológica das cânulas no NTS .....	29

5.2 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP e suramin no NTS sobre a ingestão de sódio hipertônico (0,3 M) em ratos submetidos à depleção de sódio.....	32
5.3 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à privação hídrica por 24 hs. ....	35
5.4 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. ....	38
5.5 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP e salina em áreas adjacentes (fora) ao NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.....	41
6 Discussão.....	43
7 Conclusão.....	48
8 Referências.....	489

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

**ANG II** – angiotensina II

**AP** – área postrema

**ATP** – adenosina 5'- trifosfato

**AV3V** – região anteroventral do terceiro ventrículo

**EPM** – erro padrão da média

**FURO** – furosemida

**g** – grama(s)

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

**h** – hora(s)

**icv** – intracerebroventricular

**ig** – intragástrica

**iv** – intravenosa

**kg** – quilograma

**LCR**– líquido céfalo-raquidiano

**mg** – miligrama(s)

**min** – minuto(s)

**NaCl** – cloreto de sódio

**NPBL** – núcleo parabraquial lateral

**NTS** – núcleo do trato solitário

**OCVs** – órgãos circumventriculares

**OVLT**– órgão vascular da lâmina terminal

**PPADS** – ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico

**PVN** – núcleo paraventricular do hipotálamo

**sc** – subcutânea

**SFO** – órgão subfornical

**SNC** – sistema nervoso central

**Suramin**– sal hexasódio do ácido 8,8'- [Carbonilbis [imino-3,1-phenilencarbonylimino (4-metil-3,1-phenilene)carbonilimino]] bis-1,3,5-naftaleno trisulfonic

**VP**– vasopressina

**VL** – ventrículo lateral

**5-HT** – serotonina

**$\alpha,\beta$ -metil ATP**– sal de lítio de  $\alpha,\beta$ -metileneadenosina 5'-trifosfato

**$\mu\text{g}$**  – micrograma(s)

**$\mu\text{l}$**  – microlitro(s)

**$\mu\text{m}$**  – micrometro(s)

**$\alpha$**  – alfa

**$\beta$**  – beta



## Lista de figuras

**FIGURA 1** - Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios das microinjeções bilaterais, indicados pelas setas, no NTS. CC = canal central, AP = área postrema.....30

**FIGURA 2** - Representação esquemática de uma sequencia de cortes transversais do tronco encefálico (adaptado de Paxinos e Watson, 1998) mostrando a extensão de espalhamento do corante azul de Evan após as injeções bilaterais no NTS.....31

**FIGURA 3** - (painel superior) Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% e (painel inferior) ingestão cumulativa de água induzida por 24 h de depleção de sódio [induzida pelo diurético furosemida (20 mg/kg do peso corporal, sc)] em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina; controle) no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.....33

**FIGURA 4** - (painel superior) Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% e (painel inferior) ingestão cumulativa de água induzida por 24 h de depleção de sódio [induzida pelo diurético furosemida (20 mg/kg do peso corporal, sc)] em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina; controle) no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.....34

**FIGURA 5** - Ingestão cumulativa de água induzida por privação hídrica de 24 horas em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina combinado com suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.....36

**FIGURA 6** - Ingestão cumulativa de água induzida por privação hídrica de 24 horas em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina combinado com PPADS: (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel A), (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel B), (3,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel C), (4,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel D) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.....37

**FIGURA 7** - Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de 2 ml de NaCl 12% em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina combinado com suramin (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais. \* diferente de salina + salina;  $p < 0,05$ .....39

**FIGURA 8** - Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de 2 ml de NaCl 12% em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina combinado com PPADS (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais. \* diferente de salina + salina;  $p < 0,05$ .....40

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1-</b> Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de 2 ml de NaCl 12% em ratos que receberam injeções bilaterais de $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1 $\mu$ l) ou salina em áreas adjacentes (fora) ao NTS Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM; n, número de animais.....	42
--	----

## Resumo

Tomeo RA. Participação dos receptores purinérgicos do núcleo do trato solitário no controle da ingestão hidro-mineral [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, 2010

Vários estudos demonstraram que o controle da ingestão hidro-mineral envolve diversos mediadores no sistema nervoso central. Entretanto a participação da neurotransmissão purinérgica no controle da ingestão de água e sódio ainda é pouco conhecida. Estudos imunohistoquímicos evidenciam a densa marcação de receptores purinérgicos em várias regiões envolvidas com o controle hidro-mineral, dentre elas o núcleo do trato solitário (NTS). O NTS possui mecanismos inibitórios envolvidos no controle da ingestão de sódio e água. Desta forma, os objetivos deste estudo foram estudar a participação dos receptores purinérgicos do NTS: 1) no controle da ingestão de água e sódio hipertônico (apetite ao sódio) em ratos com depleção de sódio (produzida pelo tratamento com diurético furosemida); 2) no controle da ingestão de água em ratos com privação hídrica de 24 horas (modelo de desidratação extra- e intracelular) e 3) no controle da ingestão de água em ratos com sobrecarga intragástrica de NaCl 12% (modelo de desidratação intracelular). Foram utilizados ratos Holtzman (280-320 g) com cânulas guias bilaterais implantadas no NTS. Injeções bilaterais de alfa-beta-metileno-ATP ( $\alpha,\beta$ -metil ATP, agonista purinérgico P2X, 1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou suramin (antagonista purinérgico não seletivo P2, 1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS não alteraram a ingestão de NaCl 1.8% induzida pela depleção de sódio ( $15,4 \pm 1,7$  ml/2 h vs salina  $19,7 \pm 1,7$  ml/2 h e  $18,9 \pm 2,7$  vs. salina  $22,7 \pm 2,3$  ml/2 h, respectivamente.). A ingestão de água induzida pela privação hídrica também não foi alterada pelo agonista purinérgico  $\alpha,\beta$ -metil ATP [1,0 ou 2,0 nmol/0,1  $\mu$ l ( $15,0 \pm 0,9$  vs. salina  $14,8 \pm 1,0$  ml/2 h e  $16,8 \pm 0,7$  vs. salina  $17,7 \pm 0,9$  ml/2 h, respectivamente)] ou pelos antagonistas purinérgicos suramin [1,0 nmol/0,1  $\mu$ l ( $15,1 \pm 0,9$  vs. salina  $14,8 \pm 1,0$  ml/2 h)] ou PPADS [1, 2, 3 e 4,0 nmol/0,1  $\mu$ l, antagonista purinérgico P2X ( $10,9 \pm 2,2$  vs. salina  $12,1 \pm 1,2$  ml/2 h,  $13,8 \pm 1,6$  vs. salina  $16,8 \pm 1,1$  ml/2 h,  $16,0 \pm 2,3$  vs. salina  $16,5 \pm 1,4$  ml/2 h,  $16,3 \pm 1,2$  vs. salina  $17,7 \pm 0,9$  ml/2 h, respectivamente)] no NTS. Porém, a ingestão de água induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 12% foi atenuada pela injeção bilateral de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS ( $4,2 \pm 0,7$  vs.

salina  $7,7 \pm 1,2$  ml/2 h) e esta redução não foi bloqueada pelo antagonista suramin ( $4,1 \pm 1,2$  ml/2) mas foi revertida pelo ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico [PPADS, antagonista dos receptores P2X,  $2,0$  nmol/0,1  $\mu$ l ( $8,3 \pm 2,7$  ml/2 h vs. salina  $10,3 \pm 1,9$  ml/2 h). Estes resultados sugerem que os receptores purinérgicos P2X do NTS participam dos mecanismos para regulação da desidratação intracelular ativando o mecanismo inibitório, mas não da desidratação induzida por privação hídrica. Estes resultados também sugerem que os receptores purinérgicos do NTS não estão envolvidos na ingestão de sódio induzida por depleção de sódio.

**Palavras chave:** Ingestão de líquidos, Desidratação, Privação de água, Sede, Apetite ao sódio.

## Abstract

Tomeo RA. Involvement of purinergic receptors of the solitary tract nucleus in control of hydro-mineral intake [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, 2010

Several studies have shown that the hydro-mineral intake control involves different mediators in the central nervous systems. However, the involvement of purinergic neurotransmission in the control of water and sodium intake is still unknown. Immunohistochemical studies showed a dense labeling of purinergic receptors in many regions involved in the control of the hydro-mineral balance, among them the nucleus of the solitary tract (NTS). The NTS has inhibitory mechanisms involved in the control of sodium and water intake. Thus, the aims of this study were to investigate the involvement of purinergic receptors of the NTS: 1) in the control of water and hypertonic sodium (sodium appetite) intake in rats with sodium depletion (produced by treatment with diuretic furosemide), 2) in the control of water intake in rats subtracted to 24h water deprivation (a model that mixes extra- and intracellular dehydration) and 3) in the control of water intake in rats treated with intragastric gavage with 2 ml of 12% NaCl (a model of intracellular dehydration). Male Holtzman rats (280-320 g) with bilateral guide cannulas implanted into the NTS were used. Bilateral injections of alpha-beta-methylene ATP ( $\alpha,\beta$ -methyl ATP, P2X purinergic agonist, 1.0 nmol/0.1  $\mu$ l) or suramin (non-selective P2 purinergic antagonist, 1.0 nmol/0.1  $\mu$ l) into the NTS did not change the 1.8% NaCl intake induced by sodium depletion ( $15.4 \pm 1.7$  ml/2h vs saline  $19.7 \pm 1.7$  ml/2h and  $18.9 \pm 2.7$  vs. saline  $22.7 \pm 2.3$  ml/2h, respectively). Water intake induced by water deprivation was not altered by purinergic agonist  $\alpha,\beta$ -methyl ATP [1.0 or 2.0 nmol/0.1  $\mu$ l ( $15.0 \pm 0.9$  vs. saline  $14.8 \pm 1.0$  ml/2 h and  $16.8 \pm 0.7$  vs. saline  $17.7 \pm 0.9$  ml/2 h, respectively)] or by the purinergic antagonists suramin [1.0 nmol/0.1  $\mu$ l ( $15.1 \pm 0.9$  vs. saline  $14.8 \pm 1.0$  ml/2 h)] or PPADS [1, 2, 3 and 4.0 nmol/0.1  $\mu$ l, purinergic P2X antagonist ( $10.9 \pm 2.2$  vs. saline  $12.1 \pm 1.2$  ml/2 h,  $13.8 \pm 1.6$  vs. saline  $16.8 \pm 1.1$  ml/2 h,  $16.0 \pm 2.3$  vs. saline  $16.5 \pm 1.4$  ml/2 h,  $16.3 \pm 1.2$  vs. saline  $17.7 \pm 0.9$  ml/2 h, respectively)] into the NTS. However, the water intake induced by intragastric gavage with 12% NaCl was attenuated by bilateral injection of  $\alpha,\beta$ -methyl ATP (2,0 nmol / 0.1  $\mu$ l) into the NTS ( $4.2 \pm 0.7$  vs. saline  $7.7 \pm 1.2$  ml/2 h) and this reduction was not blocked by the antagonist suramin ( $4.1 \pm 1.2$  ml/2 h) but was reversed by acid-6-

pyridoxalphosphate azofenil-2',4'-disulfonic [PPADS, P2X purinergic antagonist, 2,0 nmol/0.1  $\mu$ l ( $8.3 \pm 2.7$  ml/2 h vs. saline  $10.3 \pm 1.9$  ml/2 h). These results suggest that P2X purinergic receptors of the NTS participate in the mechanisms for regulation of intracellular dehydration by activating the inhibitory mechanism, but not the dehydration induced by water deprivation. These results also suggest that purinergic receptors of the NTS are not involved in sodium intake induced by sodium depletion.

**Keywords:** Drinking, Dehydration, Water deprivation, Thirst, Sodium appetite.

# 1 Introdução

Animais terrestres perdem água e sódio constantemente. 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 apareçam para restaurar a homeostase. As respostas comportamentais incluem a procura e o comportamento de ingestão de água e fluídos 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 (Johnson, Thunhorst<sup>47</sup>, 1997).

A perda de líquidos extracelular resulta em deficiência de sódio e água. Esta condição de deficiência em sódio está associada com uma sensação peculiar na boca (McCance<sup>55</sup>, 1936) que algumas vezes é interpretada como sede, mas não é aliviada pela ingestão de água, esta sensação é chamada de apetite ao sódio (McCance<sup>56</sup>, 1936).

Sede e apetite ao sódio sempre foram considerados comportamentos distintos, embora pudessem compartilhar mecanismos de ativação. Esse compartilhamento logo ficou demonstrado para a angiotensina II e não tardou muito para que o mesmo se verificasse para os receptores cardiovasculares de volume (Johnson, Thunhorst<sup>47</sup>, 1997; Fitzsimons<sup>35</sup>, 1998; Fitzsimons, Moore-Gillon<sup>34</sup>, 1980; Kaufman<sup>49</sup>, 1984; Ohman, Johnson<sup>67</sup>, 1986). 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 angiotensina II, a sede, definida por busca e ingestão de água, sempre precede o apetite ao sódio – definido como busca e ingestão de NaCl hipertônico (Fitzsimons<sup>35</sup>, 1998). 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 (Weisinger et al.<sup>90</sup>, 1985; Chiaraviglio, Perez-Guaita<sup>16</sup>, 1986; Blackburn et al.<sup>7-8</sup>, 1993, 1995).

### **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 aferentes para o sistema nervoso central (SNC, Schulkin<sup>83</sup>, 1991; Oldfield, McKinley<sup>69</sup>, 1995; Johnson, Thunhorst<sup>47</sup>, 1997; McKinley et al.<sup>58</sup>, 2001). Uma via envolve fatores humorais que pelo plasma ou líquido céfalo-raquidiano (LCR) sinalizam os órgãos circumventriculares (OCVs), entre os quais podemos destacar o órgão subfornical (OSF) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVL) 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). Os OCVs situam-se em posições estratégicas nos ventrículos encefálicos oferecendo uma ampla superfície de contato com os solutos do plasma e do LCR (Buggy, Johnson<sup>11</sup>, 1978; Oldfield, McKinley<sup>69</sup>, 1995). A presença de neurônios osmo-sódio sensíveis e de receptores de angiotensina II, permitem aos OCVs detectarem as variações na concentração de sódio e de angiotensina II circulante, de onde partem informações para os circuitos que controlam a ingestão de água e de sódio ou secreção de vasopressina (Oldfield, McKinley<sup>69</sup>, 1995; Johnson, Thunhorst<sup>47</sup>, 1997; McKinley et al.<sup>51</sup>, 2001).

O NTS, localizado na porção dorsal do bulbo, é a primeira estação sináptica no SNC que recebe as informações das aferências cardiovasculares sobre pressão arterial e volume (Palkovits, Zaborsky<sup>70</sup>, 1977) e também é identificado como uma área de controle inibitório de comportamentos ingestivos (Blanch et al.<sup>9</sup>, 2007; Blanch et al.<sup>10</sup>, 2010; Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010). O NTS recebe projeções da área postrema (AP) de acordo com van der Kooy, Koda<sup>88</sup> (1983), bem como envia projeções para várias áreas rostrais do encéfalo que estão envolvidas com o controle hidro-mineral, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V). O NTS também envia projeções para áreas do tronco encefálico (ponte) como

o NPBL (Saper et al.<sup>81</sup>, 1983; Ricardo, Koh<sup>78</sup>, 1978; Herbert et al.<sup>44</sup>, 1990), importante área envolvida no controle do equilíbrio hidro-salino.

A lesão eletrolítica do NTS aumenta a ingestão de água induzida por angiotensina II e este efeito é atribuído a perda de sinais inibitórios produzidos pelos barorreceptores no NTS (Schreihofner et al.<sup>82</sup>, 2000). A lesão eletrolítica do NTS também aumenta a ingestão de água induzida por isoproterenol (Blanch et al.<sup>9</sup>, 2007) e a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica (ig) de NaCl 2 M (Blanch et al.<sup>10</sup>, 2010). Adicionalmente, lesões mais específicas do NTS, como lesões do grupamento noradrenérgico (A2) do NTS também aumentam a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010). Porém, o neurotransmissor no NTS envolvido nestes mecanismos de ingestão de líquidos (em diferentes modelos de desidratação) ainda não foi estudado.

Adicionalmente, estudos de imunohistoquímica (Yao et al.<sup>95</sup>, 2000) evidenciaram a densa marcação de uma classe relativamente nova de receptores chamados de purinérgicos (especialmente receptores P2X) em várias regiões cerebrais envolvidas com o controle hidro-mineral, dentre elas o NTS. Existem poucos estudos na literatura mostrando o envolvimento dos receptores purinérgicos em vias envolvidas com comportamentos. Burnstock<sup>15</sup> (2007) relatou em revisão a participação dos receptores purinérgicos em vias comportamentais de aprendizado e memória (Wieraszko, Ehrlich<sup>91</sup>, 1994; Cunha et al.<sup>19</sup>, 1996; Fujii et al.<sup>38</sup>, 2004), ingestão de alimento (Levine, Morley<sup>54</sup>, 1982), sono e vigília (Bashee et al.<sup>6</sup>, 2004; Dunwiddie, Masino<sup>29</sup>, 2001; Feldberg, Sherwood<sup>33</sup>, 1954). No entanto, o papel destes receptores na regulação da ingestão de água e sódio de animais depletados de sódio, privados de água ou que receberam sobrecarga intragástrica ainda não foram estudados.

## **Neurotransmissão purinérgica**

O conceito da neurotransmissão purinérgica, onde o ATP e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock<sup>12</sup> em 1972. O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos (Ralevic, Burnstock<sup>75</sup>, 1998; Fredholm<sup>36</sup>, 1995; Burnstock<sup>14</sup>, 1997; Kennedy<sup>50</sup>, 2000; Fagura et al.<sup>31</sup>, 2000). Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock<sup>13</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 P2Y são subdivididos em 5 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) e são acoplados a proteína G e operam via inositol trifosfato (Ralevic, Burnstock<sup>75</sup>, 1998). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por 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- adenosina 5'-trifosfato ( $\alpha,\beta$ -metil ATP) e o alfa-gama-metileno-ATP, enquanto os receptores P2Y tem como agonista o 2-metilthio-ATP (2meS-ATP) (Ralevic, Burnstock<sup>75</sup>, 1998). O receptores purinérgicos P2 podem ser antagonizados pelo suramin (antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2) e pelo ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS, antagonista seletivo dos receptores purinérgicos P2X) (Ralevic, Burnstock<sup>75</sup>, 1998).

Recentemente, vários estudos demonstraram que o ATP extracelular, atuando nos receptores P2X, está envolvido em vários mecanismos centrais de regulação cardiovascular, respiratória e da temperatura corporal (Phillis et al.<sup>74</sup>, 1997; Horiuchi et al.<sup>45</sup>, 1999; Ralevic et al.<sup>76</sup>, 1999; Ralevic<sup>77</sup>, 2000; Gourine et al.<sup>40</sup>, 2002; Paton et al.<sup>71</sup>, 2002; Gourine et al.<sup>41</sup>, 2004; De Paula et al.<sup>27</sup>, 2004; Gourine et al.<sup>42</sup>, 2005). Existem evidências de que o ATP, atuando no bulbo ventrolateral desempenha um importante papel no controle vasomotor e da atividade simpática (Horiuche et al.<sup>45</sup>, 1999; Ralevic<sup>77</sup>, 2000). Além disso, os receptores P2X desta área participam também da resposta ventilatória à hipercapnia (Spyer, Thomas<sup>87</sup>, 2000). Adicionalmente, estudos mostraram que as purinas também participam do controle cardiovascular e respiratório atuando especificamente no NTS (Phillis et al.<sup>74</sup>, 1997; Spyer, Thomas<sup>87</sup>, 2000; De Paula, Machado<sup>26</sup>, 2001; Paton et al.<sup>71</sup>, 2002; De Paula et al.<sup>27</sup>, 2004; Antunes et al.<sup>4</sup>, 2005; Antunes et al.<sup>5</sup>, 2005). Ainda neste contexto, estudos de Gourine et al.<sup>40-42</sup> (2002, 2004, 2005), mostraram o envolvimento da neurotransmissão purinérgica no controle da temperatura corporal, onde a microinjeção intracerebroventricular (icv) 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 do 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 (Kidd et al.<sup>51</sup>, 1995; Seguela et al.<sup>85</sup>, 1996; Vulchanova et al.<sup>89</sup>, 1996; Kanjhan et al.<sup>48</sup>, 1999; Yao et al.<sup>95</sup>, 2000; Shibuya et al.<sup>86</sup>, 1999; Xiang et al.<sup>92</sup>, 1998).

Alguns estudos funcionais indicam que os receptores purinérgicos podem estar envolvidos no controle hidro-mineral (Mori et al.<sup>66</sup>, 1992; Coupar, Tran<sup>18</sup>, 2002). De acordo com Mori et al.<sup>66</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 vasopressina (AVP) no plasma. Estes efeitos são bloqueados pela injeção 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 AVP 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, Tran<sup>18</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>52</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 uréia por um mecanismo independente de vasopressina.

No entanto, existem poucos estudos mostrando o envolvimento da sinalização purinérgica em vias comportamentais. Estudo de nosso laboratório (Faria et al.<sup>32</sup>, 2009), mostrou a participação dos receptores purinérgicos centrais em mecanismos da sede. Neste trabalho, onde animais receberam injeções intracerebroventricular (icv) de ATP,

observou-se a atenuação da ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica, por sobrecarga intragástrica (ig) de NaCl 2 M e ANG II administrada também icv, embora a injeção de ATP icv 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 da regulação da sede e essa inibição não é generalizada para todos os comportamentos ingestivos, pois a injeção de ATP icv 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 NTS e a presença de receptores purinérgicos no NTS, nossa hipótese é que os receptores purinérgicos do NTS estão envolvidos no controle da ingestão hidro-mineral. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a participação dos receptores purinérgicos do NTS: 1) no controle da ingestão de água e sódio hipertônico (apetite ao sódio) em ratos com depleção de sódio (produzida pelo tratamento com diurético furosemida); 2) no controle da ingestão de água em ratos com privação hídrica de 24 horas (modelo de desidratação extra- e intracelular) e 3) no controle da ingestão de água em ratos com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (modelo de desidratação intracelular).

## 2 Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a possível participação dos receptores purinérgicos P2 do NTS no controle da ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos. Para tanto, foram investigados os efeitos de injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil 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 NTS no controle: 1) da ingestão de água e sódio hipertônico (apetite ao sódio) em ratos com depleção de sódio (produzida pelo tratamento com diurético furosemida); 2) da ingestão de água em ratos com privação hídrica de 24 horas (modelo de desidratação extra- e intracelular) e 3) no controle da ingestão de água em ratos com sobrecarga intragástrica de NaCl 12% (modelo de desidratação intracelular).

## **3 Material e Métodos**

### **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 0,3M (quando necessário) 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 23/2005) da FOAr – UNESP.

### **3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guias de aço inoxidável dirigidas para o núcleo do trato solitário (NTS)**

Para o implante de cânulas cerebrais no NTS, os ratos foram anestesiados com quetamina (Cristália, Itapira, SP, Brasil, 80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil, 7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900, David-Kopf, Tujunga, CA, EUA). A seguir foi injetado subcutaneamente o anestésico local lidocaína com vasoconstrictor na região do escalpo a ser aberta, reduzindo assim o sangramento. Após a anti-sepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente irrigada com solução fisiológica e água oxigenada. A torre do estereotáxico foi colocada na posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal foi ajustada até que os pontos bregma e lambda da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e então foram feitas as leituras das coordenadas ântero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV) a partir do bregma. O ponto de introdução da cânula guia foi determinado utilizando-se as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (1998) em relação ao bregma. As coordenadas utilizadas para o implante das cânulas-

guias em direção ao NTS foram: AP = 14,5 mm caudal ao bregma; L =  $\pm$  0,5 mm à linha média e DV = 7,5 mm abaixo do osso. Neste ponto foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas de 15 mm de comprimento, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. As cânulas-guias foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica e de pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente colocados na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 15 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos. 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 NTS**

As drogas utilizadas foram manualmente injetadas no NTS em um volume de 0,1  $\mu$ l em cada sítio desta região, utilizando-se uma seringa Hamilton (5  $\mu$ l, Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no NTS pela cânula guia previamente fixada nesta região. A cânula injetora foi 1,2 mm mais longa do que as cânulas-guias a fim de que as injeções atingissem diretamente o NTS. As injeções foram bilaterais e realizadas de modo sequenciado, ou seja, injeção de um lado do NTS seguida da injeção do lado contralateral.

### **3.4 Drogas e soluções utilizadas**

- Solução fisiológica (NaCl 0,15 M - veículo, foi injetada nos experimentos controles);
- Furosemida (20 mg/kg do peso corporal, diurético/saliurérico, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi administrada subcutaneamente (sc), 1 ml/rato, como descrito por



Yada et al.<sup>93</sup>, 1997 e Yada et al.<sup>94</sup>, 1997. Foi dissolvida em salina alcalina (pH ajustado em 9,0 com NaOH);

- sal hexasódio do ácido 8,8'- [Carbonilbis [imino-3,1-phenilencarbonylimino (4-metil-3,1-phenilene)carbonilimino]] bis-1,3,5-naftaleno trissulfônico [suramin (1,0 E 2,0 nmol/0,1 µl, antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2) Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EUA].

- ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico [PPADS (1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 nmol/0,1 µl, antagonista dos receptores purinérgicos P2X) Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA];

- sal de lítio de  $\alpha,\beta$ -metileneadenosina 5' trifosfato [ $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 e 2,0 nmol/0,1 µl), agonista dos receptores purinérgicos P2X) Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA].

Todas as drogas (com exceção da furosemida) foram dissolvidas em solução fisiológica (NaCl 0,9%).

As doses utilizadas de  $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS foram retiradas de dados da literatura (De Paula et al.<sup>27</sup>, 2004; Menezes et al.<sup>65</sup>, 2010) bem como de estudos pilotos realizados no laboratório.

### 3.5 Histologia

Ao final dos experimentos foi injetado 0,1 µl de solução de azul de Evan 2% bilateralmente no NTS para confirmar o local das injeções nesta região. Os ratos foram profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução de formalina 10% (20 ml). Em seguida, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por 2-4 dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção do NTS com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização do sítio de injeção no NTS foi feita em microscópio óptico. Somente os ratos nos quais o local da injeção estava situado corretamente no NTS foram utilizados para a análise estatística dos dados.

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

Os dados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Testes estatísticos adequados (análise de variância de duas vias para medidas repetidas e pós-teste de Newman Keuls) foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## **4 Protocolos Experimentais**

### **4.1 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP e suramin no NTS sobre a ingestão de sódio hipertônico (0,3 M) em ratos submetidos à depleção de sódio.**

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da administração do agonista e antagonista de receptores purinérgicos no NTS sobre a ingestão de água e sódio hipertônico (0,3 M) induzida por depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS submetidos à depleção de sódio obtida pelo tratamento com o diurético furosemida (20 mg/kg) subcutaneamente (sc), seguido de manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá, 0,001% sódio e 0,33% de potássio) e água *ad libitum*. O tratamento com furosemida (depleção de sódio) induz uma perda de sódio de 1,5 a 2,0 mEq e induz ingestão de sódio hipertônico (Jalowiec<sup>46</sup>, 1974; De Luca et al.<sup>23</sup>, 1992; Sakai et al.<sup>80</sup>, 1989; Rowland e Fregly<sup>79</sup>, 1992). O sódio ambiente foi removido pela lavagem das gaiolas dos ratos. Após este período o fubá foi removido e foram feitas as injeções de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina (veículo) no NTS. Dez minutos após as injeções água e NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi medida durante 2 h aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Ao término do experimento água, NaCl e ração foram disponibilizados aos animais. Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Os experimentos foram contrabalanceados de modo que todos os animais receberam as injeções de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina (veículo) no NTS.

### **4.2 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à privação hídrica por 24 h.**

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da administração do agonista e antagonistas de receptores purinérgicos no NTS sobre a ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 h.

A ingestão de água foi estudada em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS submetidos à privação hídrica (animais sem acesso à água por 24 horas) apenas com alimento disponível. Após as 24 h, os ratos receberam injeções no NTS de PPADS (1, 2, 3 ou 4,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou suramin (1 e 2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina (veículo) 10 minutos antes da injeção de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1 e 2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina (veículo). Cada animal foi submetido a 4 experimentos. Em cada experimento, o grupo de ratos foi dividido em 2 subgrupos e cada subgrupo recebeu um dos tratamentos. A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos 4 experimentos todos os animais receberam todos os tratamentos (veículo + veículo; veículo + agonista purinérgico; antagonista purinérgico + agonista purinérgico e antagonista purinérgico + veículo). A ingestão cumulativa de água foi medida durante 2 h aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Ao término do experimento água e ração foram disponibilizados aos animais. Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

### **4.3 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.**

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da administração do agonista e antagonista de receptores purinérgicos no NTS sobre a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de 2 ml de NaCl 2 M.

Antes do início dos experimentos os animais foram adaptados (treinados) a sobrecarga intragástrica sendo submetidos a este procedimento com NaCl 0,15 M 1 vez por dia durante 3 dias. Esta técnica consiste em segurar o animal cuidadosamente e introduzir um polietileno (PE-200) adaptado a uma seringa de 5 ml até o estômago do animal e então injetar 2 ml de NaCl 2 M, esta técnica é conhecida também como gavagem. Após o período de treinamento, a ingestão de água foi estudada em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NTS submetidos à gavagem de NaCl 2 M. Quarenta e cinco minutos após a sobrecarga, os animais receberam injeções bilaterais no NTS de suramin (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l), PPADS (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina 10 minutos antes da injeção de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina (veículo). Cada animal foi submetido a 4 experimentos. Em cada experimento, o grupo de ratos foi dividido em 2

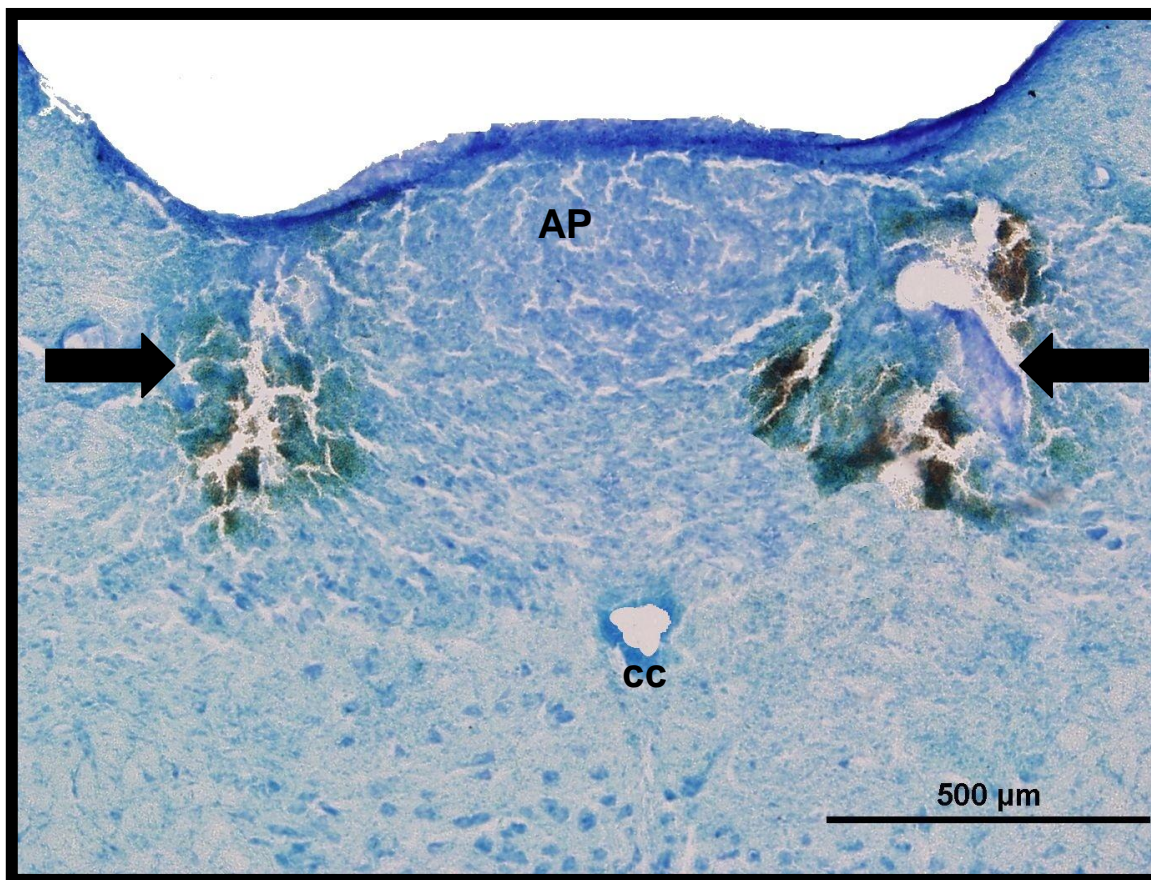
subgrupos e cada subgrupo recebeu um dos tratamentos. A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos 4 experimentos todos os animais receberam todos os tratamentos (veículo + veículo; veículo + agonista purinérgico; antagonista purinérgico + agonista purinérgico e antagonista purinérgico + veículo). A ingestão cumulativa de água foi medida durante 2 h aos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Ao término do experimento água, NaCl e ração foram disponibilizados aos animais. Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

A sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M produz uma elevação de 4% na osmolaridade e sódio plasmático, induzindo uma desidratação intracelular ou hiperosmótica e assim ingestão de água. Neste modelo não ocorre desidratação extracelular indicado pela redução da atividade da renina plasmática e pela não alteração no volume plasmático (Pereira et al.<sup>73</sup>, 2002).

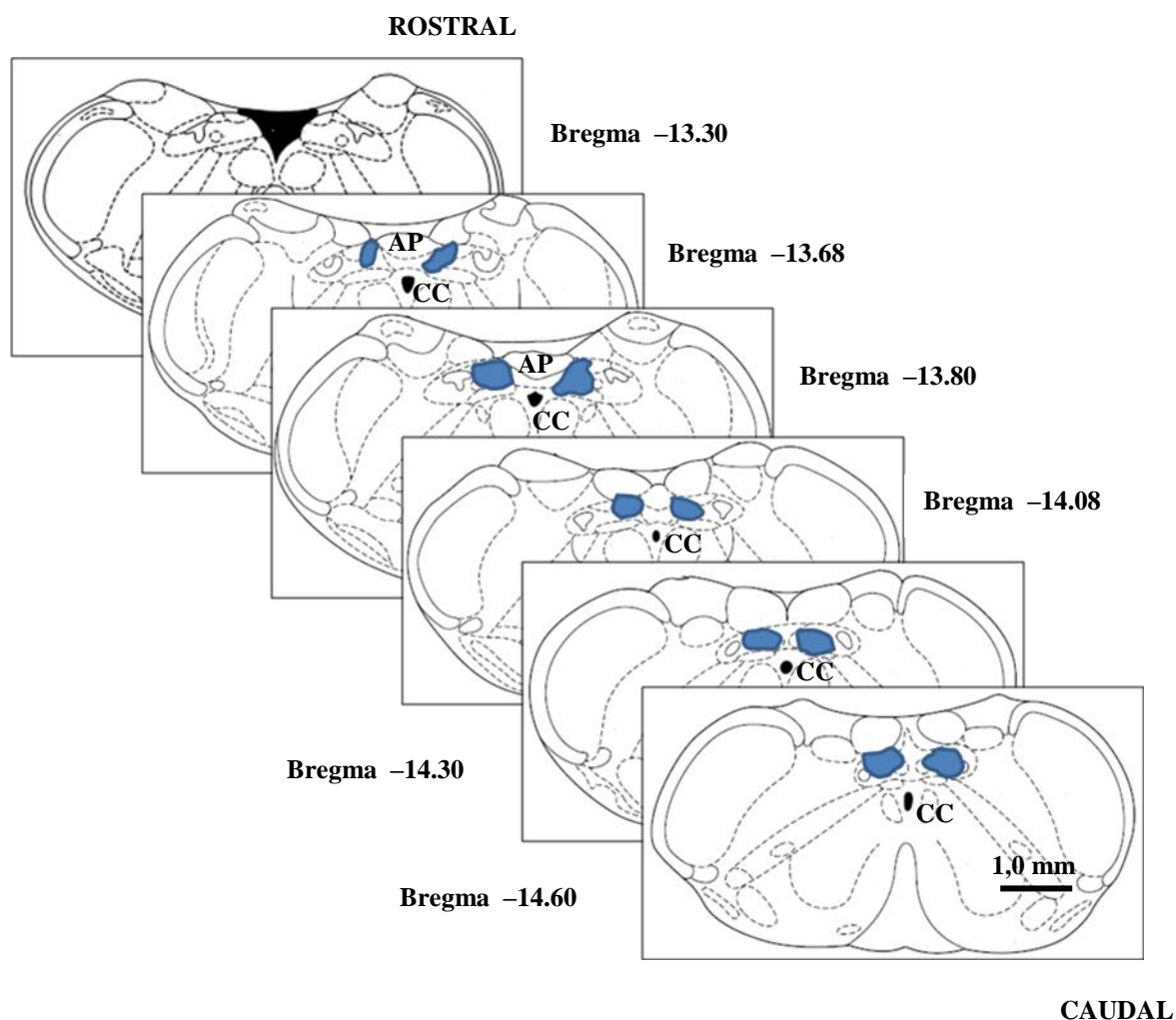
## **5 Resultados**

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

A figura 1 é uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios das injeções bilaterais no NTS. A figura 2 apresenta representações esquemáticas de sequencias de cortes transversais do tronco encefálico (adaptado de Paxinos, Watson<sup>72</sup>, 1998), mostrando a extensão do espalhamento do corante azul de Evan após as injeções bilaterais no NTS. Este espalhamento representa a média de 10 ratos que apresentaram injeções bilaterais com histologias positivas para NTS. Podemos observar nesta figura, que o volume de 0,1 µl promove um espalhamento de aproximadamente 1,0 mm de extensão rostro-caudal, o que indica que a maioria de nossas injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediária e caudal (comissural) do NTS.



**FIGURA 1-** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios das microinjeções bilaterais, indicados pelas setas, no NTS. CC = canal central, AP = área postrema.

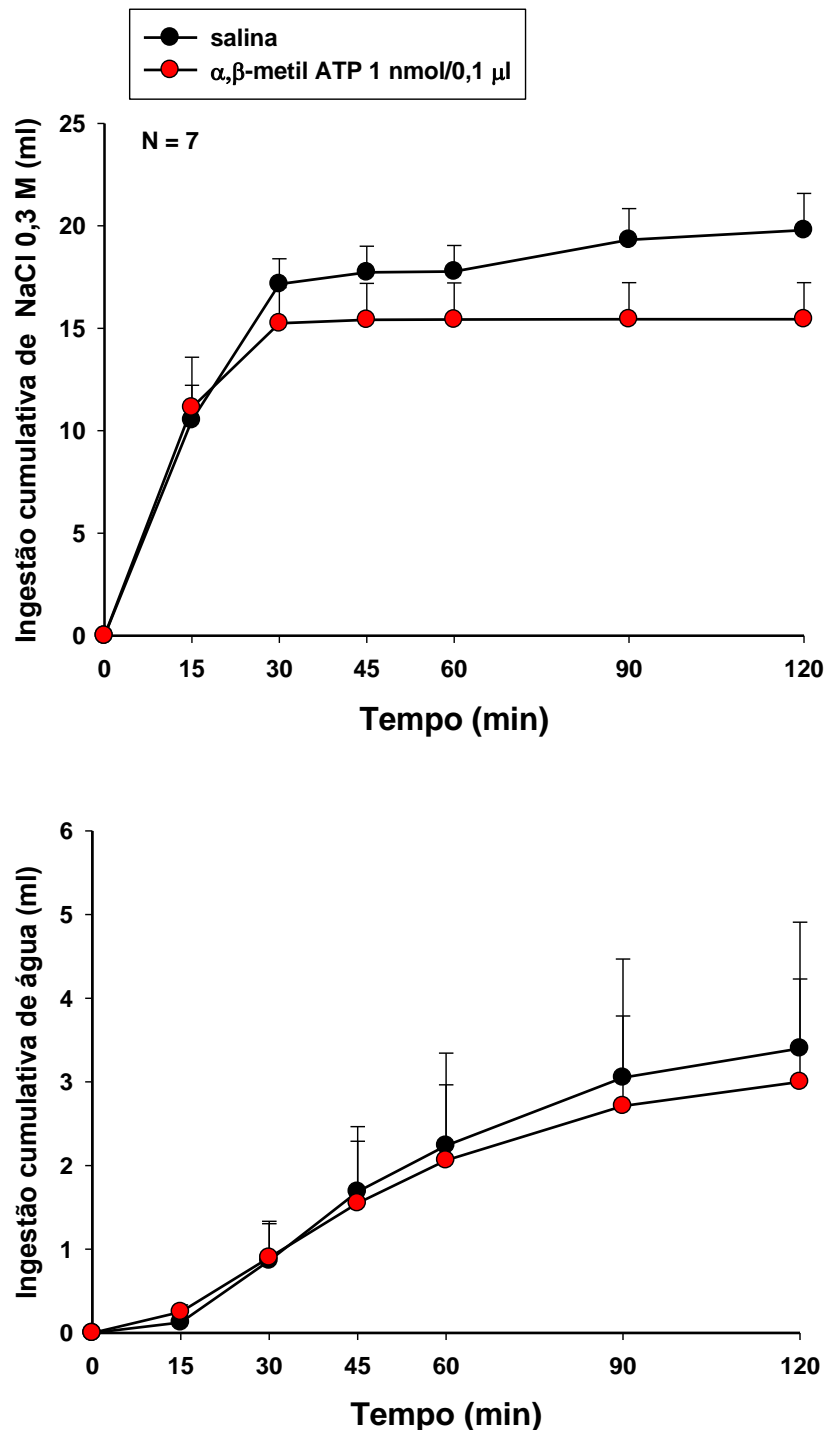


**FIGURA 2** - Representação esquemática de uma sequência de cortes transversais do tronco encefálico (adaptado de Paxinos, Watson<sup>72</sup>, 1998) mostrando a extensão de espalhamento do corante azul de Evan após as injeções bilaterais no NTS. CC = canal central, AP = área postrema.

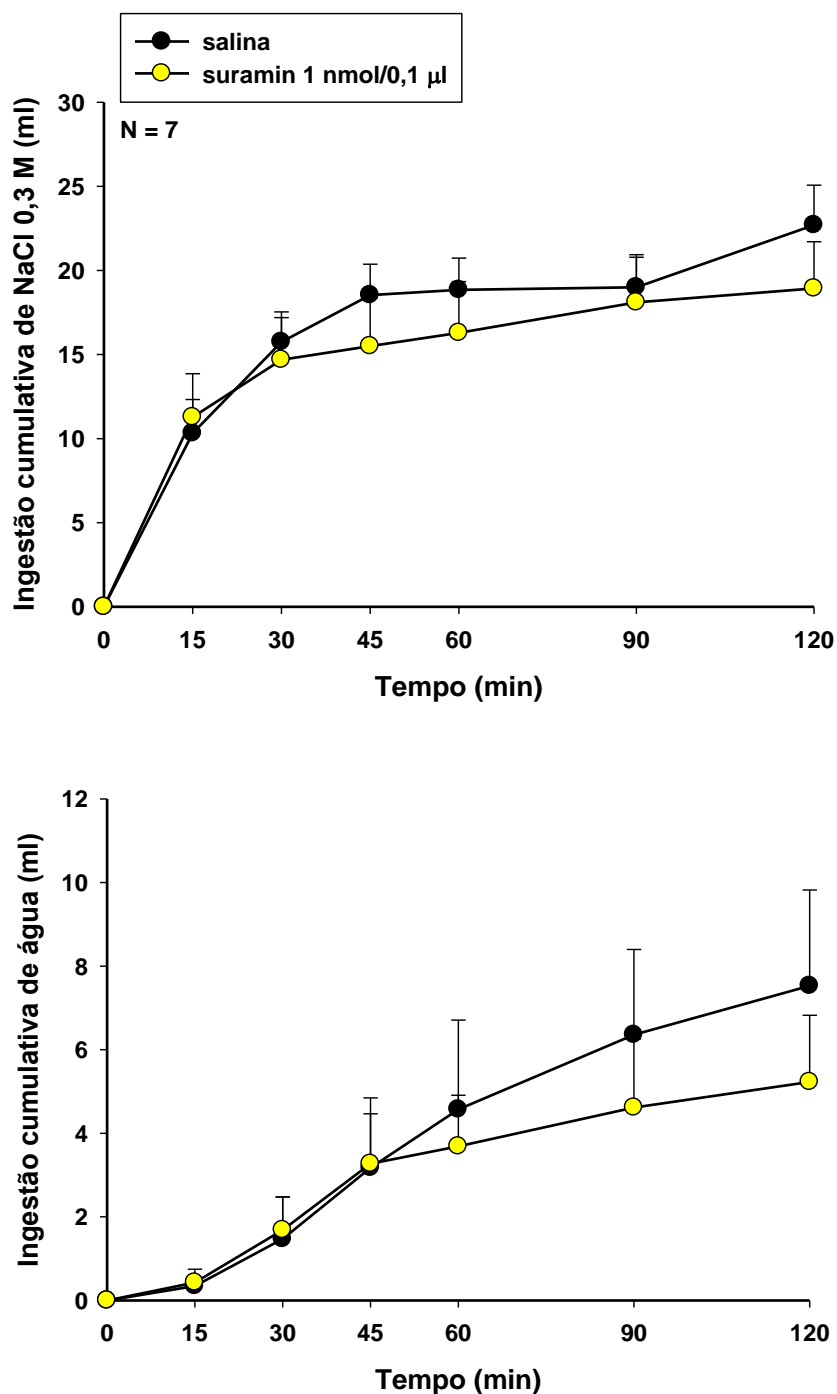


## **5.2 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP e suramin no NTS sobre a ingestão de sódio hipertônico (0,3 M) em ratos submetidos à depleção de sódio.**

Os ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS não apresentaram alterações na ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (15,4  $\pm$  1,7 ml/2 h vs. salina 19,7  $\pm$  1,7 ml/2 h e 18,9  $\pm$  2,7 vs. salina 22,7  $\pm$  2,3 ml/2 h, n=7, figuras 3 e 4, painel superior, respectivamente) e também não alteraram a ingestão de água (3,0  $\pm$  1,2 ml/2 h vs. salina 3,4  $\pm$  1,5 ml/2 h e 5,2  $\pm$  1,5 vs. salina 7,5  $\pm$  2,2 ml/2 h, n=7, figuras 3 e 4, painel inferior, respectivamente).



**FIGURA 3** - (painel superior) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e (painel inferior) ingestão cumulativa de água induzida por 24 h de depleção de sódio [induzida pelo diurético furosemida (20 mg/kg do peso corporal, sc)] em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina; controle) no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.

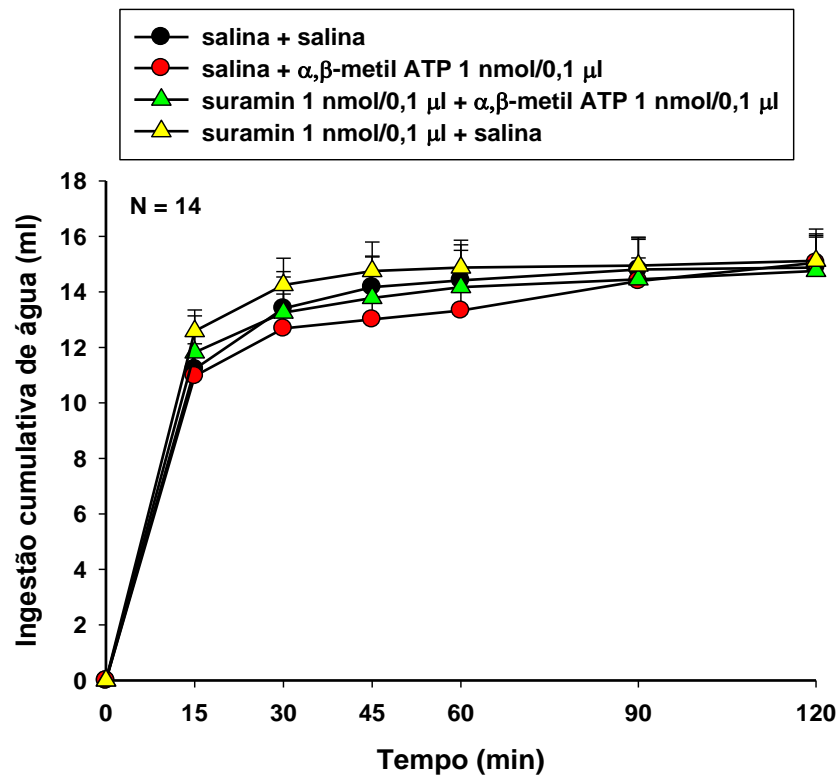


**FIGURA 4** - (painel superior) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e (painel inferior) ingestão cumulativa de água induzida por 24 h de depleção de sódio [induzida pelo diurético furosemida (20 mg/kg do peso corporal, sc)] em ratos que receberam injeções bilaterais de suramin (1,0 nmol/0,1 µl) ou veículo (salina; controle) no NTS. Os resultados são apresentados como média ± EPM; n, número de animais.

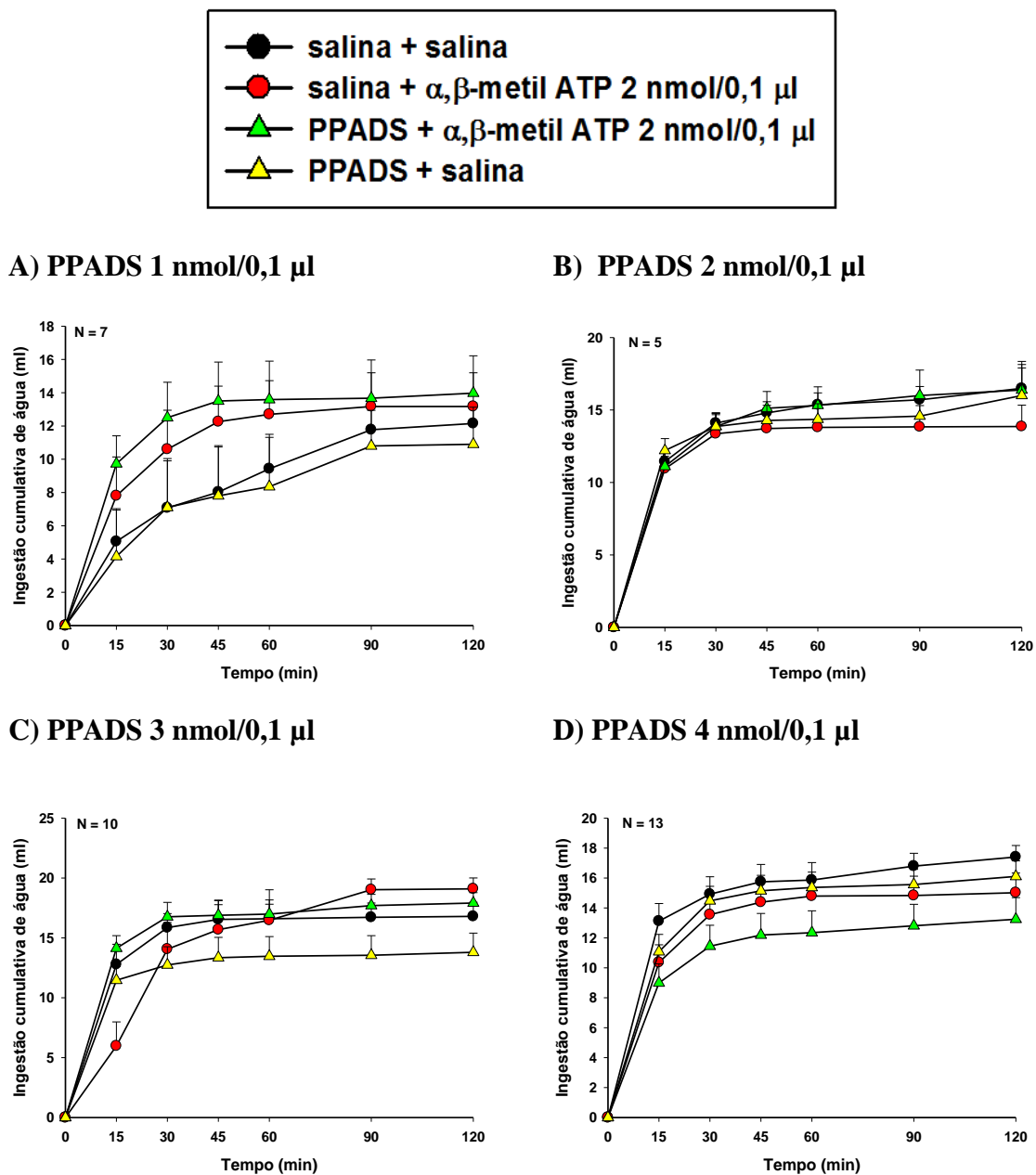
### **5.3 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à privação hídrica por 24 hs.**

A ingestão de água induzida por privação hídrica de 24 horas não foi modificada por injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 ou 2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS ( $15,0 \pm 0,9$  vs. salina  $14,8 \pm 1,0$  ml/2 h e  $16,8 \pm 0,7$  vs. salina  $17,7 \pm 0,9$  ml/2 h, respectivamente, figuras 5 e 6. O pré-tratamento com injeções bilaterais no NTS de suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) não promoveu alterações na ingestão de água ( $14,7 \pm 1,5$  vs.  $\alpha,\beta$ -metil ATP  $15,0 \pm 0,9$  ml/2 h, n=14, figura 5) em ratos privados de água. O suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) sozinho não produziu mudanças significantes na ingestão de água induzida por privação de água ( $15,1 \pm 0,9$  vs. salina  $14,8 \pm 1,0$  ml/2 h, figura 5).

O pré-tratamento com injeções bilaterais no NTS de PPADS (1, 2, 3 e 4,0 nmol/0,1  $\mu$ l) não promoveu alterações na ingestão de água ( $13,9 \pm 2,2$  vs.  $\alpha,\beta$ -metil ATP  $13,1 \pm 2,0$  ml/2 h,  $17,9 \pm 0,8$  vs.  $\alpha,\beta$ -metil ATP  $19,1 \pm 0,9$  ml/2 h,  $16,3 \pm 1,7$  vs.  $\alpha,\beta$ -metil ATP  $13,8 \pm 1,4$  ml/2 h e  $15,2 \pm 1,3$  vs.  $\alpha,\beta$ -metil ATP  $16,8 \pm 0,7$  ml/2 h, figura 6, respectivamente) em ratos privados de água. PPADS (1, 2, 3 e 4,0 nmol/0,1  $\mu$ l) sozinho não produziu mudanças significantes na ingestão de água induzida por privação de água ( $10,9 \pm 2,2$  vs. salina  $12,1 \pm 1,2$  ml/2 h,  $13,8 \pm 1,6$  vs. salina  $16,8 \pm 1,1$  ml/2 h,  $16,0 \pm 2,3$  vs. salina  $16,5 \pm 1,4$  ml/2 h e  $16,3 \pm 1,2$  vs. salina  $17,7 \pm 0,9$  ml/2 h, figura 6, respectivamente).



**FIGURA 5** - Ingestão cumulativa de água induzida por privação hídrica de 24 horas em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina combinado com suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.

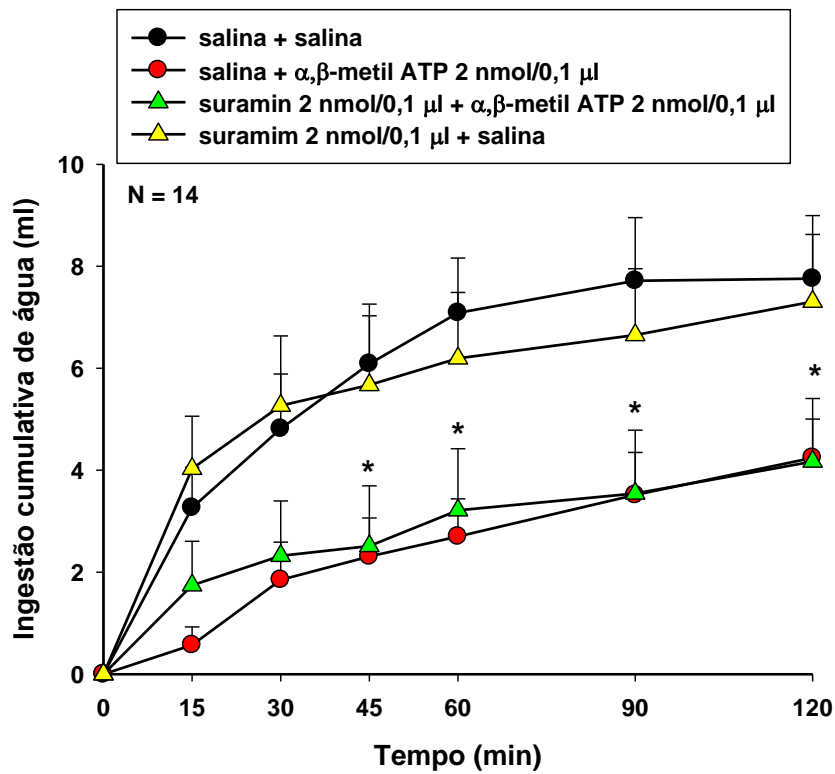


**FIGURA 6** - Ingestão cumulativa de água induzida por privação hídrica de 24 horas em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina combinado com PPADS: (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel A), (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel B), (3,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel C), (4,0 nmol/0,1  $\mu$ l, painel D) ou veículo no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais.

#### **5.4 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS no NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.**

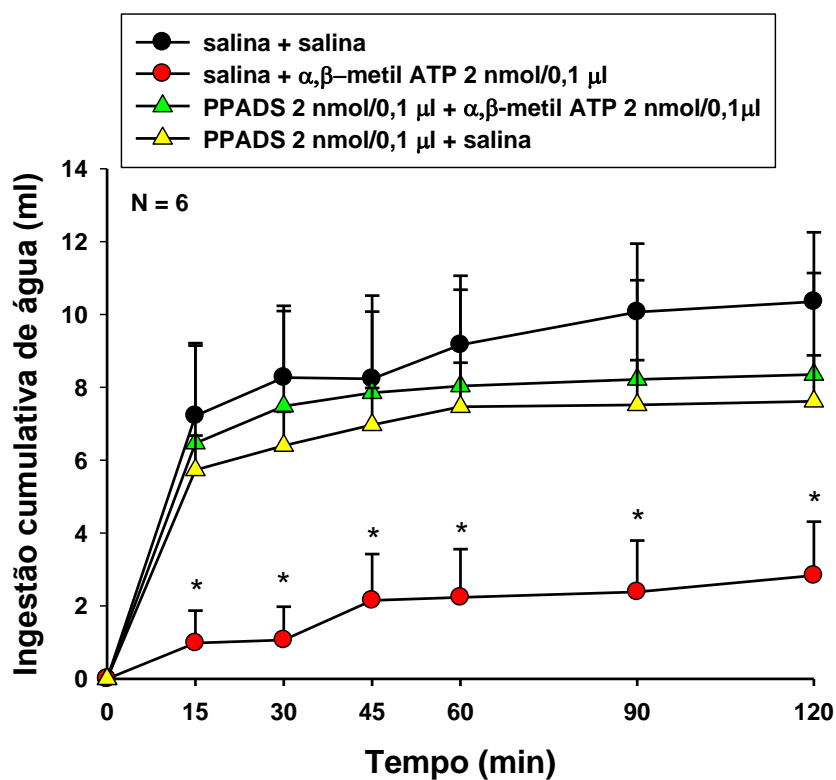
A ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica NaCl 2 M foi reduzida por injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS ( $4,2 \pm 0,7$  vs. salina  $7,7 \pm 1,2$  ml/2 h  $p < 0,05$ , figura 7). O pré-tratamento com injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS não modificou o efeito do  $\alpha,\beta$ -metil ATP ( $4,1 \pm 1,2$  ml/2 h, figura 7) em ratos que receberam sobrecarga intragástrica de solução de sódio hipertônico (NaCl 2 M). Injeções bilaterais de suramin (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) sozinho no NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica NaCl 2 M ( $7,3 \pm 1,3$  ml/2 h, figura 7).

Em outro grupo de animais, estudamos os efeitos do antagonista purinérgico P2X, PPADS. A ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M foi reduzida por injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS ( $2,8 \pm 1,4$  vs. salina  $10,3 \pm 1,9$  ml/2 h, figura 8). O pré-tratamento com injeções bilaterais de PPADS (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) no NTS bloqueou o efeito do  $\alpha,\beta$ -metil ATP ( $8,3 \pm 2,7$  ml/2 h figura 8) em ratos que receberam sobrecarga intragástrica de solução de sódio hipertônico (NaCl 2 M). Injeções bilaterais de PPADS (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) sozinho no NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica NaCl 2 M ( $7,6 \pm 1,2$  ml/2 h, figura 8).



**FIGURA 7** - Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina) combinado com suramin (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina) no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais. \* diferente de salina + salina;  $p < 0,05$ . n=14





**FIGURA 8** - Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina) combinado com PPADS (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou veículo (salina) no NTS. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n, número de animais. \* diferente de salina + salina;  $p < 0,05$ .

### **5.5 Efeitos da administração de $\alpha,\beta$ -metil ATP e salina em áreas adjacentes (fora) ao NTS sobre a ingestão de água em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.**

A especificidade do NTS como local de ação do agonista purinérgico foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos que receberam injeções de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina (veículo) fora do NTS. Injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP fora do NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.

**Tabela 1-** Ingestão cumulativa de água induzida por sobrecarga intragástrica de 2 ml de NaCl 2 M em ratos que receberam injeções bilaterais de  $\alpha,\beta$ -metil ATP (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou salina em áreas adjacentes (fora) ao NTS

<b>Tratamento</b>	<b>ingestão de água (ml/2 h)</b>
salina + salina	9,0 $\pm$ 1,1
salina + $\alpha,\beta$ -metil ATP	9,8 $\pm$ 1,8

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM; n = 06 ratos.

## 6 Discussão

Os resultados mostraram que as injeções bilaterais do agonista dos receptores purinérgicos P2X,  $\alpha,\beta$ -metil ATP, no NTS reduz a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml), protocolo que induz desidratação intracelular. Este efeito foi abolido pelo pré-tratamento com injeções bilaterais no NTS do antagonista purinérgico P2X, PPADS, mas não pelo antagonista purinérgico não seletivo, suramin. Por outro lado, as injeções bilaterais de suramin e PPADS sozinhos no NTS não produziram efeitos sobre a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Estes resultados sugerem que a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NTS facilitam o mecanismo inibitório para a ingestão de água presente nesta área.

Nossos resultados também mostraram que as injeções bilaterais no NTS de  $\alpha,\beta$ -metil ATP, suramin e PPADS não alteraram a ingestão de água induzida por privação hídrica e também  $\alpha,\beta$ -metil ATP e suramin no NTS não alteraram o apetite ao sódio induzido por depleção de sódio com o diurético furosemida, sugerindo que a redução da ingestão de água induzida pela desidratação intracelular após a ativação dos receptores purinérgicos do NTS com  $\alpha,\beta$ -metil ATP não é devido a uma inibição não específica generalizada para todos os comportamentos ingestivos e também não é devido a um efeito sedativo do  $\alpha,\beta$ -metil ATP. É importante salientar que as doses de  $\alpha,\beta$ -metil ATP e suramin utilizadas no protocolo do apetite ao sódio foram de 1,0 nmol/0,1  $\mu$ l, doses estas que são inferiores às doses utilizadas para os experimentos de desidratação intracelular. Desta forma, mais experimentos serão necessários para evidenciarmos ou não a participação dos receptores purinérgicos do NTS no apetite ao sódio.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com trabalhos de nosso laboratório (Blanch et al.<sup>9-10</sup>, 2007, 2010 e Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010) onde a lesão do NTS comissural aumenta a ingestão de água induzida por isoproterenol (Blanch et al.<sup>9</sup>, 2007) e a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 12% (Blanch et al.<sup>10</sup>, 2010). Lesões mais específicas do NTS comissural, como lesões do grupamento noradrenérgico (A2) do NTS também aumentam a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 12% (Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010). Estas lesões do NTS comissural afetaram somente a ingestão de água induzida por isoproterenol e sobrecarga ig de NaCl 12%, mas não alteraram a ingestão de água induzida por privação hídrica 24 h, sugerindo que o NTS está envolvido

especificamente com a desidratação intracelular, como também foi observado em nossos resultados.

Os trabalhos de Blanch et al.<sup>9-10</sup>, 2007, 2010 e Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010 sugerem que o NTS faz parte de um circuito inibitório para o controle da ingestão de água após estímulo hipertônico. Porém, os neurotransmissores/neuromoduladores no NTS envolvidos nestes mecanismos de desidratação ainda não são conhecidos e o presente estudo sugere um possível envolvimento do ATP, pois a injeção do agonista purinérgico P2X,  $\alpha,\beta$ -metil ATP, reduz a ingestão de água induzida por estímulo hipertônico, e esta redução é bloqueada pelo antagonista purinérgico seletivo P2X, PPADS, sugerindo que os receptores P2X ativam o mecanismo inibitório presente no NTS.

Nossos resultados mostraram que o antagonista purinérgico, suramin, não foi capaz de bloquear o efeito do  $\alpha,\beta$ -metil ATP em reduzir a ingestão de água induzida por estímulo hipertônico. Isto se deve ao fato do suramin não bloquear os subtipos de receptores purinérgicos P2X4 e P2X6 (Ralevic, Burnstock<sup>75</sup>, 1998; Ralevic<sup>77</sup>, 2000), receptores estes presentes no NTS e ativados pelo agonista  $\alpha,\beta$ -metil ATP.

Além do NTS, outras áreas do tronco encefálico estão envolvidas com o controle inibitório da ingestão de água, dentre elas o núcleo parabraquial lateral (NPBL) de acordo com Menani, Johnson<sup>62</sup> (1995); Colombari et al.<sup>17</sup> (1996). A lesão eletrolítica ou química do NPBL (Edwards, Johnson<sup>30</sup>, 1991; Ohman, Johnson<sup>67-68</sup>, 1986, 1989) ou tratamentos que antagonizam os receptores da serotonina, colicistoquinina, hormônio liberador de corticotrofina e L-glutamato (De Castro e Silva et al.<sup>20</sup>, 2006; De Gobbi et al.<sup>21</sup>, 2000; Menani et al.<sup>59-61,64</sup>, 1996, 1998, 2000, 2002; Menani, Johnson<sup>63</sup>, 1998; De Gobbi et al.<sup>22</sup>, 2009) aumentam a ingestão de sódio e água induzidos por diferentes tratamentos, sugerindo que estes neurotransmissores ativam um mecanismo inibitório presente no NPBL importante para o controle da ingestão de sódio e água. Estudo recente de nosso laboratório (Menezes et al.<sup>65</sup>, 2010) mostrou que a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NPBL com  $\alpha,\beta$ -metil ATP potencia a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio, e este efeito foi bloqueado por suramin e PPADS, sugerindo que os receptores purinérgicos P2X inibem o mecanismo inibitório presente neste área.

Outro estudo de nosso laboratório (Faria et al.<sup>32</sup>, 2009) mostrou que injeção icv 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 (P2) centrais estão envolvidos especificamente com mecanismos de controle da ingestão de água mas não de sódio. Estes resultados são contrários aos observados no estudo de Menezes et al.<sup>65</sup>, 2010, onde os autores demonstraram que a ativação dos receptores P2X do NPBL facilita a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio, mas não altera a ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica. Resultados semelhantes são observados nos trabalhos com ativação dos receptores adrenérgicos alfa 2 (Andrade et al.<sup>1-2</sup>, 2004, 2006; De Paula et al.<sup>25</sup>, 1996) quando a ativação destes receptores ocorre em regiões prosencefálicas (De Paula et al.<sup>25</sup>, 1996) ocorre um efeito inibitório para sede e apetite ao sódio, porém quando a ativação dos receptores adrenérgicos alfa 2 é no NPBL (Andrade et al.<sup>1-2</sup>, 2004, 2006) ocorre um efeito facilitatório principalmente para a ingestão de sódio. Correlacionando estes dados com os resultados presentes, podemos sugerir que o NTS está envolvido especificamente com mecanismo inibitório de controle da sede e não de sódio e o NPBL está envolvido com mecanismo inibitório principalmente para controle da ingestão de sódio, mas também de água.

Adicionalmente, estudos de Herbert et al.<sup>44</sup> (1990) demonstraram que o NTS envia projeções para o NPBL e estes núcleos enviam projeções para regiões do prosencéfalo envolvidas no controle da ingestão de água e sódio, como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) e núcleo paraventricular do hipotálamo (Herbert et al.<sup>44</sup>, 1990; Ricardo, Koh<sup>78</sup>, 1978; Saper et al.<sup>81</sup>, 1983). Assim, apesar dos circuitos que controlam a ingestão de água e sódio ainda não estarem totalmente esclarecidos, evidências anatômicas e funcionais (Herbert et al.<sup>44</sup>, 1990; Geerling, Loewy<sup>39</sup>, 2007; Menani et al.<sup>59-61,64</sup>, 1996, 1998, 2000, 2002; Menani, Johnson<sup>63</sup>, 1998; De Gobbi et al.<sup>22</sup>, 2009; Blanch et al.<sup>9-10</sup>, 2007, 2010 e Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010) sugerem que NTS e NPBL fazem parte de um mecanismo inibitório para o controle da ingestão de sódio e água para manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico.

Vale ressaltar que o bloqueio dos receptores serotoninérgicos do NPBL não altera a ingestão de água induzida por sobrecarga ig de NaCl 2 M (De Luca Jr et al.<sup>24</sup>, 2003), sugerindo que a serotonina no NPBL não participa da desidratação intracelular. Por outro lado, os estudos de lesão do NTS (Blanch et al.<sup>9-10</sup>, 2007, 2010 e Freiria-Oliveira et al.<sup>37</sup>, 2010) sugerem que este núcleo faz parte de um mecanismo inibitório

específico para desidratação intracelular e nossos resultados vêm corroborar os estudos de lesão, sugerindo que os receptores purinérgicos do NTS estão envolvidos neste modelo experimental de desidratação intracelular ativando o mecanismo inibitório.

A sobrecarga ig de NaCl 2 M promove um aumento da osmolaridade o que promove estimulação de osmorreceptores centrais (situados na região do prosencéfalo, McKinley<sup>57</sup>, 1991) e osmorreceptores periféricos e estas informações trafegam pelo nervo vago (Kraly et al.<sup>53</sup>, 1995; Stricker et al.<sup>84</sup>, 2002). Estudos demonstraram que o ramo hepático do nervo vago se projeta para a região caudal do NTS (Adachi<sup>3</sup>, 1984) e ainda nestas terminações aferentes do vago existem receptores purinérgicos, especificamente receptores P2X7 (Deuchars et al.<sup>28</sup>, 2001). Além disso, sabe-se que os osmorreceptores periféricos podem estar localizados na veia porta e na circulação hepática e alterações na concentração de sódio nesta região seriam convertidos em atividade nervosa hepática e estes sinais seriam enviados ao SNC pelo nervo vago, que se projeta para o NTS (Hosomi, Morita<sup>43</sup>, 1996). Desta forma, é possível que o NTS, através do nervo vago, receba as informações de aumento da osmolaridade periférica (região portal) e a partir deste sinal, envie sinais inibitórios para conter a ingestão de água (Blanch et al.<sup>10</sup>, 2010) e nossos resultados sugerem que a neurotransmissão deste mecanismo parece feita, em parte, pelos receptores purinérgicos. Desta forma, durante um aumento da osmolaridade plasmática, o ATP estaria sendo liberado no NTS para ativar o mecanismo inibitório evitando assim uma “super-diluição” do plasma após a ingestão de água.

Os resultados sugerem que os receptores purinérgicos P2X do NTS ativam um mecanismo inibitório importante para o controle da ingestão de água durante um estímulo hiperosmótico. Este mecanismo inibitório dentro do NTS é bastante complexo e pode utilizar mais de um neurotransmissor/neuromodulador.

1. A ativação dos receptores purinérgicos P2X [com o agonista  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l)], bem como o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 [com o antagonista suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l)] no NTS não promoveram alterações no apetite ao sódio de animais depletados de sódio com furosemida. Estes resultados sugerem que os receptores purinérgicos P2 do NTS não participam do apetite ao sódio induzido por depleção de sódio.

2. As injeções bilaterais do agonista purinérgico P2X,  $\alpha,\beta$ -metil ATP (1 e 2,0 nmol/0,1  $\mu$ l)], sozinho ou combinado com os antagonistas suramin (1,0 nmol/0,1  $\mu$ l) ou PPADS (1, 2, 3 e 4,0 nmol/0,1  $\mu$ l)] não foram capazes de alterar a ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica (modelo de desidratação intra- e extracelular). Suramin ou PPADS sozinhos, também não promoveram qualquer alteração na ingestão de água induzida por 24 h de privação hídrica. Estes dados sugerem que os receptores purinérgicos P2 do NTS não estão envolvidos na desidratação intra- e extracelular induzida por privação hídrica.

3. A ativação dos receptores purinérgicos P2X com injeções bilaterais do agonista  $\alpha,\beta$ -metil ATP no NTS reduz a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 12% (modelo de desidratação intracelular). Esse efeito foi abolido pelo pré-tratamento com injeções bilaterais do antagonista purinérgico seletivo P2X, PPADS, mas não pelo antagonista purinérgico não seletivo P2, suramin, no NTS. As injeções bilaterais de PPADS ou suramin sozinhos no NTS não produziram alterações na ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de salina hipertônica. Estes resultados sugerem que a ativação dos receptores purinérgicos do NTS facilitam um mecanismo inibitório importante para o controle da ingestão de água durante um estímulo hiperosmótico.



## **7 Conclusão**

Estes resultados sugerem que os receptores purinérgicos P2X do NTS participam dos mecanismos para regulação da desidratação intracelular ativando o mecanismo inibitório, mas não participam da desidratação induzida por 24 h de privação hídrica. Estes resultados também sugerem que os receptores purinérgicos P2 do NTS não estão envolvidos na ingestão de sódio induzida por depleção 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 Adachi A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. *J Auton Nerv Syst*. 1984; 10: 287-93.
- 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 Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol*. 2004; 73: 379-96.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Colombari E, Menani JV, Colombari DS. Lesions of the commissural subnucleus of the nucleus of the solitary tract increase isoproterenol-induced water intake. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40: 1121-7.
- 10 Blanch GT. Ajustes cardiovasculares e do equilíbrio hidroeletrólítico induzidos or soluções hipertônicas em ratos com lesão do núcleo do trato solitário comissural [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.
- 11 Buggy J, Johnson AK. Angiotensin-induced thirst: Effects of third ventricle obstruction and periventricular ablation. *Brain Res*. 1978; 201: 380-1.
- 12 Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972; 24: 509-81.

\* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site:

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

- 13 Burnstock G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol.* 1978; 11: 205-22.
- 14 Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology.* 1997; 36: 1127-39.
- 15 Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87: 659-797.
- 16 Chiaraviglio E, Perez-Guaita MF. The effect of intracerebroventricular hypertonic infusion on sodium appetite in rats after peritoneal dialysis. *Physiol Behav.* 1986; 37: 695-9.
- 17 Colombari DS, 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: R1470-6.
- 18 Coupar IM, Tran BL. Effects of adenosine agonists on consumptive behaviour and body temperature. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54: 289-94.
- 19 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: 2180-7.
- 20 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: R1136-41. Epub 2005 Dec 15.
- 21 De Gobbi JI, De Luca LA Jr, Menani JV. Serotonergic Mechanisms of the parabrachial nucleus on Doca-induced sodium intake. *Brain Res.* 2000; 13; 880:131-8.
- 22 De Gobbi JI, Belts 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. Epub 2009 Sep 9.
- 23 De Luca LA Jr, Galaverna O, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN. The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. *Brain Res Bull.* 1992; 28: 73-87.
- 24 De Luca LA Jr, Barbosa SP, Menani JV. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience.* 2003; 121: 1055-61.
- 25 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.

- 26 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.
- 27 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.
- 28 Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, et al. Neuronal P2X7 receptor are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 2001; 21: 7143-52.
- 29 Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 31-55.
- 30 Edwards GL, Johnson AK. Enhance drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am J Physiol.* 1991; 261(4Pt 2): R1039-44.
- 31 Fagura MS, Jarvis GE, Dougall IG, Leff P. Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J Auton Nerv System.* 2000; 81: 178-86.
- 32 Faria DRG, Santana JS, Menani JV, De Paula PM. Antidipsogenic effects of central adenosine-5'-triphosphate. *Br J Med Biol Res.* 2009; 42: 105-13.
- 33 Feldberg W, Sherwood PD. Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *J Physiol.* 1954; 123: 148-67.
- 34 Fitzsimons JT, Moore-Gillon MJ. Drinking and antidiuresis in response to reductions in venous return in the dog: neural and endocrine mechanisms. *J. Physiol.* 1980; 308: 403-16.
- 35 Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998; 78: 583-686.
- 36 Fredholm BB. Adenosine receptors in the central nervous system. *NIPS.* 1995; 10: 122-8.
- 37 Freiria-Oliveira AH, Blanch GT, Pedrigo GR, Cravo SL, Murphy D, Menani JV et al. A2 noradrenergic neurons inhibit omoreceptor-induced pressor and drinking responses. *Regul Pept.* 2009; 157: 14-8. Epub 2009 Jul 10.
- 38 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.
- 39 Geerling JC, Loewy AD. Sodium deprivation and salt intake activate separate neuronal subpopulations in the nucleus of the solitary tract and the parabrachial complex. *J Comp Neurol.* 2007; 504: 379-403.

- 40 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.
- 41 Gourine AV, Dale N, Gourine VN, Spyer KM. Fever in systemic inflammation: roles of purines. *Front Biosci.* 2004; 9: 1011-22.
- 42 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.
- 43 Hosomi, H., and H. Morita. Hepatorenal and hepatointestinal reflexes in sodium homeostasis: *News Physiol Sci.* 1996; 11: 103-7.
- 44 Herbert H, Moga MM, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990; 293: 540-80.
- 45 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.
- 46 Jalowiec JE. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. *Behav Biol.* 1974; 10: 313-27.
- 47 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.
- 48 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.
- 49 Kaufman S. Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. *J. Physiol.* 1984; 349: 389-96.
- 50 Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J. Auton. Nerv. System.* 2000; 81: 158-63.
- 51 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.
- 52 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.

- 53 Kraly FS, Kim Ym, Tribuzio RA. Renal nerve transection inhibits drinking elicited by eating and by intragastric osmotic loads in rats. *Physiol Behav.* 1995; 58: 1129-36.
- 54 Levine AS, Morley JE. Purinergic regulation of food intake. *Science.* 1982; 217: 77-9.
- 55 McCance RA. Experimental sodium chloride deficiency in man. *Proc R Soc London.* 1936; 119b: 245-68.
- 56 McCance RA. Medical problems in mineral metabolism. III. Experimental human salt deficiency. *Lancet.* 1936; 1: 823-30.
- 57 McKinley, MJ. Osmoreceptor for Thirst. In: *Thirst: physiological and psychological aspects*, edited by Ramsay DM and Booth DA. London: Springer-Verlag, 1991. p. 77-92.
- 58 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: 990-92.
- 59 Menani JV, Barbosa SP, De Luca LA Jr, De Gobbi JI, Johnson AK. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R837-41.
- 60 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.
- 61 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.
- 62 Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol.* 1995; 269(5Pt 2): R1044-9.
- 63 Menani JV, Johnson AK. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. *Am J Physiol.* 1998; 275(5Pt 2): R1431-7.
- 64 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.
- 65 Menezes MF, Barbosa SP, Andrade CA, Menani JV, de Paula PM. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Res.* 2010; 1372: 49-58.

- 66 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.
- 67 Ohman LE, Johnson AK. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol*. 1986; 251(3Pt 2): R504-9.
- 68 Ohman LE, Johnson AK. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *Am J Physiol*. 1989; 256(1Pt 2): R264-9.
- 69 Oldfield BJ, McKinley, MJ. Circunventricular organs. In: Paxinos G, editors. *The rat nervous system*, 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1995. p. 391-403.
- 70 Palkovits M, Zaborsky L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to baroreceptor reflex arc. In: De Jong W, Provoost AP, Shapiro AP, editors. *Hypertension and brain mechanisms*. Amsterdam: Elsevier; 1977. p 9-34.
- 71 Paton JF, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH, Boscan P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarius for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol*. 2002; 543: 995-1005.
- 72 Paxinos G, Watson C. *The brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1998.
- 73 Pereira DT, Vendramini RC, David RB, Nozaki PN, Menani JV, De Luca LA Jr. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav*. 2002; 76: 501-5.
- 74 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.
- 75 Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998; 50: 413-92.
- 76 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.
- 77 Ralevic V. P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. *J Auton Nerv Syst*. 2000; 81: 205-11.
- 78 Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*. 1978; 153: 1-26.

- 79 Rowland NE, Fregly MJ. Repletion of acute sodium deficit in rats drinking either low or high concentrations of sodium chloride solution. *Am J Physiol.* 1992; 262: R419-25.
- 80 Sakai RR, Frankmann SP, Fine WB, Epstein AN. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. *Behav Neurosci.* 1989; 103: 186-92.
- 81 Saper CB, Reis DJ, Joh T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci Lett.* 1983; 42: 285-91.
- 82 Schreihofner AM, Stricker EM, Sved AF. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279: R239-47.
- 83 Schulkin J. *Sodium Hunger: The search for a salty taste.* Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- 84 Stricker EM, Callahan JB, Huang W, Sved AF. Early osmoregulatory stimulation of neurohypophyseal hormone secretion and thirst after gastric NaCl loads. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R1710-7.
- 85 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.
- 86 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.
- 87 Spyer KM, Thomas T. A role for adenosine in modulating cardio-respiratory responses: a mini-review. *Brain Res Bull.* 2000; 53: 121-4.
- 88 van der Kooy D, Koda LY. Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat. *J Comp Neurol.* 1983; 219: 328-38.
- 89 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.* 1996; 93: 8063-7.
- 90 Weisinger RS, Denton DA, McKinley MJ, Muller AF, Tarjan E. Cerebrospinal fluid sodium concentration and salt appetite. *Brain Res.* 1985; 326: 95-105.
- 91 Wieraszko A, Ehrlich YH. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J Neurochem.* 1994; 63: 1731-1738.



- 92 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.
- 93 Yada MM, de Paula PM, Menani JV, Renzi A, Camargo LA, Saad WA et al. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. *Brain Res Bull*. 1997; 42: 205-9.
- 94 Yada MM, de Paula PM, Menani JV, de Luca Junior LA. Central alpha-adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997; 57: 137-43.
- 95 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 reservados ao autor)  
Araraquara, 06 de Janeiro de 2011.  
RODRIGO ANDERSON TOMEIO