



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

CAROLINA ORTIZ SANTANA

ENVOLVIMENTO DA ÁREA SEPTAL MEDIAL NO CONTROLE DA
INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO

Araraquara, SP

2022

CAROLINA ORTIZ SANTANA

**ENVOLVIMENTO DA ÁREA SEPTAL MEDIAL 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”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

Araraquara, SP

2022

S232e Santana, Carolina Ortiz.
Envolvimento da área septal medial no controle da ingestão de água e sódio / Carolina Ortiz Santana. – Araraquara: [S.n.], 2022.
50 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: José Vanderlei Menani.

1. NPBL. 2. ASM. 3. Ingestão. 4. Angiotensina. 5. Atropina. 6. Losartana. 7. Moxonidina. 8. Muscimol. I. Menani, José Vanderlei, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, aos meus pais e irmão, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam as minhas ausências em diversos momentos que foi necessário priorizar os estudos em diversas datas e que são os responsáveis por eu nunca ter desistido de sonhar com a formação em uma universidade pública.

Aos amigos próximos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a esta graduação.

A minha antiga psicóloga Dra. Izabella de Lima pois foi um suporte essencial para vida acadêmica e pessoal.

Aos professores que sempre foram um pilar importante em minha vida acadêmica desde ensino fundamental e que sempre auxiliaram com correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo de toda a vida. Um agradecimento especial ao meu professor de iniciação científica e orientador do presente trabalho José Vanderlei Menani que me proporcionou a experiência da pesquisa no ambiente universitário e confiou a mim a importante tarefa de desenvolver um trabalho no departamento de fisiologia.

Agradeço a instituição UNESP Araraquara e todos os funcionários da seção técnica de graduação, por sempre serem solícitos, fornecerem as melhores condições dentro do possível para que nosso curso fosse realizado com excelência e qualidade.

Um agradecimento especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica CNPq PIBIC-UNESP.

De modo geral, agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente do meu desenvolvimento pessoal, profissional e acadêmico, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

RESUMO

Angiotensina II (ANG II) atuando em áreas prosencefálicas e aldosterona por suas ações no bulbo são importantes hormônios estimuladores da ingestão de sódio. As ações estimuladoras destes hormônios são contrabalanceadas pela atividade de mecanismos inibitórios como aqueles do Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL). O balanço destas duas ações opostas é que determina se a ingestão de sódio deve ocorrer ou não. Uma área prosencefálica que tem um papel bem definido na ingestão de água, mas ainda pouco estudada para a ingestão de sódio é a Área Septal Medial (ASM). Porém, resultados preliminares do nosso laboratório mostraram que receptores angiotensinérgicos AT1 da ASM parecem ser importantes para a ingestão de sódio. Mas como já demonstrado para outras áreas cerebrais como o Órgão Subfornical (OSF), também no caso da ASM, a ingestão de sódio parece ser fortemente inibida pelos mecanismos inibitórios do NPBL e só ocorre quando estes mecanismos inibitórios são bloqueados pela injeção de moxonidina (agonista adrenérgico α_2 /imidazólico) no NPBL. Portanto, os objetivos do presente estudo foram investigar o possível envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos e/ou colinérgicos da ASM no controle da ingestão de sódio produzida por diversos estímulos como depleção de sódio, furosemida + captopril subcutaneamente (sc) em ratos que receberem injeções moxonidina no NPBL ou em ratos saciados que receberem injeções de muscimol (agonista GABA_A) no NPBL. Foram utilizados ratos Holtzman com peso em torno de 300 g mantidos em gaiolas individuais com ração Socil, água e NaCl 0,3 M disponíveis. Os animais tiveram implante de cânulas de aço inoxidável no NPBL (bilateralmente) e na ASM. As injeções centrais foram feitas utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ l), num volume de 0,2 ou 0,5 μ l. Os resultados obtidos mostraram que injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL em ratos tratados com injeção de salina na ASM aumentaram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M ($33,2 \pm 11,4$, vs. salina ASM + salina NPBL: $0,04 \pm 0,03$ mL/240 min) e de água ($9,3 \pm 3,6$, vs. salina ASM + salina NPBL: $0,6 \pm 0,3$ mL/240 min). As injeções de atropina (2 nmol/0,5 μ l) ou losartana (10 μ g/0,5 μ l) na ASM reduziram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M ($13,8 \pm 3,7$ e $10,9 \pm 3,1$ mL/240 min, respectivamente), mas não a ingestão de água em ratos tratados com muscimol no NPBL. Em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeção de salina na ASM, as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M ($30,9 \pm 4,7$, vs. salina ASM + veículo NPBL: $3,0 \pm 1,0$ mL/120 min) e de água ($18,4 \pm 2,6$, vs. salina ASM + veículo NPBL: $9,6 \pm 1,2$ mL/120 min). As injeções de losartana (10 μ g/0,5 μ l) na ASM reduziram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M e de

água em ratos tratados furosemida + captopril que receberam injeções de moxonidina no NPBL ($13,4 \pm 4,8$ e $12,6 \pm 3,1$ mL/120 min, respectivamente). Porém, a injeção de atropina na ASM não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com furosemida + captopril combinado com moxonidina no NPBL ($30,7 \pm 6,6$ e $12,9 \pm 4,1$ mL/120 min, respectivamente). Em conclusão, os presentes resultados sugerem que mecanismos angiotensinérgicos AT1 e colinérgicos muscarínicos da ASM fazem parte dos mecanismos facilitatórios da ingestão de NaCl. Adicionalmente, os resultados sugerem que os mecanismos angiotensinérgicos AT1 e colinérgicos muscarínicos da ASM são fortemente inibidos pelos mecanismos inibitórios da ingestão de NaCl do NPBL.

Palavras-chave: NPBL, ASM, Ingestão, angiotensina, atropina, losartana, moxonidina, muscimol.

ABSTRACT

Angiotensin II (ANG II) acting in forebrain areas and aldosterone by their actions in the medulla are important hormones that stimulate sodium intake. The stimulatory actions of these hormones are counterbalanced by the activity of inhibitory mechanisms such as those of the Lateral Parabrachial Nucleus (LPBN). The balance between these two opposite actions is what determines whether sodium intake should occur or not. A forebrain area that has a well-defined role in water intake, but still poorly studied for sodium intake is the Medial Septal Area (MSA). However, preliminary results from our laboratory showed that MSA AT1 angiotensinergic receptors appear to be important for sodium intake. But as already demonstrated for other brain areas such as the Subfornical Organ (SFO), also in the case of MSA, sodium intake seems to be strongly inhibited by the LPBN inhibitory mechanisms and only occurs when these inhibitory mechanisms are blocked by the injection of moxonidine (α 2-adrenergic/imidazole agonist) in LPBN. Therefore, the objectives of the present study were to investigate the possible involvement of angiotensinergic and/or cholinergic mechanisms of MSA in the control of sodium intake produced by various stimulus such as sodium depletion, furosemida + captopril subcutaneously (sc) in rats receiving moxonidine injections in the LPBN or in satiated rats that receive injections of muscimol (GABA_A agonist) into the LPBN. Male Holtzman rats weighing around 300 g were housed in individual cages with Socil chow, water and 0.3 M NaCl available. The animals had stainless steel cannulas implanted in the LPBN (bilaterally) and in the MSA. Central injections were made using a Hamilton syringe (5 μ l), in a volume of 0.2 or 0.5 μ l. The results obtained showed that bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN in rats treated with saline injection into the MSA significantly increased the intake of 0.3 M NaCl (33.2 ± 11.4 , vs. saline MSA + saline LPBN: 0.04 ± 0.03 mL/240 min) and water (9.3 ± 3.6 , vs. saline MSA + saline LPBN: 0.6 ± 0.3 mL/240 min). Injections of atropine (2 nmol/0.5 μ l) or losartan (10 μ g/0.5 μ l) into the MSA significantly reduced 0.3 M NaCl and water intake in rats treated with muscimol into the LPBN (13.8 ± 3.7 and 10.9 ± 3.1 mL/240 min, respectively). In rats treated with furosemida + captopril that received saline injection into the MSA, bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) into LPBN significantly increased 0.3 M NaCl intake (30.9 ± 4.7 , vs. saline MSA + vehicle LPBN: 3.0 ± 1.0 mL/120 min) and water (18.4 ± 2.6 vs. saline MSA + vehicle LPBN: 9.6 ± 1.2 mL/120 min). Losartan injections (10 μ g/0.5 μ l) into the MSA significantly reduced 0.3 M NaCl and water intake in furosemida + captopril treated rats that received moxonidine injections into the LPBN (13.4 ± 4.8 and 12.6 ± 3.1 mL/120 min, respectively). However, the injection of atropine into the MSA did not

modify the ingestion of 0.3 M NaCl and water in rats treated with furosemida + captopril combined with moxonidine into the LPBN (30.7 ± 6.6 and 12.9 ± 4.1 mL/ 120 min, respectively). In conclusion, the present results suggest that AT1 angiotensinergic and muscarinic cholinergic mechanisms of the MSA are part of the facilitatory mechanisms for NaCl ingestion. Additionally, the results suggest that the AT1 angiotensinergic and muscarinic cholinergic mechanisms of the MSA are strongly inhibited by the LPBN inhibitory mechanisms for NaCl ingestion.

Keywords: LPBN, MSA, Ingestion, ANG II, atropina, losartan, moxonidine, muscimol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Diagrama esquemático mostrando possíveis mecanismos facilitatórios e inibitórios e áreas encefálicas envolvidas no controle da sede e apetite ao sódio. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; CCK, colecistocinina; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; LPBN, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal 14
- Figura 2** - Ilustração temporal referente ao protocolo de ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL combinadas com losartana ou atropina na ASM 23
- Figura 3** - Ilustração temporal referente ao protocolo de ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM..... 24
- Figura 4** - Ilustração temporal referente ao protocolo de ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 horas em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinada com losartana na ASM..... 25
- Figura 5** - Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo mostrando o local (setas) das injeções (A) na área septal medial (ASM) e (B) no núcleo parabraquial lateral (NPBL) 26
- Figura 6** - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 µl), losartana (10 µg/0,5 µl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias ± EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais 27
- Figura 7** - Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 µl), losartana (10 µg/0,5 µl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias ± EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais 27
- Figura 8** - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de losartana (10 µg/0,5 µl) ou salina na ASM. Os

resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais..... 31

Figura 9 - Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de losartana (10 μ g/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais..... 31

Figura 10 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais 35

Figura 11 - Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento com FURO +CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais..... 36

Figura 12 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos com 24 h de depleção de sódio tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção de losartana (10 μ g/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais..... 37

Figura 13 - Ingestão cumulativa de água em ratos com 24 h de depleção de sódio tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção de losartana (10 μ g/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais..... 38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção de losartana, atropina ou salina na ASM.....29
- Tabela 2** - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção de losartana, atropina ou salina fora da ASM30
- Tabela 3** - Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL uni ou bilateralmente combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM.....33
- Tabela 4** - Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL uni ou bilateralmente combinadas com injeção de losartana ou salina parcialmente na ASM34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	-	Angiotensina II
ASM	-	Área Septal Medial
AV3V	-	Região Anteroventral do Terceiro Ventrículo
CAP	-	Captopril
ECA	-	Enzima Conversora de Angiotensina
EPM	-	Erro Padrão da Média
FURO	-	Furosemida
h	-	Horas
ICV	-	Intracerebroventricular
IP	-	Intraperitoneal
kg	-	Kilograma
M	-	Molar
MOXO	-	Moxonidina
mg	-	Miligrama
μL	-	Microlitro
μg	-	Micrograma
mL	-	Mililitro
Min	-	Minuto
mm	-	Milímetro
NaCl	-	Cloreto de Sódio
nmol	-	nanomol
NPB	-	Núcleo Parabraquial
NPBL	-	Núcleo Parabraquial Lateral
NTS	-	Núcleo do Trato Solitário
OSF	-	Órgão Subfornical
OCPLT	-	Órgão Cavo da Pré Lâmina Terminal
OVLT	-	Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal
PCS	-	Pedúnculo Cerebelar Superior
sc	-	Subcutâneo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Implantes de cânulas no NPBL e ASM	19
3.3 Drogas empregadas.....	20
3.4 Injeção das drogas no cérebro	20
3.5 Indução e medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M	21
3.5.1 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normohidratados.....	21
3.5.2 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP	21
3.5.3 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos submetidos a 24 horas de depleção de sódio	21
3.6 Histologia	22
3.7 Apresentação dos resultados e análise estatística	22
3.8 Protocolos experimentais testados.....	22
3.8.1 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL combinadas com losartana ou atropina na ASM....	22
3.8.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM.....	23
3.8.3 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 horas em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinada com losartana na ASM.....	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Análise Histológica.....	25
4.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM	26
4.3 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM ou fora da ASM.....	28

4.4 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM.....	30
4.5 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL uni ou bilateralmente combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM ou parcialmente na ASM.....	32
4.6 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL bilateralmente combinadas com injeção de atropina ou salina na ASM.....	34
4.7 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos submetidos a 24 h de depleção de sódio e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM.....	36
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Estudos trazem que um ser humano adulto possui uma quantidade de água em seu corpo equivalente a 60% do seu peso corporal e para que isso seja mantido em equilíbrio é necessária a existência de mecanismos reguladores. A regulação em relação ao volume e a osmolaridade dos líquidos corporais é imprescindível para a sobrevivência da unidade funcional dos seres vivos, as células (GUYTON; HALL, 2006). Diariamente perdemos água e eletrólitos através da respiração, suor e predominantemente pela excreção urinária. Os rins exercem um papel importante na regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos corporais, graças a sua capacidade de variar a excreção de água e solutos durante o processo de formação de urina, sendo o sódio o principal soluto determinante da osmolaridade. O comportamento de ingestão é a forma pela qual os seres podem repor as perdas da água e do sódio. Através de uma regulação hormonal e neural, os rins podem produzir uma urina hipo ou hiperosmótica, controlando assim o equilíbrio hidroeletrólítico no organismo, ou seja, quando a ingestão de água é baixa ou a perda de água aumenta, os rins produzem uma urina hiperosmótica, em relação ao plasma. Quando a ingestão de água é alta, é produzido grande volume de urina hipoosmótica (BERNE; LEVY, 2009).

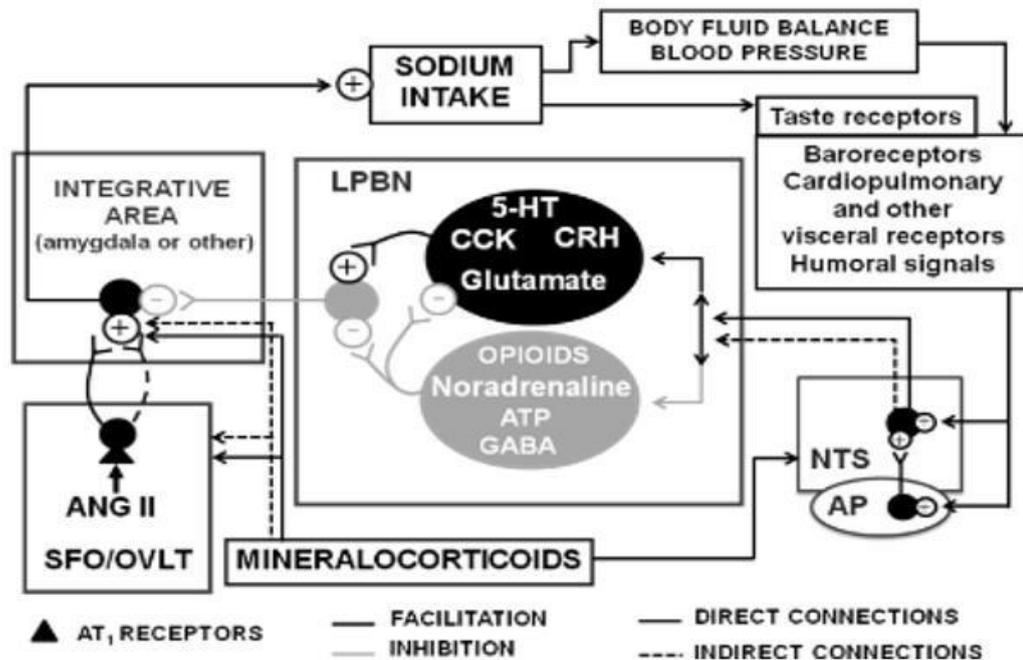
Como dito, quando água e/ou sódio estão em falta no organismo, a normalização da volemia e/ou da osmolaridade é eficientemente conseguida com o aumento da ingestão de sódio e/ou água que é regulada por mecanismos normalmente ativados em situações de hipovolemia ou alterações de osmolaridade. Nessas situações, receptores localizados em diversas partes do organismo e hormônios produzidos sinalizam para algumas regiões específicas do cérebro que ativadas desencadeiam respostas renais e/ou o comportamento de busca pela água (sede) e sódio (apetite ao sódio) (JOHNSON; EDWARDS, 1990; THUNHORST; JOHNSON, 1994).

Entre os mecanismos facilitatórios que estimulam a ingestão de água e sódio, destaca-se o peptídeo Angiotensina II (ANG II) que atua tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona que também atua centralmente induzindo ingestão de sódio) como pela ação em algumas áreas do cérebro como a Região Anteroventral do Terceiro Ventrículo (AV3V) e o Órgão Subfornical (OSF) localizados na lâmina terminal, que são importantes áreas do cérebro onde estão localizados os receptores para essa substância (BRODY; JOHNSON, 1980). ANG II é proveniente de uma cascata denominada sistema renina-angiotensina que é ativada em situações de redução da pressão de perfusão renal, queda na concentração de íons sódio ao passarem na macula densa do néfron, unidade funcional do rim, ou através da estimulação de receptores β_1 adrenérgicos renais. A cascata inicia-se com a liberação pelos rins

da enzima renina que por sua vez cliva a molécula precursora da angiotensina denominada angiotensinogênio, formando assim a angiotensina I. Em pouco tempo a angiotensina I é convertida em ANG II através da ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). A ANG II, potente vasoconstritor, possui ações periféricas (controle da secreção de aldosterona atuando na regulação da pressão arterial e que também atua centralmente induzindo ingestão de sódio) como ação em algumas áreas do cérebro como a região anteroventral do terceiro ventrículo e o órgão subfornical localizados na lâmina terminal, que são importantes áreas do cérebro onde estão localizados os receptores para essa substância (BRODY; JOHNSON, 1980) (PHILLIPS; SUMNERS, 1998).

Paralelamente aos mecanismos facilitatórios, a ingestão de água e particularmente a ingestão de sódio são extremamente dependentes do controle exercido pelos mecanismos inibitórios, como o mecanismo inibitório do Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL). O NPBL é uma subdivisão do NPB (Núcleo Parabraquial) que é uma estrutura pontina localizada ao redor do pedúnculo cerebelar superior que tem importante participação no controle da ingestão de água e sódio (MENANI et al., 2014; MENANI et al., 1996). A Figura 1 abaixo é um modelo esquemático baseado nos estudos mais recentes mostrando a interação entre mecanismos facilitatórios de área prosencefálicas e os mecanismos inibitórios do NPBL envolvidos no controle da ingestão de água e sódio. De um lado estão os mecanismos facilitatórios que estimulam a ingestão de sódio e do outro lado estão os mecanismos inibitórios acionados por sinais originados em receptores viscerais (gustativos, gastrointestinais, cardiovasculares e osmorreceptores) cuja atividade pode ser direta ou indiretamente influenciada pela ingestão de sódio (MENANI et al., 2014). Estes sinais inibitórios chegam ao Núcleo do Trato Solitário (NTS) e ascendem ao NPBL onde, diferentes neurotransmissores podem atuar modulando a inibição da ingestão de sódio.

Figura 1 - Diagrama esquemático mostrando possíveis mecanismos facilitatórios e inibitórios e áreas encefálicas envolvidas no controle da sede e apetite ao sódio. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; CCK, colecistocinina; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal.



Fonte: Modificado de modelo proposto por Menani et al., 2014.

Ao lado de áreas centrais já reconhecidas como importantes para o controle da ingestão de sódio (OSF, OVLT, amígdala, NPBL), a Figura 1 deixa aberta a possibilidade de outras áreas centrais também serem integrativas dos sinais envolvidos no controle da ingestão de sódio (MENANI et al., 2014). Uma área cerebral importante para o controle do equilíbrio hidroeletrólítico é a Área Septal Medial (ASM). A ASM é descrita como importante para o controle de respostas dipsogênicas, pressoras e natriuréticas (COVIAN ET AL., 1975; NEGRO-VILAR et al., 1967; DE LUCA JUNIOR et al., 1988; LUIZ et al., 1991; COLOMBARI et al., 1992; COLOMBARI et al., 1994; PAULIN et al., 2009). Injeções de agonistas colinérgicos na ASM produzem potentes respostas dipsogênicas, pressoras e natriuréticas (SAAD et al., 1975; COLOMBARI et al., 1992; BARBOSA et al., 1995). O envolvimento da ASM com mecanismos angiotensinérgicos não está claro, porém, estudos já sugeriram a existência de uma estrutura cerebral localizada rostralmente ao OSF que é sensível a ANG II (NICOLAIDIS; EL GHISSASSI, 1991; EL GHISSASSI et al., 1995). Esta área, denominada Órgão do Cavo Pré-Lâmina Terminal (OCPLT), da qual a ASM faz parte, é a mais rostral de todas as áreas conhecidas como sítios de ação central da ANG II (NICOLAIDIS; EL GHISSASSI, 1991; EL GHISSASSI et al., 1995). No rato, o OCPLT está localizado na linha média do cérebro, abaixo do corpo caloso, estendendo-se desde o Joelho do corpo caloso chegando até próximo do OSF, formando em determinado ponto uma cavidade que poderia ser banhada por um filtrado de líquido (NICOLAIDIS; EL GHISSASSI, 1991), característica esta que levou a área ser denominada nos primórdios de quinto ventrículo cerebral embora não tenha

sido descrita nenhuma comunicação com os espaços subaracnóide, cisternal ou ventricular. Verticalmente o OCPLT estende-se do corpo caloso até quase o final da lâmina terminal, englobando nesta direção a ASM. Injeções de ANG II no OCPLT, principalmente na altura da ASM, produzem respostas dipsogênicas parecidas com aquelas produzidas por injeções de ANG II centralmente em outras áreas como o OSF (NICOLAIDIS; EL GHISSASSI, 1991; EL GHISSASSI et al., 1995). Estudos anteriores já haviam mostrado que a natriurese induzida por injeção de NaCl hipertônico injetado no terceiro ventrículo é reduzida pela injeção de atropina na ASM, sugerindo que a ASM possui interação com áreas periventriculares sensíveis a alterações na osmolaridade no líquido cefalorraquidiano como o OSF, por exemplo (ROCHA et al., 1985). Estudos também demonstraram que a ASM tem um importante papel nas respostas pressora e natriurética produzidas pela injeção de carbacol no OSF e nas respostas pressora e dipsogênica induzidas pela injeção de ANG II no OSF, uma vez que a lesão da ASM provocou intensa redução dessas respostas (COLOMBARI et al., 1994).

É possível que a ASM também faça parte do circuito apresentado na Figura 1 acima, porém isso ainda não está claro. A razão pela qual ainda não foi demonstrada a participação da ASM no controle da ingestão de sódio (EL GHISSASSI et al., 1995), poderia ser a forte inibição exercida pelos mecanismos inibitórios do NPBL sobre a ingestão de sódio quando esta fosse estimulada pela ANG II, por exemplo, atuando na ASM. Nesta direção, alguns resultados preliminares de nosso laboratório demonstraram recentemente que a injeção de ANG II na ASM poderia estimular além da ingestão de água e também a ingestão de NaCl em ratos com bloqueio dos mecanismos inibitórios da ingestão de sódio pela injeção de moxonidina no NPBL. Assim, entendemos que seria importante se aprofundar a investigação sobre o envolvimento de mecanismos angiotensinérgicos da ASM no controle do apetite ao sódio, procurando assim, se desvendar um mecanismo ainda desconhecido para o controle da ingestão de sódio. E levando em conta a importância dos mecanismos colinérgicos da ASM para o controle do equilíbrio hidroeletrólítico (SAAD et al., 1975; COLOMBARI et al., 1992; BARBOSA et al., 1995), foi oportuno se investigar também se mecanismos colinérgicos da ASM estariam envolvidos com a ingestão de sódio como já demonstrado para outras áreas cerebrais como o OSF (ASNAR et al., 2013; RONCARI et al., 2014; RONCARI et al., 2017). Os testes foram feitos em animais nos quais a ingestão de sódio foi facilitada por desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções de moxonidina (agonista adrenérgico α_2 /imidazólico) ou muscimol (agonista GABA_A) no NPBL. As injeções de moxonidina no NPBL foram combinadas com injeções de antagonistas angiotensinérgicos ou colinérgicos na ASM em ratos que receberam tratamentos que podem estimular a ingestão de NaCl 0,3 M, como o tratamento com furosemida

(FURO) + dose baixa de captopril (CAP) subcutaneamente. As injeções de muscimol no NPBL sozinhas em animais normovolêmicos produzem ingestão de NaCl 0,3 M, uma solução que os animais só ingerem quando apresentam apetite ao sódio (MENANI et al., 2014). As injeções de muscimol no NPBL também foram combinadas com injeções de antagonistas angiotensinérgicos ou colinérgicos na ASM.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar a participação dos receptores angiotensinérgicos AT1 e colinérgicos muscarínicos da ASM na ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normovolêmicos que receberam injeções de muscimol no NPBL e em ratos tratados com FURO + CAP combinados com injeções de moxonidina no NPBL.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 280 e 310 gramas provenientes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP para os experimentos *in vivo*. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com ração Socil, água e NaCl 0,3 M (1,8%) ad libitum. Os animais foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas, sendo o ciclo claro iniciando-se às 7h30.

Os protocolos propostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (proc 18/2019).

3.2 Implantes de cânulas no NPBL e ASM

Para as cirurgias cerebrais os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com combinação de cetamina (80 mg/kg de peso corporal; Cristália, Itapira, SP, Brasil) com xilazina (7 mg/kg de peso corporal; Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e posicionados no aparelho estereotáxico. Posteriormente, foi realizada uma incisão na cabeça dos animais com auxílio de um bisturi até que fosse possível visualizar o crânio do animal. O bregma e o lambda foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos animais e se determinar os pontos de introdução da cânula-guia de aço inoxidável. Em seguida foi realizada uma pequena trepanação do crânio através de uma broca de 1,5 mm de diâmetro para a introdução das cânulas de aço inoxidável nas regiões cerebrais ASM e NPBL de acordo com as coordenadas estereotáxicas previamente estabelecidas em literatura. Para fixação das cânulas de aço inoxidáveis em suas respectivas áreas, foi utilizada a resina acrílica aderida a três parafusos, sendo dois deles posicionados atrás do bregma e o outro na frente do bregma.

Inicialmente para o implante na ASM as cânulas foram posicionadas a 0,6 mm rostral ao bregma, na linha mediana e 3,6 mm abaixo do crânio. Para implante no NPBL, cânulas foram posicionadas bilateralmente no cérebro 9,0 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 4,5 mm abaixo da dura-máter. Posteriormente, após análises histológicas as medidas foram atualizadas para ASM em 0,2 mm rostral do bregma seguindo a linha mediana e 4,8 mm abaixo do crânio. O NPBL foi atualizado para cânulas posicionadas bilateralmente no cérebro 9,3 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 4,2 mm abaixo da dura-máter.

Ao fim da cirurgia cerebral administrou-se injeção intramuscular de pentabiótico veterinário (0,2 mL/rato de benzilpenicilina – 80.000 UIs/estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e do anti-inflamatório subcutaneamente (cetoprofeno 1% - 0,3 mL/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil). Após a cirurgia, os ratos foram manipulados diariamente e treinados para o procedimento experimental. Os experimentos foram iniciados três a cinco dias após a cirurgia encefálica.

3.3 Drogas empregadas

Losartana potássico (Sigma-Aldrich), antagonista de receptor AT1, injetado na ASM na concentração de 10 µg/0,5 µL.

Metil brometo de atropina (Sigma-Aldrich), antagonista colinérgico muscarínico, injetado na ASM na concentração de 2 nmol/0,2 µL.

Furosemida (FURO), diurético atuante na alça de henle do néfron (unidade funcional renal) na dose de 10 mg/kg (protocolo FURO+CAP) e de 20 mg/kg (protocolo depleção de sódio por 24 horas) de peso corporal.

Captopril (CAP), inibidor da enzima conversora de angiotensina, na dose de 5 mg/kg de peso corporal.

Moxonidina, agonista α_2 adrenérgico/imidazólizo injetada no NPBL na concentração de 0,5 nmol/0,2 µL.

Muscimol, agonista seletivo para os receptores GABA_A injetada no NPBL na concentração de 0,5 nmol/0,2 µL.

A dissolução das respectivas drogas acima foi feita em solução fisiológica (NaCl 0,15 M), exceto a moxonidina a qual foi feita em propilenoglicol/água 2:1.

3.4 Injeção das drogas no cérebro

As injeções centrais foram realizadas com uma seringa Hamilton (10 µL para injeções na ASM e 05 µL para injeções no NPBL), conectada através de um polietileno PE-10 a uma agulha injetora de 14 milímetros que foi introduzida na cânula guia previamente fixada no cérebro. A cânula injetora (0,3 milímetros diâmetro) foi 2 milímetros mais longa do que a cânula guia fixada no cérebro

3.5 Indução e medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M

3.5.1 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normohidratados

Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição bebedouros graduados com NaCl 0,3 M, desde pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos.

Ratos saciados e normohidratados receberam injeções centrais e imediatamente após foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M em bebedouros graduados com divisão de 0,1 mL. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 30 minutos durante 4 horas.

Foi guardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de medida de ingestão de água e NaCl, os ratos não tiveram acesso à ração.

3.5.2 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP

Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição bebedouros graduados com NaCl 0,3 M, desde pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos.

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi induzida pelo tratamento combinado de furosemida (10 mg/kg de peso corporal) + captopril (5 mg/kg de peso corporal) sc. Imediatamente após o tratamento com furosemida + captopril, os ratos foram mantidos sem água e sem NaCl 0,3 M por uma hora. Após esse período, foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados bebedouros graduados com divisão de 0,1 mL. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida a cada 30 min, durante 2 h. Injeções de agonista no NPBL foram feitas 15 minutos antes do acesso dos animais a água e NaCl 0,3 M e as injeções de antagonistas na ASM foram feitas 15 minutos antes dos agonistas.

Durante o período de experimento, os ratos não tiveram acesso à ração. Foi guardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.5.3 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos submetidos a 24 horas de depleção de sódio

No dia anterior ao do experimento ração e NaCl 0,3 M, foram removidos das gaiolas e os animais receberam injeção sc de furosemida (20 mg/kg de peso corporal). Nas próximas 24 horas os ratos tiveram acesso a água e dieta deficiente de sódio (fubá). No dia seguinte, os animais receberam injeções de losartana (10 µg/0,5 µl), atropina (2 nmol/0,5 µl) ou salina na

ASM. Quinze minutos após as injeções na ASM foram feitas injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os animais tiveram acesso as buretas com água e NaCl 0,3 M. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida a cada 30 minutos durante 2 horas.

3.6 Histologia

Ao final dos experimentos, sob anestesia profunda (tiopental sódico, 80 mg/kg de peso corporal, ip), o coração dos animais foi exposto cirurgicamente, realizando-se uma perfusão com solução de formalina a 10%. A seguir, os cérebros foram retirados e mergulhados no mesmo agente fixador por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R) os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 50 µm e corados pela técnica de Nissl para posterior análise em microscópio óptico.

3.7 Apresentação dos resultados e análise estatística

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

3.8 Protocolos experimentais testados:

3.8.1 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL combinadas com losartana ou atropina na ASM

Os animais receberam os seguintes tratamentos:

- Atropina ASM + muscimol NPBL;
- Salina ASM + muscimol NPBL;
- Losartana ASM + muscimol NPBL;
- Salina ASM + salina NPBL.

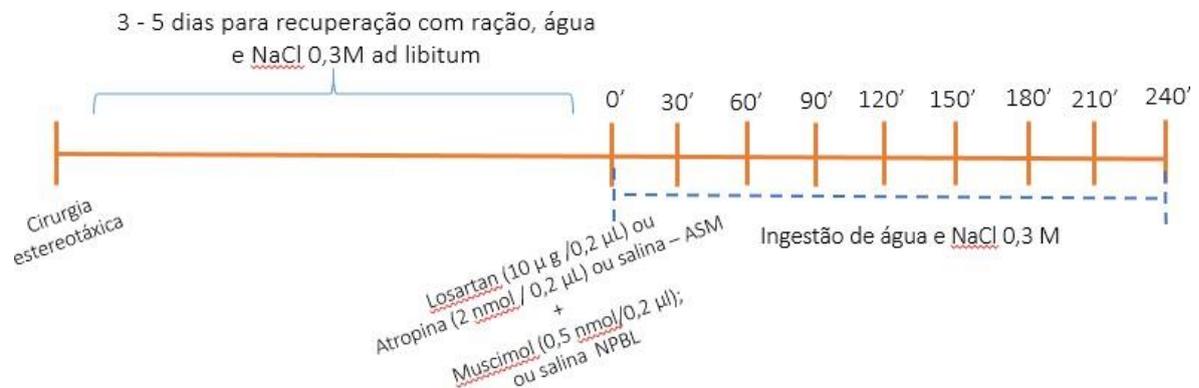
Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade dos animais recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento.

A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.

Nos testes os animais normohidratados foram submetidos a injeções de losartana, atropina ou salina na ASM simultaneamente com injeções bilaterais de muscimol ou veículo no NPBL. Em seguida iniciou-se as medidas de ingestão de água e NaCl 0,3M. Conforme ilustra figura 2.

Durante a execução dos experimentos os animais foram mantidos sem o acesso a ração.

Figura 2 – Ilustração temporal referente ao protocolo de ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normohidratados tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL combinadas com losartana ou atropina na ASM



Fonte: Elaboração própria.

3.8.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi induzida pelo tratamento combinado de injeções subcutâneas de furosemida (10 mg/kg de peso corporal) + captopril (5 mg/kg de peso corporal). Imediatamente após o tratamento com furosemida + captopril, os ratos foram mantidos sem água e sem NaCl 0,3 M por uma hora. Após esse período de uma hora, foi oferecido aos animais água e NaCl 0,3 M. As injeções no NPBL foram feitas 15 minutos antes do acesso dos animais a água e NaCl 0,3 M e as injeções na ASM foram feitas 15 minutos antes das injeções no NPBL, conforme ilustra figura abaixo. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados bebedouros graduados com divisão de 0,1 mL. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida a cada 30 min, durante 2 h. Conforme ilustra figura 3.

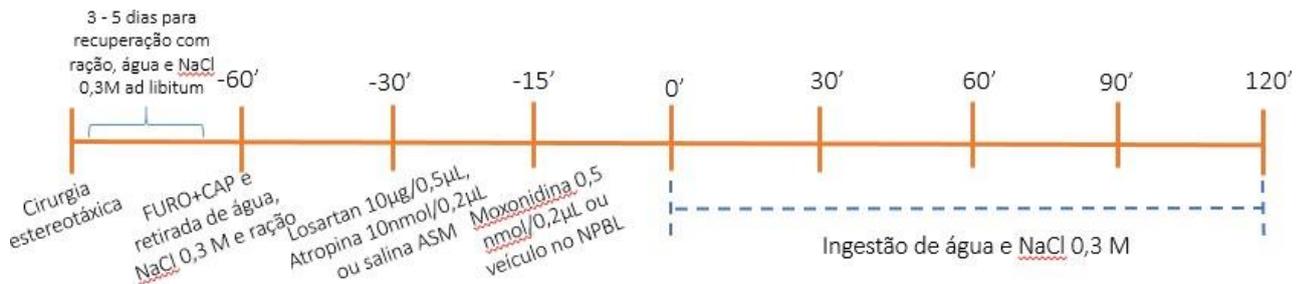
Em ratos que receberam FURO + CAP sc foram testados os seguintes tratamentos:

- Salina ASM + moxonidina NPBL
- Losartana ASM + moxonidina NPBL
- Atropina ASM + moxonidina NPBL
- Salina ASM + veículo NPBL

Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade dos animais recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.

Durante a execução dos experimentos os animais foram mantidos sem o acesso a ração.

Figura 3 - Ilustração temporal referente ao protocolo de ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM



Fonte: Elaboração própria.

3.8.3 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 horas em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinada com losartana na ASM

A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi induzida pelo tratamento com furosemida (20 mg/kg de peso corporal) sc. Imediatamente após o tratamento com furosemida, os ratos foram mantidos sem NaCl 0,3 M e foi realizada a troca da ração por fubá durante 24 horas. Após esse período foram administradas injeções na ASM 15 minutos antes das injeções no NPBL.

Após as injeções no NPBL esperou-se 15 minutos e em seguida foi oferecido aos animais água e NaCl 0,3 M. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados bebedouros graduados com divisão de 0,1 mL. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida a cada 30 min, durante 2 h. Conforme ilustra figura 4.

Em ratos que passaram pela depleção de sódio, foram testados os seguintes tratamentos:

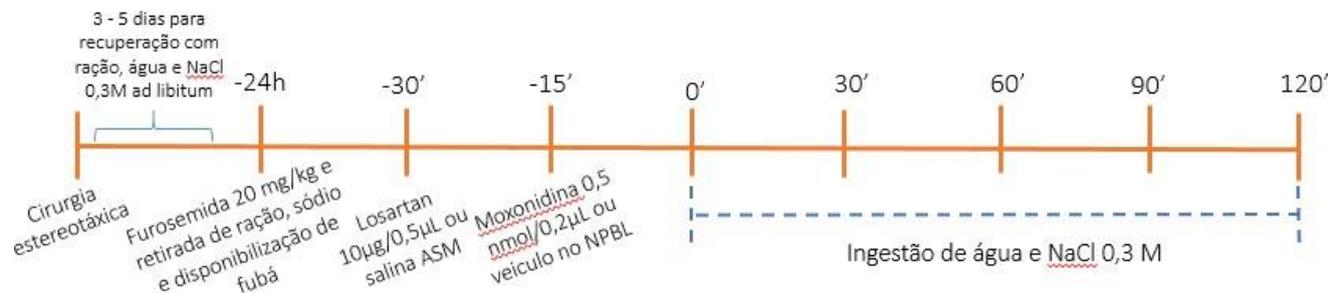
- Salina ASM + moxonidina NPBL

- Losartana ASM + moxonidina NPBL
- Losartana ASM + veículo NPBL
- Salina ASM + veículo NPBL

Durante os experimentos, os animais tiveram o acesso retirado de ração e fubá.

Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade dos animais recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.

Figura 4 - Ilustração temporal referente ao protocolo de ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 horas em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL combinada com losartana na ASM.



Fonte: Elaboração própria.

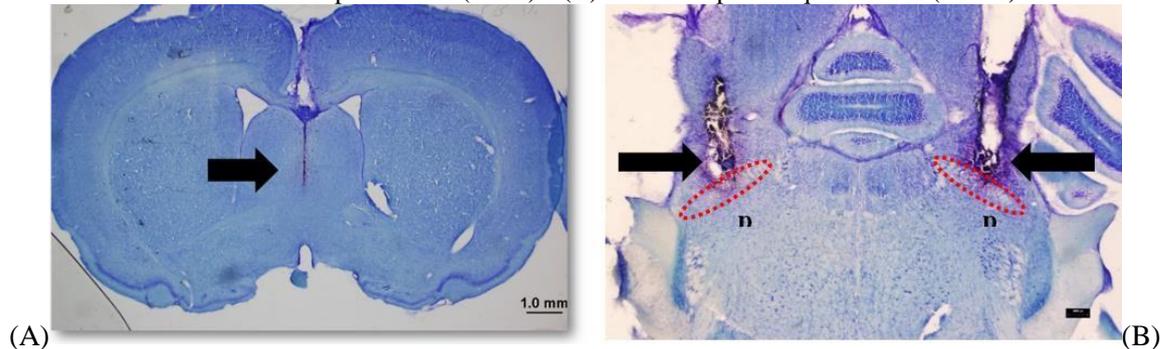
4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

O centro das injeções corretamente posicionadas na ASM estava localizado na linha média do cérebro, 2 a 3 mm abaixo do corpo caloso e 1 a 2 mm acima da comissura anterior (Figura 2A). Para o NPBL, as injeções foram consideradas corretamente posicionadas quando localizadas acima do braquium (Pedúnculo Cerebelar Superior – PCS), nas porções laterais centrais e laterais dorsais do NPBL, em concordância com as definições de Fulwiler e Saper, 1984 (Figura 2B). Injeções atingindo as porções laterais ventrais e laterais externas, bem como o Kölliker-Fuse foram observadas em alguns animais e os resultados destes animais foram incluídos na análise como ratos que receberam injeções no NPBL. Em 2 ratos as injeções de muscimol atingiram também a região abaixo do braquium, ou seja, a região do núcleo parabraquial medial. Os resultados destes 2 ratos também foram incluídos na análise como

sendo de injeções classificadas como no NPBL, pois os resultados não foram diferentes dos demais ratos que receberam injeções de muscimol no NPBL, ou seja, nesses ratos o muscimol teve seu efeito mesmo quando injetado abaixo do que foi considerado como exclusivamente NPBL. Os sítios de injeção no presente estudo são similares àqueles de estudos prévios que mostram o efeito do muscimol e da moxonidina no NPBL sobre a ingestão de sódio (ANDRADE et al., 2004; RONCARI et al., 2014, 2017).

Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo mostrando o local (setas) das injeções (A) na área septal medial (ASM) e (B) no núcleo parabraquial lateral (NPBL)



Fonte: elaboração própria.

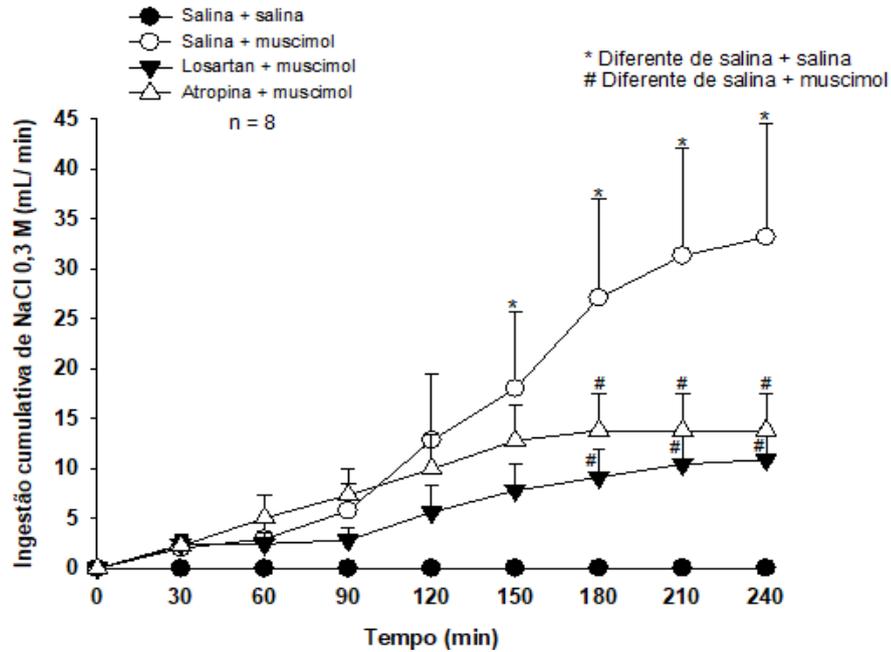
4.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeções bilaterais de muscimol no NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM

Em ratos tratados com injeção de salina na ASM, as injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M ($33,2 \pm 11,4$, vs. salina ASM + salina NPBL: $0,04 \pm 0,03$ mL/240 min) e de água ($9,3 \pm 3,6$, vs. salina ASM + salina NPBL: $0,6 \pm 0,3$ mL/240 min) (Figuras 6 e 7). Para a ingestão de NaCl 0,3 M, ANOVA mostrou diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 4,47; p = 0,01], entre tempos [F (7, 49) = 10,01; p < 0,001] e interação significante entre tratamento e tempo [F (21, 147) = 4,47; p < 0,001] (Figura 6). Para ingestão de água, ANOVA mostrou diferenças significantes para tempo [F (7, 49) = 14,40; p < 0,001] e também interação significante entre tratamento e tempo [F (21, 147) = 2,02; p = 0,008], sem diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 1,64; p = 0,21] (Figura 7).

As injeções de atropina (2 nmol/0,5 μ l) ou losartana (10 μ g/0,5 μ l) na ASM reduziram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M ($13,8 \pm 3,7$ e $10,9 \pm 3,1$ mL/240 min,

respectivamente), mas não a ingestão de água em ratos tratados com muscimol no NPBL (Figuras 6 e 7).

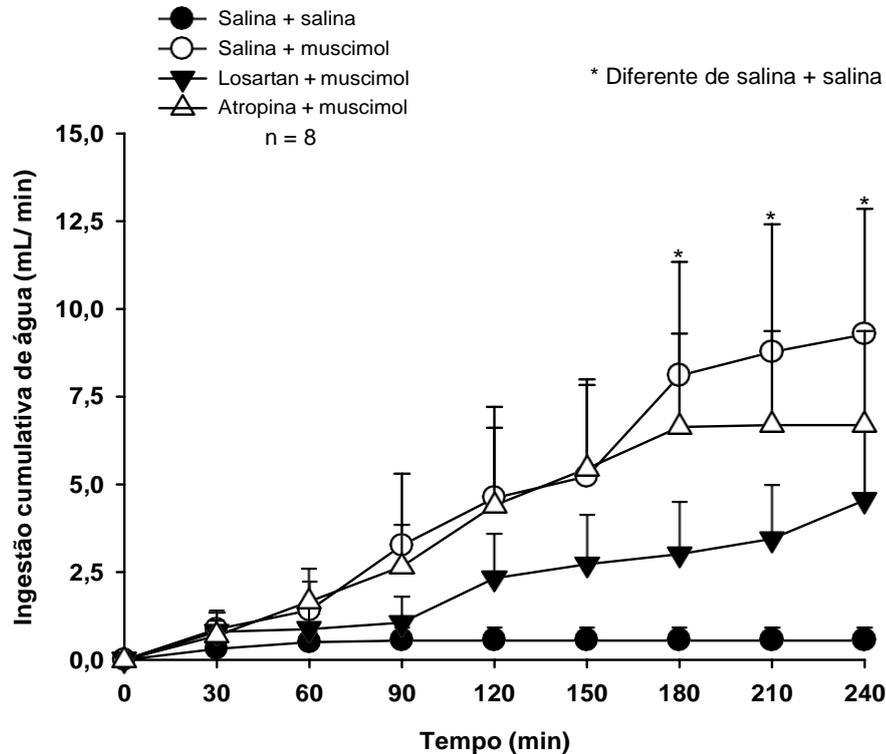
Figura 6 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 µl), losartana (10 µg/0,5 µl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias ± EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais.



Fonte: elaboração própria.

Figura 7- Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 µl), losartana (10 µg/0,5 µl) ou salina na

ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais.



Fonte: elaboração própria.

4.3 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL combinadas com injeção de atropina ou losartana na ASM ou fora da ASM

As injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) fora do NPBL não produziram modificações significantes da ingestão de NaCl 0,3 M nos ratos que receberam injeção de salina na ASM ($2,6 \pm 0,4$, vs. salina fora do NPBL + salina ASM: $0,9 \pm 0,6$ mL/240 min), atropina (2 nmol/0,5 μ l) na ASM ($1,6 \pm 0,9$ mL/240 min) ou losartana (10 μ g/0,5 μ l) na ASM ($7,5 \pm 6,4$ mL/240 min) [F (3, 12) = 0,96; p = 0,44] (Tabela 1). A ingestão de água também não foi diferente comparando-se ao tratamento com salina na ASM + muscimol fora do NPBL ($3,2 \pm 1,4$ mL/240 min) com o tratamento com salina na ASM + salina fora do NPBL ($1,3 \pm 0,5$ mL/240 min) ou com os tratamentos atropina ou losartana na ASM + muscimol fora do NPBL ($4,2 \pm 2,4$ e $2,2 \pm 1,2$ mL/240 min, respectivamente) [F (3, 12) = 0,66; p = 0,60] (Tabela 1).

As injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) fora do NPBL também não produziram modificações significantes da ingestão de NaCl 0,3 M nos ratos que receberam injeção de salina fora da ASM ($6,4 \pm 3,3$, vs. salina fora do NPBL + salina fora da ASM: $0,5 \pm 0,7$ mL/240 min),

atropina (2 nmol/0,5 µl) na ASM ($12,7 \pm 7,4$ mL/240 min) ou losartana (10 µg/0,5 µl) na ASM ($9,5 \pm 3,3$ mL/240 min) [F (3, 12) = 2,28; p = 0,13] (Tabela 2). A ingestão de água também não foi diferente comparando-se ao tratamento com salina fora da ASM + muscimol fora do NPBL ($5,2 \pm 3,2$ mL/240 min) com o tratamento com salina fora da ASM + salina fora do NPBL ($1,6 \pm 0,9$ mL/240 min) ou com os tratamentos atropina ou losartana fora da ASM + muscimol fora do NPBL ($7,5 \pm 3,9$ e $8,4 \pm 5,1$ mL/240 min, respectivamente) [F (3, 12) = 1,63; p = 0,24] (Tabela 2).

Tabela 1 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção de losartana, atropina ou salina na ASM.

Tratamento (n = 5)	Ingestão de NaCl 0,3 M/240 min (mL)
Muscimol + salina	$2,6 \pm 0,4$
Muscimol + atropina	$1,6 \pm 0,9$
Muscimol + losartana	$7,5 \pm 6,4$
Salina + salina	$0,9 \pm 0,6$
	Ingestão de água/240 min (mL)
Muscimol + salina	$3,2 \pm 1,4$
Muscimol + atropina	$4,2 \pm 2,4$
Muscimol + losartana	$2,2 \pm 1,2$
Salina + salina	$1,3 \pm 0,5$

Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartana (10 µg/0,5 µl) e atropina (2 nmol/0,5 µl).

Fonte: elaboração própria

Tabela 2 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinadas com injeção de losartana, atropina ou salina fora da ASM

Tratamento (n = 5)	Ingestão de NaCl 0,3 M/240 min (mL)
Muscimol + salina	6,4 ± 3,3
Muscimol + atropina	12,7 ± 7,4
Muscimol + losartana	9,5 ± 3,3
Salina + salina	0,5 ± 0,7
	Ingestão de água/240 min (mL)
Muscimol + salina	5,2 ± 3,2
Muscimol + atropina	7,5 ± 3,9
Muscimol + losartana	8,4 ± 5,1
Salina + salina	1,6 ± 0,9

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartana (10 µg/0,5 µl) e atropina (2 nmol/0,5 µl).

Fonte: elaboração própria

4.4 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM

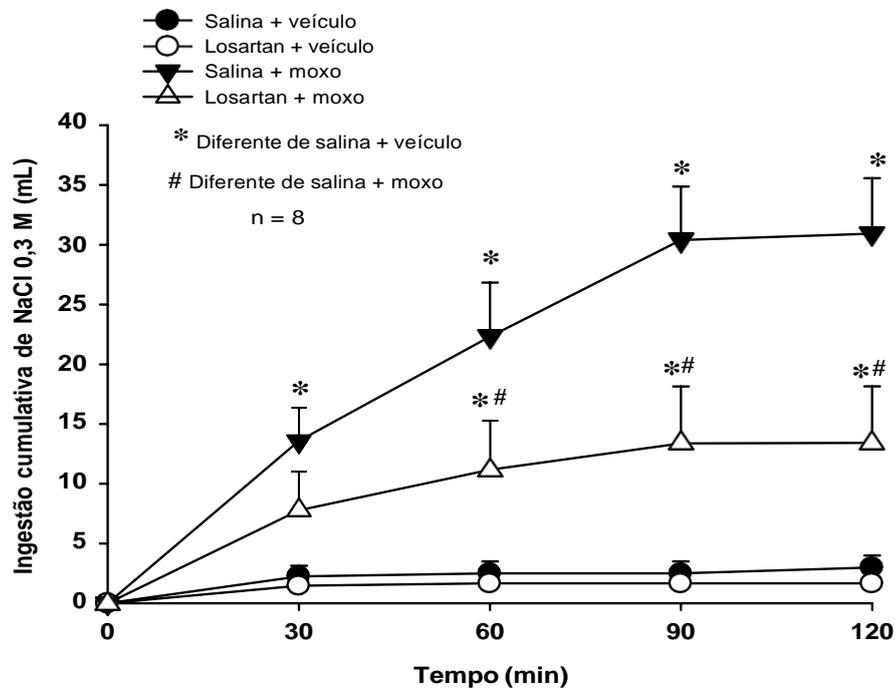
Em ratos tratados com injeção de salina na ASM, as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M (30,9 ± 4,7, vs. salina ASM + veículo NPBL: 3,0 ± 1,0 mL/120 min) e de água (18,4 ± 2,6, vs. salina ASM + veículo NPBL: 9,6 ± 1,2 mL/120 min) (Figuras 8 e 9).

Para a ingestão de NaCl 0,3 M, ANOVA mostrou diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 13,51; p < 0,001], entre tempos [F (3, 21) = 23,69; p < 0,001] e interação

significante entre tratamento e tempo [$F(9, 63) = 9,22$; $p < 0,001$] (Figura 8). Para ingestão de água, ANOVA mostrou diferenças significantes entre tratamentos [$F(3, 21) = 4,7$; $p = 0,01$], entre tempos [$F(3, 21) = 36,83$; $p < 0,001$] e também interação significativa entre tratamento e tempo [$F(9, 63) = 6,58$; $p < 0,001$] (Figura 9).

As injeções de losartana ($10 \mu\text{g}/0,5 \mu\text{l}$) na ASM reduziram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M e de água em ratos tratados com moxonidina no NPBL ($13,4 \pm 4,8$ e $12,6 \pm 3,1$ mL/120 min, respectivamente) (Figuras 8 e 9).

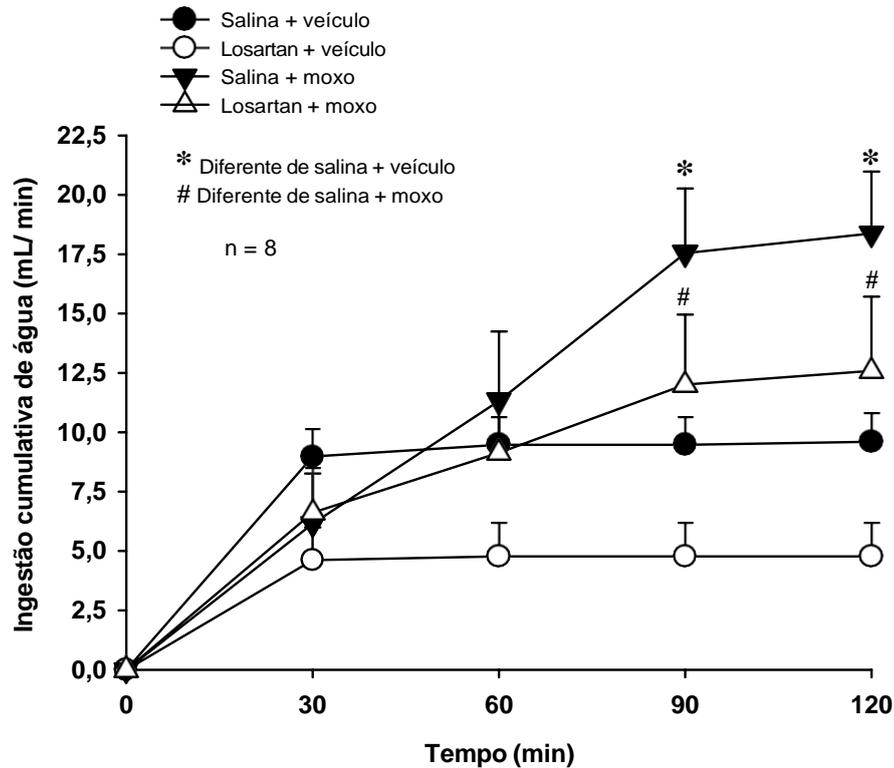
Figura 8 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de moxonidina ($0,5 \text{ nmol}/0,2 \mu\text{l}$) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de losartana ($10 \mu\text{g}/0,5 \mu\text{l}$) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. $n =$ número de animais.



Fonte: elaboração própria.

Figura 9 - Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril sc que receberam injeções bilaterais de moxonidina ($0,5 \text{ nmol}/0,2 \mu\text{l}$) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de losartana ($10 \mu\text{g}/0,5$

μl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. $n =$ número de animais.



Fonte: elaboração própria.

4.5 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL uni ou bilateralmente combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM ou parcialmente na ASM

As injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μl) fora do NPBL não produziram modificações significantes da ingestão de NaCl 0,3 M nos ratos que receberam injeção de salina na ASM ($17,6 \pm 7,7$ mL/120 min) comparando-se com veículo fora do NPBL + salina ASM ($4,6 \pm 1,2$ mL/120 min) ou losartana (10 $\mu\text{g}/0,5$ μl) na ASM ($13,1 \pm 3,6$ mL/120 min) [F (3, 15) = 2,50; $p = 0,1$] (Tabela 3). A ingestão de água também não foi diferente comparando-se o tratamento com salina na ASM + moxonidina fora do NPBL ($13,0 \pm 5,1$ mL/120 min) com o tratamento com salina na ASM + veículo fora do NPBL ($10,0 \pm 1,3$ mL/120 min) ou com o tratamento losartana na ASM + moxonidina fora do NPBL ($13,1 \pm 3,6$ mL/240 min) [F (3, 15) = 0,60; $p = 0,63$] (Tabela 3).

As injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μl) fora do NPBL também não produziram modificações significantes da ingestão de NaCl 0,3 M nos ratos que receberam injeção de salina

parcialmente fora da ASM ($17,2 \pm 7,0$ mL/120 min) comparando-se com veículo fora do NPBL + salina parcialmente fora da ASM ($4,4 \pm 2,1$ mL/120 min) ou losartana ($10 \mu\text{g}/0,5 \mu\text{l}$) na ASM ($10,5 \pm 1,6$ mL/120 min) [F(3, 6) = 3,44; p = 0,09] (Tabela 4). A ingestão de água também não foi diferente comparando-se o tratamento com salina parcialmente fora da ASM + moxonidina fora do NPBL ($20,5 \pm 5,4$ mL/120 min) com o tratamento com salina parcialmente fora da ASM + veículo fora do NPBL ($9,0 \pm 2,6$ mL/120 min) ou com o tratamento losartana parcialmente fora da ASM + moxonidina fora do NPBL ($8,7 \pm 3,9$ mL/120 min) [F 3, 6 = 338, P = 0,1] (Tabela 4).

Tabela 3 - Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL uni ou bilateralmente combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM.

Tratamento (n = 6)	Ingestão de NaCl 0,3 M (mL/120 min)
Moxonidina + salina	$17,6 \pm 7,7$
Moxonidina + losartana	$13,1 \pm 3,6$
Veículo + losartana	$3,5 \pm 0,9$
Veículo + salina	$4,6 \pm 1,2$
	Ingestão de água (mL/120 min)
Moxonidina + salina	$13,0 \pm 5,1$
Moxonidina + losartana	$13,1 \pm 3,6$
Veículo + losartana	$8,3 \pm 2,2$
Veículo + salina	$10,0 \pm 1,3$

Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais. Moxonidina ($0,5 \text{ nmol}/0,2 \mu\text{l}$), losartana ($10 \mu\text{g}/0,5 \mu\text{l}$), furosemida ($10 \text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal), captopril ($5 \text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal).
Fonte: elaboração própria.

Tabela 4 - Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL uni ou bilateralmente combinadas com injeção de losartana ou salina parcialmente na ASM.

Tratamento (n = 3)	Ingestão de NaCl 0,3 M (mL/120 min)
Moxonidina + salina	17,2 ± 7,0
Moxonidina + losartana	10,5 ± 1,6
Veículo + losartana	1,8 ± 1,0
Veículo + salina	4,4 ± 2,1
	Ingestão de água (mL/120 min)
Moxonidina + salina	20,5 ± 5,4
Moxonidina + losartana	8,7 ± 3,9
Veículo + losartana	5,7 ± 2,9
Veículo + salina	9,0 ± 2,6

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl), losartana (10 µg/0,5 µl), furosemida (10 mg/kg de peso corporal), captopril (5 mg/kg de peso corporal).
Fonte: elaboração própria.

4.6 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos tratados com injeções subcutâneas de furosemida + captopril e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL bilateralmente combinadas com injeção de atropina ou salina na ASM

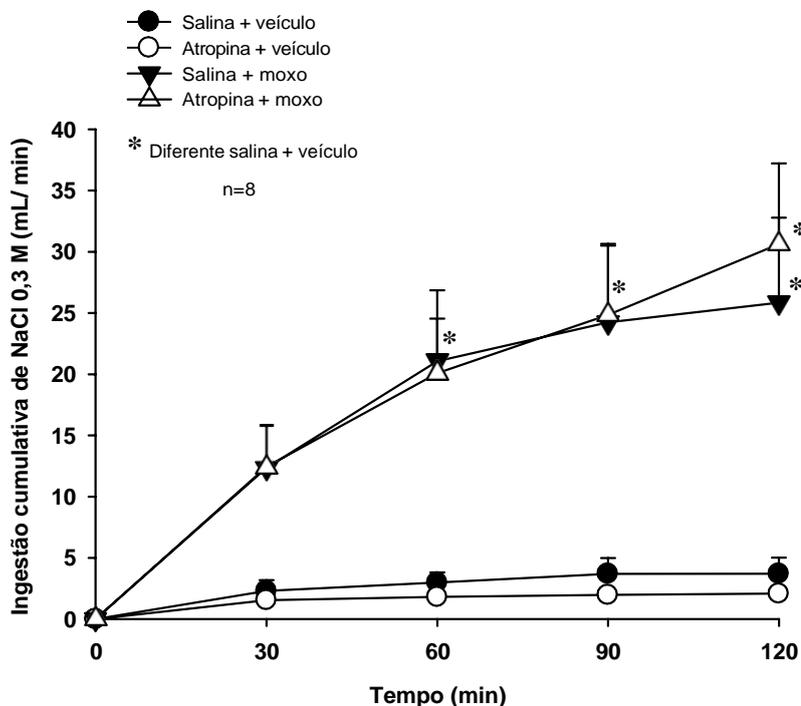
Em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeção de salina na ASM, as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M (25,9 ± 7,0, vs. salina ASM + veículo NPBL: 3,7 ± 1,3 mL/120 min), mas não modificaram a ingestão de água (15,8 ± 3,1, vs. salina ASM + veículo NPBL: 9,3 ± 1,2 mL/120 min) (Figuras 10 e 11).

As injeções de atropina (2 nmol/0,5 µl) na ASM não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M e de água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de moxonidina no NPBL (30,7 ± 6,6 e 12,9 ± 4,1 mL/120 min, respectivamente) (Figuras 10 e 11).

Houve diferença na ingestão de água comparando-se o tratamento com atropina na ASM + veículo no NPBL com os tratamentos salina ou atropina na ASM + moxonidina no NPBL (Figura 11).

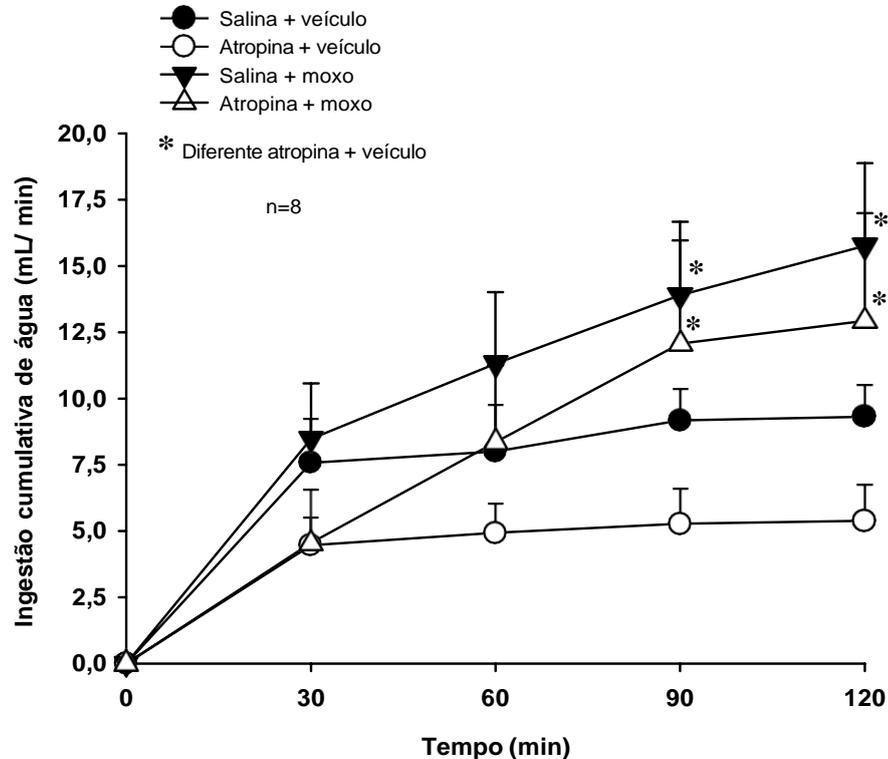
Para a ingestão de NaCl 0,3 M, ANOVA mostrou diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 12,51; p < 0,001], entre tempos [F (3, 21) = 10,19; p < 0,001] e interação significativa entre tratamento e tempo [F (9, 63) = 7,00; p < 0,001] (Figura 10). Para ingestão de água, ANOVA mostrou diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 3,46; p = 0,035], entre tempos [F (3, 21) = 13,72; p < 0,001], e também interação significativa entre tratamento e tempo [F (9, 63) = 2,29; p = 0,027] (Figura 11).

Figura 10 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 µl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias ± EPM. Diferenças significantes para p < 0,05 de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais.



Fonte: elaboração própria.

Figura 11 - Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento com FURO +CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL combinadas com injeção de atropina (2 nmol/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais.



Fonte: Elaboração própria.

4.7 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos submetidos a 24 h de depleção de sódio e que receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção de losartana ou salina na ASM

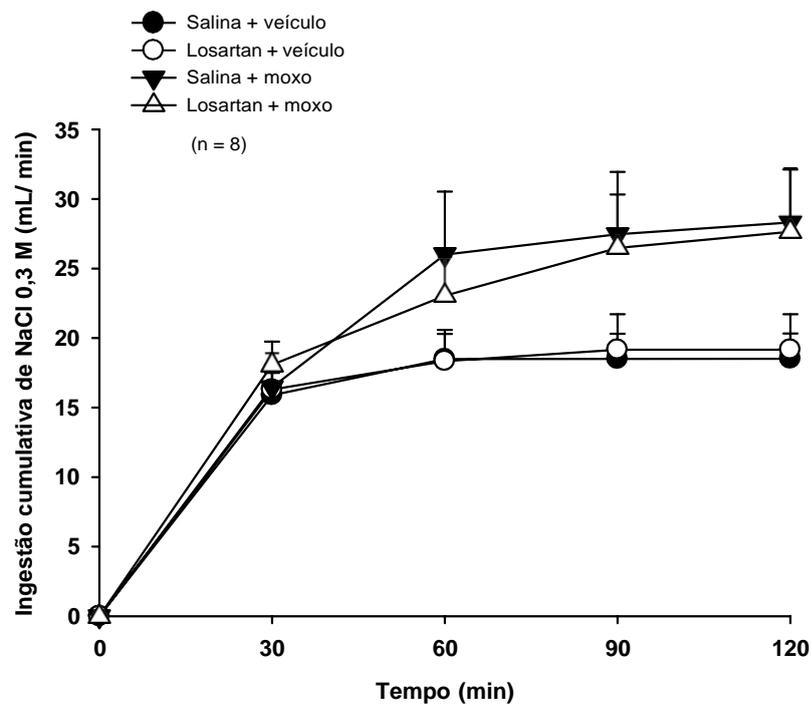
Para estes tratamentos não foi possível se obter um grupo de animais com injeções localizadas no NPBL. Assim, foram analisados os resultados dos tratamentos com injeções na ASM e injeções fora do NPBL, para se verificar se injeções de losartana na ASM poderia modificar a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com 24 h de depleção de sódio na ausência de injeções de moxonidina no NPBL.

Para a ingestão de NaCl 0,3 M, ANOVA não mostrou diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 1,58; $p = 0,22$]. Houve diferença entre tempos [F (3, 21) = 12,35; $p < 0,001$] e interação significativa entre tratamento e tempo [F (9, 63) = 2,85; $p = 0,007$] (Figura 12). Assim, houve apenas uma tendência de aumento da ingestão de NaCl 0,3 M após o tratamento com salina na ASM + moxonidina fora do NPBL em ratos com 24 h de depleção de sódio. Em ratos tratados com injeção de losartana (10 μ g/0,5 μ l) na ASM + moxonidina (0,5

nmol/0,2 µl) fora do NPBL, não houve alteração significativa na ingestão de NaCl 0,3 M em comparação com o tratamento com salina na ASM + moxonidina fora do NPBL (Figura 12). A injeção de losartana na ASM também não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M após a injeção de veículo no fora do NPBL em comparação com a injeção de salina na ASM + veículo fora do NPBL (Figura 12).

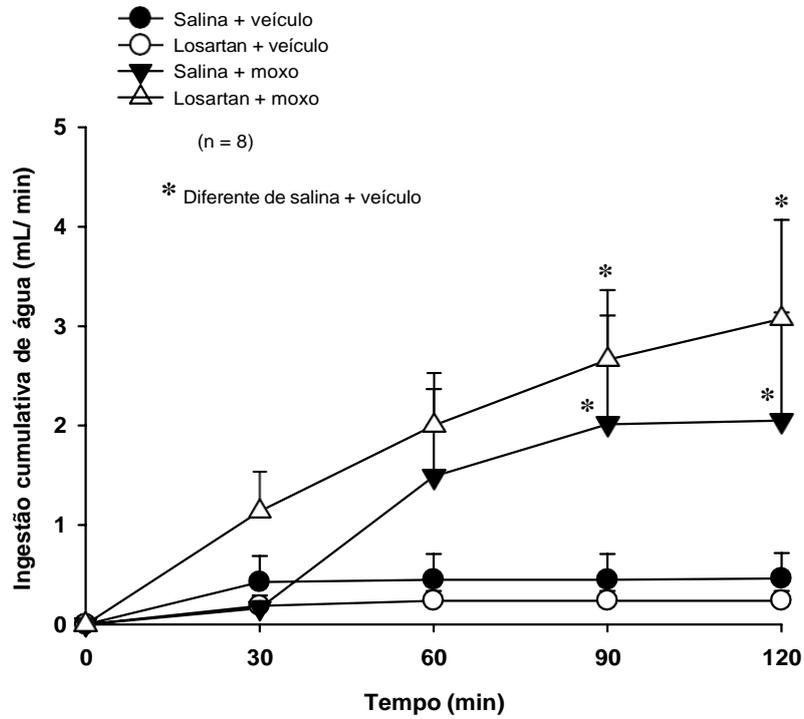
Para ingestão de água, ANOVA mostrou diferenças significantes entre tratamentos [F (3, 21) = 3,74; p = 0,027], entre tempos [F (3, 21) = 5,20; p = 0,008] e também interação significativa entre tratamento e tempo [F (9, 63) = 2,12; p = 0,041] (Figura 13). As injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) fora do NPBL combinadas com injeção de salina na ASM aumentaram a ingestão de água em ratos com 24 h de depleção de sódio (Figura 13). A injeção de losartana (10 µg/0,5 µl) na ASM não modificou a ingestão de água em ratos tratados com moxonidina fora do NPBL ($3,1 \pm 1,0$ mL/120 min) em comparação com o tratamento com salina na ASM + moxonidina fora do NPBL ($2,1 \pm 1,0$ mL/120 min) (Figura 13). Também não houve modificação da ingestão de água comparando-se injeção de losartana na ASM + veículo fora do NPBL com injeção de salina na ASM + veículo fora do NPBL (Figura 13).

Figura 12 - Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos com 24 h de depleção de sódio tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção de losartana (10 µg/0,5 µl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para p < 0,05 de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais.



Fonte: elaboração própria

Figura 13 - Ingestão cumulativa de água em ratos com 24 h de depleção de sódio tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo fora do NPBL combinadas com injeção de losartana (10 μ g/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Diferenças significantes para $p < 0,05$ de acordo com Student Newman Keuls test. n = número de animais



Fonte: elaboração própria.

5 DISCUSSÃO

Em conjunto, os resultados demonstram a importância da ASM para o controle da ingestão de NaCl 0,3 M com envolvimento tanto de seus receptores AT1 como colinérgicos muscarínicos. Porém, este efeito facilitatório da ASM sobre a ingestão de NaCl 0,3 M só se torna evidente após a desativação dos mecanismos inibitórios com a injeção de moxonidina ou muscimol no NPBL. Isso sugere que os mecanismos facilitatórios da ingestão de NaCl da ASM normalmente estão inibidos pela ação dos mecanismos inibitórios do NPBL. Ou seja, a ativação dos receptores AT1 ou muscarínicos da ASM normalmente produzem respostas dipsogênicas, mas não ingestão de NaCl porque esta última se encontra inibida por ação dos mecanismos inibitórios do NPBL. Assim, a ativação dos mecanismos angiotensinérgicos ou colinérgicos muscarínicos da ASM não consegue estimular a ingestão de NaCl enquanto o mecanismo inibitório do NPBL estiver em atividade. Mas ao se desativar os mecanismos inibitórios do NPBL, a ativação dos mecanismos muscarínicos e/ou angiotensinérgicos da ASM por tratamentos como FURO + CAP podem atuar estimulando a ingestão de NaCl. Isso explica porque os estudos anteriores não tiveram êxito em demonstrar ingestão de NaCl com a injeção de ANG II na ASM.

Além de apresentarem um aumento na ingestão de NaCl 0,3 M, ratos tratados com moxonidina no NPBL associada com o tratamento com FURO + CAP ou ratos que receberam tratamento com muscimol no NPBL também apresentaram aumento na ingestão de água. O aumento da ingestão de água pode ser devido ao tratamento no NPBL, mas também pode ser consequência do aumento na osmolaridade produzido pela excessiva ingestão de NaCl hipertônico, já que água e NaCl 0,3 M estavam simultaneamente disponíveis para ingestão. Embora os mecanismos do NPBL também possam inibir a ingestão de água (MENANI;

JOHNSON, 1995), injeções bilaterais de muscimol no NPBL de ratos saciados e normovolêmicos causam apenas uma pequena ingestão de água quando somente água está disponível (CALLERA et al., 2005), o que é um indicativo que a maior parte do aumento na ingestão de água com este tratamento é secundária ao aumento na osmolaridade plasmática. Por isso, a principal razão para a redução da ingestão de água em ratos tratados com muscimol no NPBL combinado com injeções de atropina ou losartana na ASM é, provavelmente, o decréscimo na ingestão de NaCl 0,3 M. O mesmo valeria para a ingestão de água induzida por FURO + CAP em ratos tratados com moxonidina no NPBL combinada com losartana na ASM.

Enquanto a injeção de losartana na ASM reduziu tanto a ingestão de NaCl nos ratos tratados com muscimol no NPBL como aquela dos ratos tratados com FURO + CAP combinado

com moxonidina no NPBL, a injeção de atropina na ASM reduziu apenas a ingestão de NaCl dos ratos tratados com muscimol no NPBL. Estes diferentes efeitos ou ausência de efeito da atropina em ratos tratados com FURO + CAP combinado com moxonidina no NPBL são semelhantes àqueles obtidos por Roncari et al. (2017) com injeções icv de atropina. De acordo com Roncari et al. (2017), os mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos fazem parte do circuito neural ativado para estimular a ingestão de NaCl, além da ingestão de água. Este circuito está organizado de forma que a sinapse colinérgica antecede a sinapse angiotensinérgica, ou seja, a ativação da via colinérgica muscarínica estimularia a liberação de ANG II que seria o mediador facilitador final da ingestão de NaCl. No caso da ingestão de NaCl nos ratos tratados com muscimol no NPBL, haveria a participação dos mecanismos colinérgicos muscarínicos e angiotensinérgicos. Assim, haveria uma liberação inicial de acetilcolina que estimularia a liberação de ANG II, podendo ocorrer bloqueio da ingestão de NaCl bloqueando-se a ação da acetilcolina ou da ANG II. Nos ratos tratados com FURO + CAP a ingestão de NaCl é mediada pela liberação de ANG II (THUNHORST; JOHNSON, 1994; FITTS; MASSON, 1989). Esta atuação diretamente na via final não necessitando da ação da acetilcolina. Por isso, apenas o losartana, mas não a atropina é eficiente em bloquear a ingestão de NaCl em ratos tratados com FURO + CAP.

É importante considerar que o tratamento com muscimol no NPBL leva à ingestão de significativas quantidades de NaCl 0,3 M porque abole o mecanismo inibitório do NPBL. Atuando em receptores GABA_A, o muscimol bloquearia a atividade neuronal do NPBL (CALLERA et al, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2007), abolindo dessa forma a ação dos mecanismos inibitórios do NPBL, o que liberaria a ingestão de NaCl em animais saciados sem a necessidade de uma ação adicional de estímulos facilitatórios. O equilíbrio entre ações de mecanismos facilitatórios e inibitórios da ingestão de sódio resulta em saciedade. O rompimento deste equilíbrio pela remoção do mecanismo inibitório permitiria que qualquer atividade residual de mecanismos facilitatórios leve a ingestão de quantidades significativas de NaCl (CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2007). Os presentes resultados com injeção de atropina ou losartana na ASM sugerem que os mecanismos colinérgicos muscarínicos e angiotensinérgicos da ASM estão sob controle dos mecanismos inibitórios do NPBL. Quando há uma desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL pela ação do muscimol no NPBL, a atividade de mecanismos colinérgicos muscarínicos ou angiotensinérgicos da ASM atuam facilitando a ingestão de NaCl e o resultado é a ingestão de uma quantidade significativa de NaCl 0,3 M.

O tratamento com FURO + CAP sc causa depleção de fluidos (pela ação do furosemida) com aumento da ANG II centralmente, pois a dose baixa de captopril bloqueia a enzima conversora apenas periféricamente, mas não centralmente, o que permite que a ANG II formada centralmente continue atuando, produzindo ingestão de água e NaCl (THUNHORST; JOHNSON, 1994; FITTS; MASSON, 1989). Apenas o tratamento com FURO + CAP produz ingestão de água e de NaCl 0,3 M. A injeção de moxonidina sozinha no NPBL em ratos normovolêmicos não modifica a ingestão de NaCl ou água. Mas a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP é aumentada pelo bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL com moxonidina, o que indica que os mecanismos inibitórios do NPBL atuam limitando a ingestão de água e NaCl 0,3 M estimulada pelo tratamento com FURO + CAP sc. A injeção de losartana na ASM não modifica a ingestão de água e de NaCl 0,3 M produzida apenas pelo tratamento com FURO + CAP, mas abole o aumento da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzido pela injeção de moxonidina no NPBL, indicando que apenas o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M depende da ação da ANG II na ASM. E este resultado também sugere mais uma vez que os mecanismos angiotensinérgicos da ASM estão sob controle dos mecanismos inibitórios do NPBL.

De maneira semelhante ao que aconteceu com o tratamento com FURO + CAP sc, a injeção de losartana na ASM não modificou a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com 24 h de depleção de sódio, sugerindo que os mecanismos angiotensinérgicos da ASM não participam da ingestão de água e NaCl 0,3 M estimulada por 24 h de depleção de sódio. Para estes tratamentos não foi possível se obter um grupo de animais com injeções localizadas no NPBL. Assim, foram analisados os resultados dos tratamentos com injeções na ASM e injeções fora do NPBL, para se verificar se injeções de losartana na ASM poderia modificar a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com 24 h de depleção de sódio na ausência de injeções de moxonidina no NPBL. Embora tenha ocorrido uma tendência de aumento da ingestão de NaCl 0,3 M após injeção de moxonidina fora do NPBL, a ingestão não foi estatisticamente significativa. No entanto, a ingestão de água aumentou após as injeções de moxonidina fora do NPBL. A tendência de aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e o aumento da ingestão de água após as injeções de moxonidina pode ser explicada porque em alguns ratos a injeção de moxonidina foi feita muito próximo do NPBL de forma que pudesse ocorrer algum espalhamento da droga chegando alguma quantidade da droga até o NPBL. Em outros ratos, a injeção de moxonidina atingiu parcialmente o NPBL, de forma que algum efeito pudesse aparecer. Mas em nenhum dos ratos as injeções puderam ser caracterizadas como precisamente localizadas no NPBL. Por isso, foram classificadas como injeções fora do NPBL. Embora

nenhum estudo anterior tenha investigado os efeitos da injeção de moxonidina sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com 24 horas de depleção de sódio, esperava-se aumento da ingestão de NaCl 0,3 M após as injeções de moxonidina no NPBL em ratos com 24 h de depleção de sódio, à semelhança do que ocorreu nos ratos tratados com FURO + CAP. Sabe-se que a desativação dos mecanismos inibitórios com injeções de metisergida (antagonista serotoninérgico) no NPBL aumenta a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos com 24 de depleção de sódio (MENANI et al., 1998) e o mesmo era esperado para as injeções de moxonidina no NPBL.

Resultados anteriores já haviam mostrado que a desativação dos mecanismos inibitórios com injeção de moxonidina no NPBL aumentava significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M após a injeção de ANG II na ASM (resultados ainda não publicados). A injeção de ANG II na ASM em ratos tratados com veículo no NPBL causa ingestão de água, mas produz ingestão de quantidades insignificantes de NaCl 0,3 M. Porém, ingestão de quantidade significantes de NaCl 0,3 M aparece somente quando a injeção de ANG II na ASM é combinada com injeção de moxonidina no NPBL. Esses resultados sugeriram pela primeira vez, que mecanismos angiotensinérgicos da ASM são facilitatórios para ingestão de NaCl, contrariamente a vários estudos no passado que concluíram que mecanismos angiotensinérgicos da ASM não estariam envolvidos com a ingestão de NaCl (NICOLAIDIS; EL GHISSASSI, 1991; EL GHISSASSI et al., 1995). Hoje se pode sugerir que a ausência de efeitos da ANG II injetada na ASM sobre a ingestão de NaCl em ratos sem tratamento no NPBL é devido à forte ação dos mecanismos inibitórios do NPBL, pois somente após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL ocorre uma significativa ingestão de NaCl com a injeção de ANG II na ASM. Isso é semelhante ao que ocorre com a injeção de ANG II no OSF. A injeção de ANG II no OSF em ratos saciados e normovolêmicos sem tratamento no NPBL também produz ingestão de água, mas praticamente nenhuma ingestão de NaCl 0,3 M. Mas após o bloqueio dos mecanismos inibitórios com injeção de moxonidina no NPBL, além de água, a injeção de ANG II no OSF induz ingestão de uma significativa quantidade de NaCl 0,3 M (RONCARI et al., 2014). Assim, fica claro que os mecanismos angiotensinérgicos em áreas como a ASM e o OSF são facilitadores da ingestão de NaCl. Porém, os efeitos sobre a ingestão de NaCl só vão aparecer após desativação dos mecanismos inibitórios. Sabendo-se que os mecanismos inibitórios são ativados pela atividade de receptores viscerais (osmorreceptores e receptores gustativos) ou receptores de volume (receptores cardiopulmonares), áreas como ASM ou OSF passariam a facilitar a ingestão de NaCl em caso de hipotensão ou redução de osmolaridade/redução de sódio plasmático, quando os receptores viscerais ou de volume estiverem com atividade

reduzida e se fizer necessário ingestão de NaCl para recuperar volume ou sódio plasmático (MENANI et al., 2014).

Sabe-se que a estimulação colinérgica da ASM além de produzir ingestão de água também produz natriurese e antidiurese (LUIZ et al., 1991; COLOMBARI et al., 1992; COLOMBARI et al., 1994; PAULIN et al., 2009), o que sugere uma ação dos mecanismos colinérgicos da ASM visando evitar hiperosmolaridade. Os presentes resultados sugerem que além desta ação, os mecanismos colinérgicos da ASM poderiam participar do controle da hipovolemia por meio da ingestão de água e NaCl. Por outro lado, se sabe que a hiperosmolaridade que classicamente levaria a estimulação apenas da ingestão de água, também pode facilitar a ingestão de NaCl quando os mecanismos inibitórios da ingestão de NaCl estão desativados pela injeção de metisergida ou moxonidina no NPBL (DE LUCA et al., 2003; ANDRADE et al., 2006). Assim, ratos que receberam sobrecarga intragástrica com 2 mL de NaCl 2 M combinada com injeção de moxonidina no NPBL ingeriram além de água uma quantidade significativa de NaCl 0,3 M (ANDRADE et al., 2006). Segundo De Luca et al (2003), estímulos que levam a ingestão de água (incluindo hiperosmolaridade) também estimulam a ingestão de NaCl. Porém, ao mesmo tempo a hiperosmolaridade ativaria um circuito paralelo que aciona mecanismos inibitórios da ingestão de NaCl impedindo que apareça apetite ao NaCl numa condição de hiperosmolaridade. O bloqueio dos mecanismos inibitórios com injeção de moxonidina no NPBL removeria a restrição para a ingestão de NaCl e o animal numa condição de hiperosmolaridade passa a ingerir quantidades significativas de NaCl 0,3 M em adição a água (DE LUCA et al., 2003).

Normalmente a redução da volemia leva à desativação dos mecanismos inibitórios permitindo que os mesmos estímulos que causam sede, também produzam apetite ao NaCl. Assim, a ANG II que é normalmente liberada numa situação de hipovolemia, leva a ingestão de água e NaCl. Em situação de saciedade e normovolemia, os mecanismos inibitórios do NPBL atuam protegendo contra ingestão de NaCl evitando que ocorra hiperosmolaridade e expansão de volume. Mas uma vez desativados os mecanismos inibitórios com injeção de moxonidina ou de muscimol no NPBL, a presença de estímulos facilitatórios, mesmo de pequena intensidade é suficiente para que os animais apresentem um significativo apetite ao NaCl.

Com os presentes resultados, é possível modificar o diagrama da Figura 1, de forma a incorporar mais uma área envolvida no controle da ingestão de NaCl, a ASM. Assim, além do OSF/OVLT, pode-se acrescentar a ASM como uma das áreas envolvidas com o controle da ingestão de NaCl que está sob influência dos mecanismos inibitórios do NPBL. A ASM deve enviar projeções para a área de integração de sinais quer diretamente ou por conexões com o

OVLТ. O balanço da intensidade de sinais facilitatórios e inibitórios que alcançam a área de integração é que vai determinar saciedade ou apetite ao NaCl. Mais estudos são necessários para se saber como as áreas OSF, OVLТ e ASM estão conectadas entre si e com a área de integração, assim como qual seria a área de integração.

6 CONCLUSÃO

Os presentes resultados sugerem que mecanismos angiotensinérgicos AT1 e colinérgicos muscarínicos da ASM fazem parte dos mecanismos facilitatórios da ingestão de NaCl. Adicionalmente, os resultados sugerem que os mecanismos angiotensinérgicos AT1 e colinérgicos muscarínicos da ASM são fortemente inibidos pelos mecanismos inibitórios da ingestão de NaCl do NPBL e estes, tornam-se evidentes quando o mecanismo inibitório do NPBL é desativado.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. A. F. *et al.* Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, p. 25–34, 2004.
- ANDRADE, C. A. F. *et al.* Alpha₂-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21-28, 2006.
- ASNAR, D. S. *et al.* Involvement of central cholinergic mechanisms on sodium intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neurosci Lett.**, v. 534, p. 188-192, 2013.
- BARBOSA, S. P. *et al.* Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. **Brain Res Bull**, v. 37, p. 463-466, 1995.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 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*: MARTINI, L.; GANONG, W. F. (Orgs.). **Frontiers in Neuroendocrinology**. New York: Raven Press, 1980.
- CALLERA, J. C. *et al.* GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v.134, p. 725-735, 2005.
- COLOMBARI, D. S. *et al.* Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 33, p. 249-54, 1994.
- COLOMBARI, E. *et al.* AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. **Brain Research.**, v. 572, p. 172-175, 1992
- COVIAN, M. R. *et al.* Central control of salt balance. *In*: MOGENSEN, G. J.; CALARESU, F. R. **Neural Integration of Physiological Mechanisms and Behaviour**. Toronto: University of Toronto Press, 1975.
- DE LUCA JUNIOR, L. A.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 1055-1061, 2003.
- DE LUCA JUNIOR, L. A.; DINIZ, D. L. Antunes-Rodrigues J Effect of atropine injection into the medial septal area on food-associated drinking. **Braz J Med Biol Res.**, v. 21, p. 573-575, 1988.
- DE OLIVEIRA, L. B. *et al.* GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial núcleo on sodium appetite. **Brain Res Bull**, v. 73, p. 238-247, 2007

EL GHISSASSI, M.; THORNTON, S. N.; NICOLAÏDIS, S. Angiotensin II-induced thirst, but not sodium appetite, via AT1 receptors in organum cavum prelamina terminalis. **Am J Physiol.**, v. 268, p. 1401-145, 1995.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2006.

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

LUIZ A. C. *et al.* Pressor, dipsogenic, natriuretic and kaliuretic response to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area. **Neurosci Lett**, v. 132, p. 195-198, 1991.

MENANI J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 275, p. 1431-1437, 1998.

MENANI, J. V.; DE LUCA JÚNIOR, L. A.; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 306, p. 201-10, 2014.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 269, p. 1044-1049, 1995.

MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 270, p. 162-R168, 1996.

NEGRO-VILAR, A.; GENTIL, C. G.; COVIAN, M. Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in rats. **PhysiolBehav.**, v. 2, p.167-70, 1967.

NICOLAÏDIS, S. E. L.; GHISSASSI, M. Organum cavum pre-lamina terminalis, an undescribed brain organ in rats: morphology and physiology. **Am J Physiol.**, v. 260, p. 396-406, 1991.

PAULIN, R. F. *et al.* Role of the medial septal area on pilocarpine-induced salivary secretion and water intake. **Brain Research.**, v. 1298, p. 145-152, 2009.

PHILLIPS, M. I.; SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regulatory Peptides**, v. 78, n. 1-3, p. 1-11, 1998.

ROCHA, M. J. A.; FRANCI, C.R.; ANTUNES RODRIGUES, J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MSA) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). **Physiology & behavior**, v. 34, p. 23-28, 1985.

RONCARI, C. F. *et al.* Angiotensinergic and cholinergic receptors of the subfornical organ mediate sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience.**, v. 262, p. 1-8, 2014.

RONCARI, C. F. *et al.* The lateral parabrachial nucleus and central angiotensinergic mechanisms in the control of sodium intake induced by different stimuli. **Behav Brain Res.**, v. 333, p. 17-26, 2017.

SAAD, W. A. *et al.* Natriuresis, kaliuresis and diuresis in the rat following microinjections of carbachol into the septal area. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 3, p. 985-992, 1975.

THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 266, p. 458-465, 1994.