

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

CAROLINA GUESSER PAVAN

**MECANISMOS ENVOLVENDO RECEPTORES OPIÓIDES μ DO NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO**

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**MECANISMOS ENVOLVENDO RECEPTORES OPIÓIDES μ DO NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO**

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

Aluno: Carolina Guesser Pavan

Orientador: José Vanderlei Menani

Araraquara

2012

AGRADECIMENTOS

A minha família, por sempre estar presente em minha vida, me incentivando e apoiando em todos os momentos.

Aos meus colegas e funcionários do laboratório, pela ajuda e pela ótima convivência durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani, por ter contribuído de forma tão enriquecedora com a minha formação, pela paciência, sabedoria e pela confiança em meu trabalho.

Ao CNPq/PIBIC por financiar o projeto de pesquisa durante minha iniciação científica.

SUMÁRIO

4. INTRODUÇÃO.....	11
5. OBJETIVOS	16
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
6.1. Animais.....	17
6.2. Cirurgia cerebral.....	17
6.3. Injeção de drogas no encéfalo	18
6.4. Drogas utilizadas	18
6.5. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos saciados e normohidratados.....	18
6.6. Histologia encefálica para localização dos pontos das injeções cerebrais	19
6.7. Apresentação dos resultados e estatística	19
7. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	20
7.1. Experimento 1. <i>Efeitos da administração endomorfina (0,1; 0,25 ou 0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.</i>	20
7.2. Experimento 2. <i>Efeitos da administração endomorfina (1 ou 2 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.</i>	20
7.3. Experimento 3. <i>Efeitos da administração CTAP (1 ou 2 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.</i>	21
8. RESULTADOS	22

8.1. Experimento 1. <i>Efeitos da administração endomorfina (0,1; 0,25 ou 0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.</i>	22
8.2. Experimento 2. <i>Efeitos da administração endomorfina (1 ou 2 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.</i>	29
8.3. Experimento 3. <i>Efeitos da administração CTAP (1 ou 2 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.</i>	34
9. HISTOLOGIA	39
10. DISCUSSÃO	40
11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. RESUMO

No sistema nervoso central (SNC), mecanismos excitatórios e inibitórios atuam para controlar a ingestão de água e sódio. Importantes mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio foram recentemente descobertos no núcleo parabraquial lateral (NPBL). Um papel importante do NPBL seria integrar as informações ascendentes da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) e da área postrema (AP) que por sua vez poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrolítico, como núcleos específicos do hipotálamo e amígdala. Estudos prévios sugerem a presença de um importante mecanismo serotonérgico inibitório da ingestão de água e sódio no NPBL. Além do mecanismo serotonérgico também já foi demonstrado no NPBL a existência de um mecanismo colecistocinérgico que também exerce um papel inibitório sobre a ingestão de água e sódio. Em um estudo anterior em que se injetou um agonista e um antagonista inespecíficos de receptores opióides (β -endorfina e naloxona, respectivamente) no NPBL foi demonstrado que mecanismos opióides no NPBL podem modular o mecanismo inibitório da ingestão de água e sódio, porém não se sabia qual ou quais dos três subtipos de receptores opióides (μ , δ ou κ) estariam envolvidos nesse mecanismo.

Então, no presente estudo, o objetivo foi investigar o envolvimento dos receptores μ opióides do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com furosemida + captopril subcutaneamente em ratos. Foram utilizados ratos com cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL. Os animais receberam injeções bilaterais no NPBL do agonista específico de receptores μ opióides endomorfina-1 e do antagonista de receptores μ opióides D-Phe-Cys-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTAP), em diferentes doses, sozinhos ou combinados no NPBL, após o tratamento com o diurético furosemida (10 mg/kg de peso corporal) combinado com o inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (5 mg/kg de peso corporal). Injeções de endomorfina (0,1; 0,25 e 0,5 nmol/0,2 μ L)

bilateralmente no NPBL aumentaram a ingestão de água ($12,7 \pm 1,0$; $14,6 \pm 1,5$ e $14,3 \pm 1,3$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $9,9 \pm 0,8$ mL/3 h, $p < 0,05$) e de NaCl 1,8% ($9,5 \pm 1,4$; $11,2 \pm 1,8$ e $12,1 \pm 2,4$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $5,3 \pm 0,9$ mL/3 h, $p < 0,05$) após FURO + CAP sc., mostrando uma tendência de resposta dependente de dose. Injeções de endomorfina (1 e 2 nmol/0,2 μ L) bilateralmente no NPBL aumentaram de maneira semelhante a ingestão de água ($27,0 \pm 2,6$ e $27,3 \pm 2,2$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $12,8 \pm 1,0$ mL/3 h, $p < 0,05$) e de NaCl 1,8% ($21,1 \pm 2,4$ e $21,4 \pm 2,8$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $8,6 \pm 1,5$ mL/3 h, $p < 0,05$) após FURO + CAP sc., indicando que provavelmente estas doses produzem efeito máximo. Injeções do antagonista específico μ CTAP (2 nmol/0,2 μ L) bilateralmente no NPBL diminuíram a ingestão de NaCl 1,8% ($4,8 \pm 1,1$ mL/3 h, vs. sal: $10,7 \pm 1,9$ mL/3 h, $p < 0,05$) e não alteraram a ingestão de água ($13,1 \pm 1,3$ mL/3 h, vs. sal: $17,1 \pm 2,3$ mL/3 h, $p < 0,05$) após tratamento com FURO + CAP sc. Na dose menor, as injeções de CTAP (1 nmol/0,2 μ L) sozinho no NPBL não modificaram a ingestão de água ($11,45 \pm 1,4$ mL/2 h, vs. sal: $9,4 \pm 0,7$ mL/3 h, $p < 0,05$) e NaCl 1,8% ($6,3 \pm 1,6$ mL/2 h, vs. sal: $3,1 \pm 0,6$ mL/2 h, $p < 0,05$) induzida por FURO + CAP sc. No entanto, o pré-tratamento com CTAP (1 nmol/0,2 μ L) injetado no NPBL foi capaz de abolir o aumento da ingestão de NaCl 1,8% ($7,7 \pm 1,6$ mL/2 h, vs. sal.+endomorfina: $13,04 \pm 2,0$ mL/2 h, $p < 0,05$) produzido pelo tratamento com endomorfina (0,5 nmol/0,2 μ L) e não alterou a ingestão de água ($13,3 \pm 1,0$ mL/2 h, vs. sal.+endomorfina: $14,4 \pm 1,0$ mL/2 h, $p < 0,05$) após tratamento com FURO + CAP sc. Esses resultados sugerem que a ativação dos receptores opióides μ no NPBL facilitam a ingestão de sódio e água induzida por FURO + CAP sc, provavelmente porque reduzem a atividade do mecanismo inibitório presente no NPBL.

2. LISTA DE FIGURAS

Figura I: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (0,1 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	23
Figura II: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (0,1 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	24
Figura III: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (0,25 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	25
Figura IV: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (0,25 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	26
Figura V: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	27
Figura VI: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	28
Figura VII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (1 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	30

Figura VIII: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (1 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.....	31
Figura IX: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (2 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.....	32
Figura X: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de endomorfina (2 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	33
Figura XI: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de CTAP (2 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.....	35
Figura XII: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente seguidas de injeções bilaterais de CTAP (2 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL.	36
Figura XIII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de CTAP (1 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL.	37
Figura XIV: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de CTAP (1 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL.	38
Figura XV: Fotomicrografia de um corte histológico transversal de um encéfalo de animal, mostrando os locais das injeções no NPBL.....	39

3. LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II	angiotensina II
AP	área postrema
AS	área septal
AV3V	região anteroventral do terceiro ventrículo
CAP	Captopril
DOCA	Desoxicorticosterona
ECA	enzima conversora de angiotensina
FURO	furosemida
HL	hipotálamo lateral
icv	intracerebroventricular
NaCl	cloreto de sódio
NPBL	núcleo parabraquial lateral
NTSm	porção medial do núcleo do trato solitário
OSF	órgão subfornical
sc	subcutânea
SNC	sistema nervoso central

4. INTRODUÇÃO

A manutenção de uma concentração adequada de solutos nos líquidos corporais é essencial para que eles apresentem uma adequada osmolaridade. O principal soluto do líquido extracelular é o íon sódio, que juntamente com a água está constantemente sendo perdido para o meio ambiente pela respiração, suor e predominantemente pela excreção urinária. Essa perda é agravada em casos de diarreia, vômitos, etc. Todavia, a osmolaridade e o volume dos líquidos do organismo devem permanecer dentro de uma pequena faixa de variação para que haja um perfeito funcionamento das células e manutenção da pressão arterial. A regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos corporais exige que a entrada de água e eletrólitos seja igual à perda pelo corpo e, para tanto, a regulação envolve a ação integrada dos rins e do comportamento de ingestão de água e sódio.

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

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

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

Por outro lado, importantes mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio foram recentemente descobertos no núcleo parabraquial lateral (NPBL), (Ohman e Johnson, 1989; Edwards e Johnson 1991; Menani e cols., 1995; Ohman e Johnson, 1995; Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Menani e Johnson, 1998; De Gobbi e cols., 2000; Menani e cols., 2000; Andrade e cols., 2004, Callera e cols., 2005, De Gobbi e cols., 2005). O NPBL é uma

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

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

Recentemente foi demonstrado que também injeções bilaterais do agonista opióide inespecífico β -endorfina no NPBL induziu intensa ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos saciados e normovolêmicos, um efeito que foi bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista opióide inespecífico naloxona (De Oliveira et al., 2008).

Os receptores opióides são classificados em subtipos μ , δ e κ . A β -endorfina, assim como o naloxona injetados no NPBL em estudo anterior pode se ligar a qualquer um dos subtipos de receptores opióides. Assim, para se saber qual subtipo ou subtipos de receptores opióides do NPBL estariam envolvidos com o controle da ingestão de água e sódio seria interessante se testar os efeitos de agonistas e antagonistas de receptores opióides específicos injetados sozinhos ou combinados no NPBL sobre a ingestão de água e sódio em ratos. No presente estudo, foi proposto se investigar o possível papel de receptores μ opióides do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com furosemida + captopril subcutaneamente. Para tanto foram testados os efeitos da injeção do agonista específico de receptores μ opióide endomorfina sozinho ou combinado com o antagonista específico de receptores μ opióide D-Phe-Cys-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTAP) no NPBL sobre a ingestão de água e sódio induzida pelo tratamento com o diurético furosemida combinado com o bloqueador da enzima conversora captopril sc.

Uma hora após o tratamento com furosemida + captopril sc. ocorre uma significativa ingestão de água e sódio em decorrência de uma leve redução da pressão arterial e do aumento da formação de ANG II centralmente (Fitts e Masson, 1989; Thunhorst e Johnson, 1994). A redução da pressão arterial é consequência da perda de volume promovida pelo diurético e do bloqueio da formação de ANG II perifericamente pela ação do captopril. Porém, a dose de captopril utilizada é baixa e não consegue bloquear a enzima conversora centralmente. Com o bloqueio da enzima conversora perifericamente, ocorre aumento da disponibilidade de ANG I na corrente sanguínea que chegando ao cérebro é convertida em ANG II aumentando a

disponibilidade desta no cérebro. Portanto, a ação central da ANG II associada a uma leve redução da pressão arterial (10 a 15 mmHg) que ocorre entre 1 e 2 horas após o tratamento com furosemida + captopril sc. leva rapidamente a uma significativa ingestão de água e sódio.

5. OBJETIVOS

Investigar o possível envolvimento dos receptores opióides μ do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos previamente tratados com furosemida + captopril sc.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com pesos em torno de 300 g. Os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Fisiologia em gaiolas de aço inoxidável individuais, em salas climatizadas (24 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro 12-12 h, tendo disponível ração peletizada Biobase, água e NaCl 1,8% *ad libitum*.

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

6.2. Cirurgia cerebral

Para as cirurgias cerebrais, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos e para se determinar os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável. Nesses pontos foi feita a trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. As cânulas de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,5 mm e 12 mm de comprimento foram introduzidas no cérebro e fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica aderida a dois parafusos presos na calota craniana. Para o NPBL as cânulas foram implantadas bilateralmente, orientadas de acordo com as seguintes coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 4,1 mm abaixo da dura-máter.

6.3. Injeção das drogas no cérebro

As drogas dissolvidas em solução salina fisiológica foram injetadas no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ l), conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A agulha injetora era 2,0 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção foi 0,2 μ l em cada sítio no NPBL.

6.4. Drogas utilizadas

Agonista específico de receptores opióides μ endomorfina (0,1; 0,25; 0,5; 1 ou 2 nmol/0,2 μ l) e antagonista de receptores opióides μ D-Phe-Cys-Trp-Arg-Thr-Pen-Th NH₂ (CTAP) (1 ou 2 nmol/0,2 μ l), obtidos da Tocris, EUA, foram injetados centralmente. As drogas foram dissolvidas em solução salina. Salina foi injetada centralmente como controle.

O inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (5 mg/kg de peso corporal) e o diurético furosemida (10 mg/kg de peso corporal) obtidos da Sigma Chem. Co., USA, foram injetados subcutaneamente para induzir ingestão de água e NaCl 1,8%. O veículo utilizado para a diluição de todas as drogas foi solução salina.

6.5. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos saciados e normohidratados

A ingestão de água e de NaCl 1,8% foi induzida pelo tratamento com o diurético furosemida (10 mg/kg de peso corporal) combinado com o inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (5 mg/kg de peso corporal) injetados subcutaneamente (sc). Após as injeções de furosemida + captopril, os ratos foram mantidos sem acesso a água, NaCl 1,8% e ração por uma hora antes de se iniciarem as medidas de ingestão de água e de NaCl 1,8%. Quinze minutos antes do acesso a água e NaCl 1,8%, os animais receberam injeções de salina

ou endomorfina no NPBL, enquanto que veículo ou CTAP foram injetados no NPBL 30 minutos antes do acesso a água e NaCl 1,8%. Para o registro da ingestão de água e de NaCl 1,8% foram utilizados tubos graduados (divisão de 0,1 ml). A ingestão de água e NaCl 1,8% foi medida a cada 30 minutos durante 2 ou 3 horas.

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de NaCl 1,8%, os ratos não tiveram acesso à ração.

6.6. Histologia encefálica para localização das injeções centrais

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

6.7. Apresentação dos resultados e estatística

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

7. EXPERIMENTOS REALIZADOS

7.1. Experimento 1. *Efeitos da administração de endomorfina (0,1; 0,25 ou 0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.*

A ingestão de água e NaCl 1,8% foi estudada em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL tratados com furosemida + captopril sc. Os ratos receberam injeções de salina ou endomorfina (0,1; 0,25 ou 0,5 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL 45 min. após as injeções de furosemida + captopril. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 1,8%. As ingestões de NaCl 1,8% e água foram medidas a cada 30 min. durante 3 h. Durante o período de teste os ratos não tiveram acesso a ração.

O grupo de ratos foi submetido a quatro tratamentos no NPBL: salina e 3 doses diferentes de endomorfina. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento no NPBL. A sequência de tratamentos no NPBL foi aleatória e no final dos experimentos todos os animais receberam todos os tratamentos no NPBL.

7.2. Experimento 2. *Efeitos da administração de endomorfina (1 ou 2 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.*

Os ratos tratados com furosemida + captopril sc. foram submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 1 acima, exceto que foi injetado endomorfina (1 ou 2 nmol/0,2 µL) no NPBL.

7.3. Experimento 3. Efeitos da administração de CTAP (1 ou 2 nmol/0,2 μ L) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 μ L) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.

Em um grupo, a ingestão de água e NaCl 1,8% foram estudadas em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL tratados com furosemida + captopril sc. Os ratos receberam injeções de salina ou CTAP (2 nmol/0,2 μ l) bilateralmente no NPBL 30 min. após as injeções de furosemida + captopril. Trinta minutos após as injeções no NPBL, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 1,8%. As ingestões de NaCl 1,8% e água foram medidas a cada 30 min. durante 3 h.

Em outra série de experimentos, os ratos receberam injeções de salina ou CTAP (1 nmol/0,2 μ l) bilateralmente no NPBL 30 min. após as injeções de furosemida + captopril e 15 min. após, receberam injeções de endomorfina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina. Quinze minutos após a última injeção no NPBL, os ratos tiveram acesso à água e à solução de NaCl 1,8%. As ingestões de NaCl 1,8% e água foram medidas a cada 30 min. durante 2 h.

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

8. RESULTADOS

8.1. Experimento 1. *Efeitos da administração de endomorfina (0,1; 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.*

Injeções de endomorfina (0,1; 0,25 ou 0,5 nmol/0,2 µL) bilateralmente no NPBL aumentaram a ingestão de água ($12,7 \pm 1,0$; $14,6 \pm 1,5$ e $14,3 \pm 1,3$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $9,9 \pm 0,8$ mL/3 h) [$F(1, 10) = 8,0$; $F(1, 10) = 8,9$; $F(1, 10) = 7,9$; respectivamente, $p < 0,05$] e de NaCl 1,8% ($9,5 \pm 1,4$; $11,2 \pm 1,8$ e $12,1 \pm 2,4$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $5,3 \pm 0,9$ mL/3 h) [$F(1, 10) = 30,7$; $F(1, 10) = 25,9$; $F(1, 10) = 12,1$; respectivamente, $p < 0,05$] após o tratamento furosemida + captopril sc. (Figuras I, II, III, IV, V e VI).

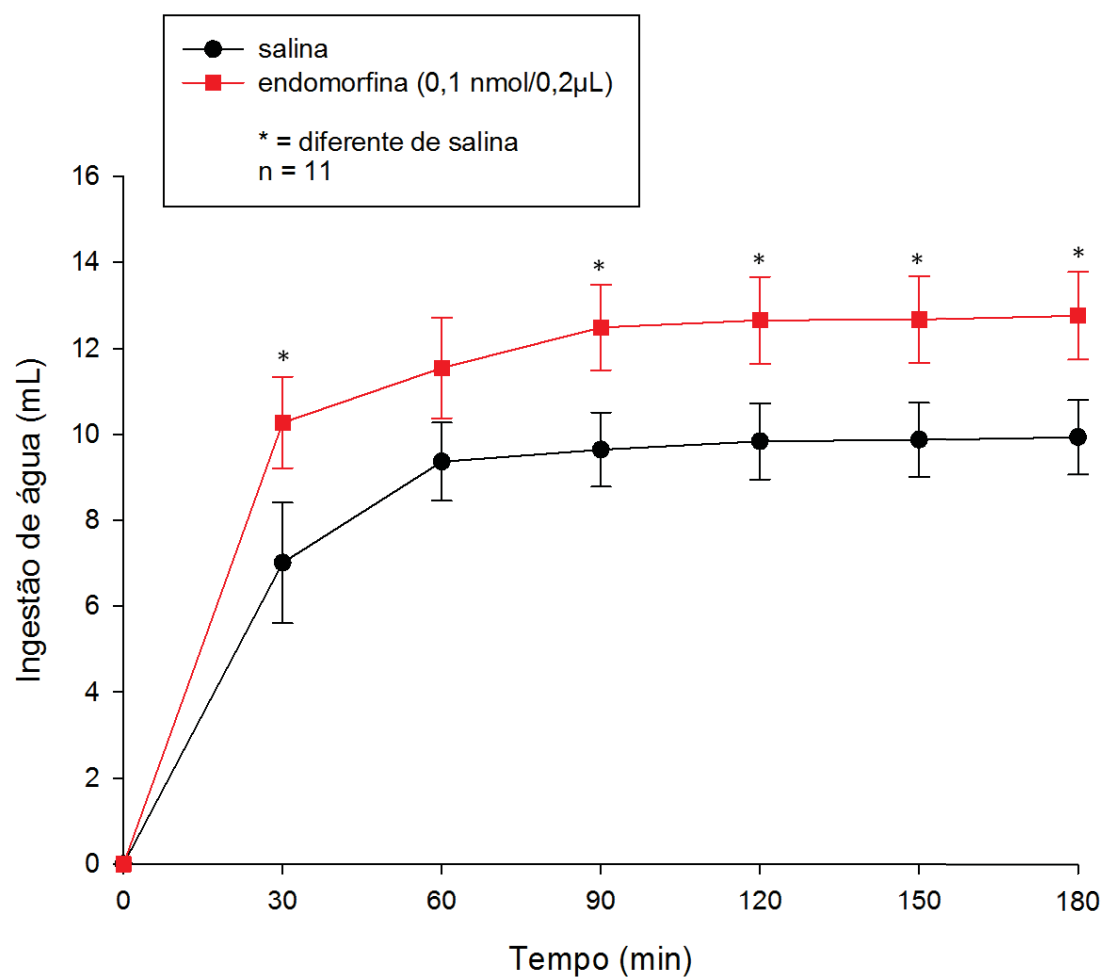


Figura I: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (0,1 nmol/0,2 μ L) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 11).

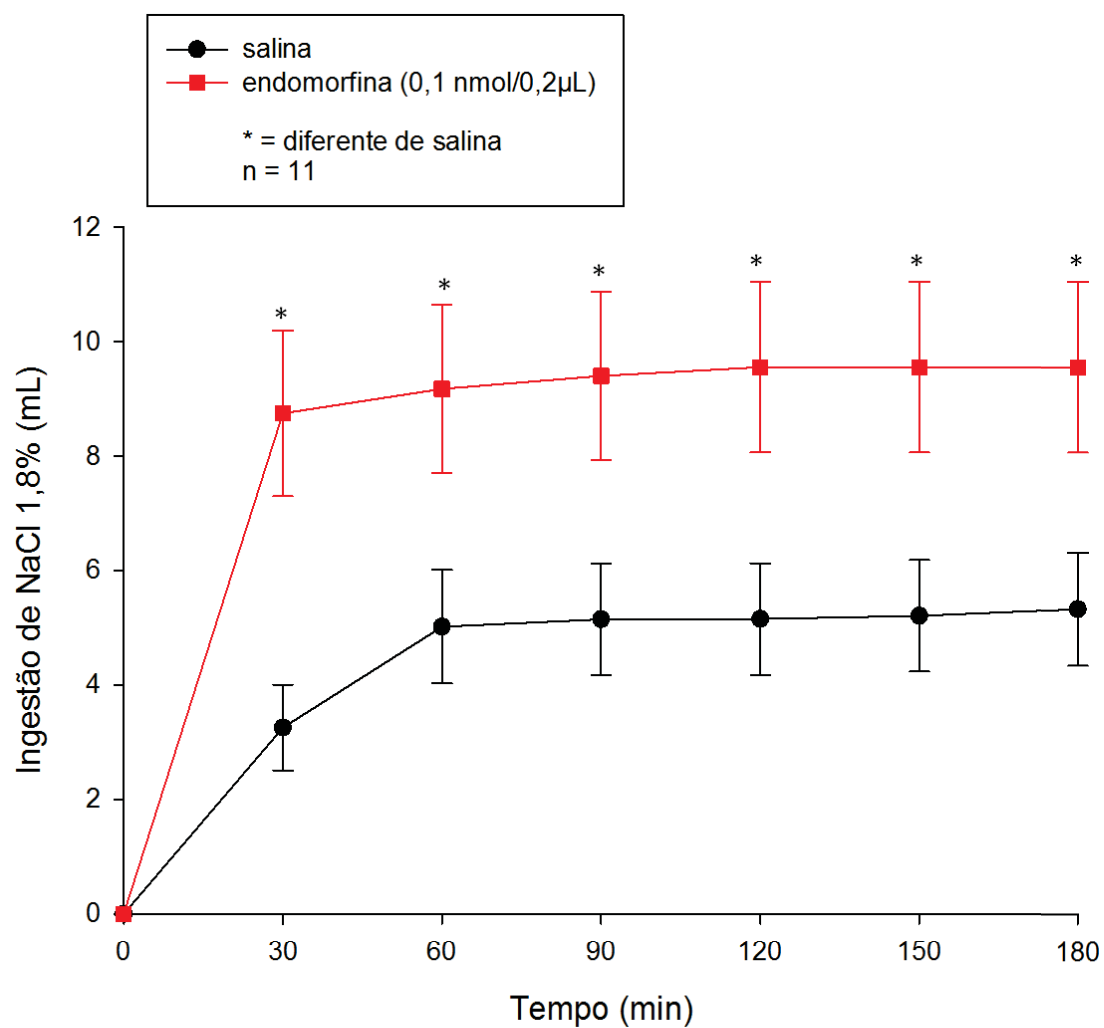


Figura II: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (0,1 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 11).

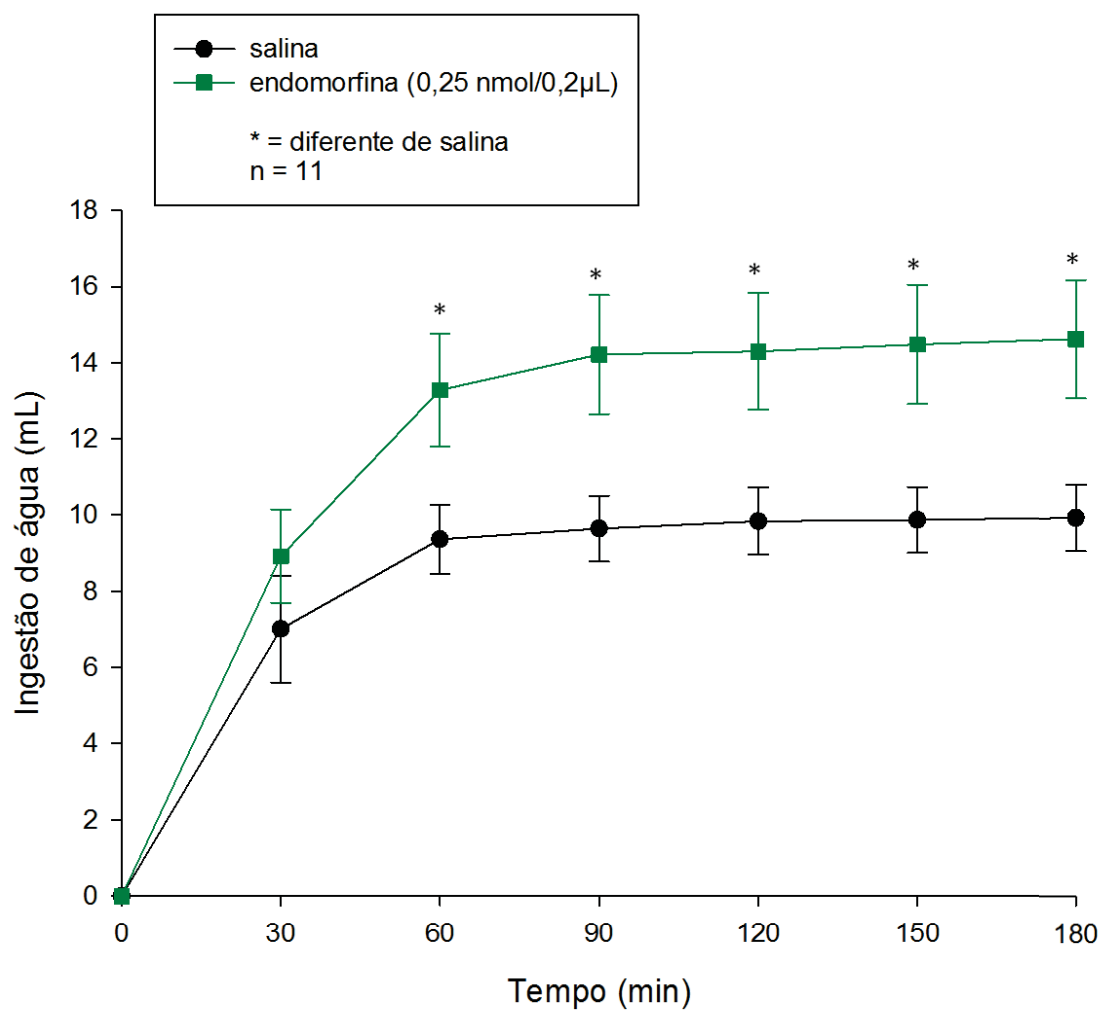


Figura III: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (0,25 nmol/0,2 μL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 11).

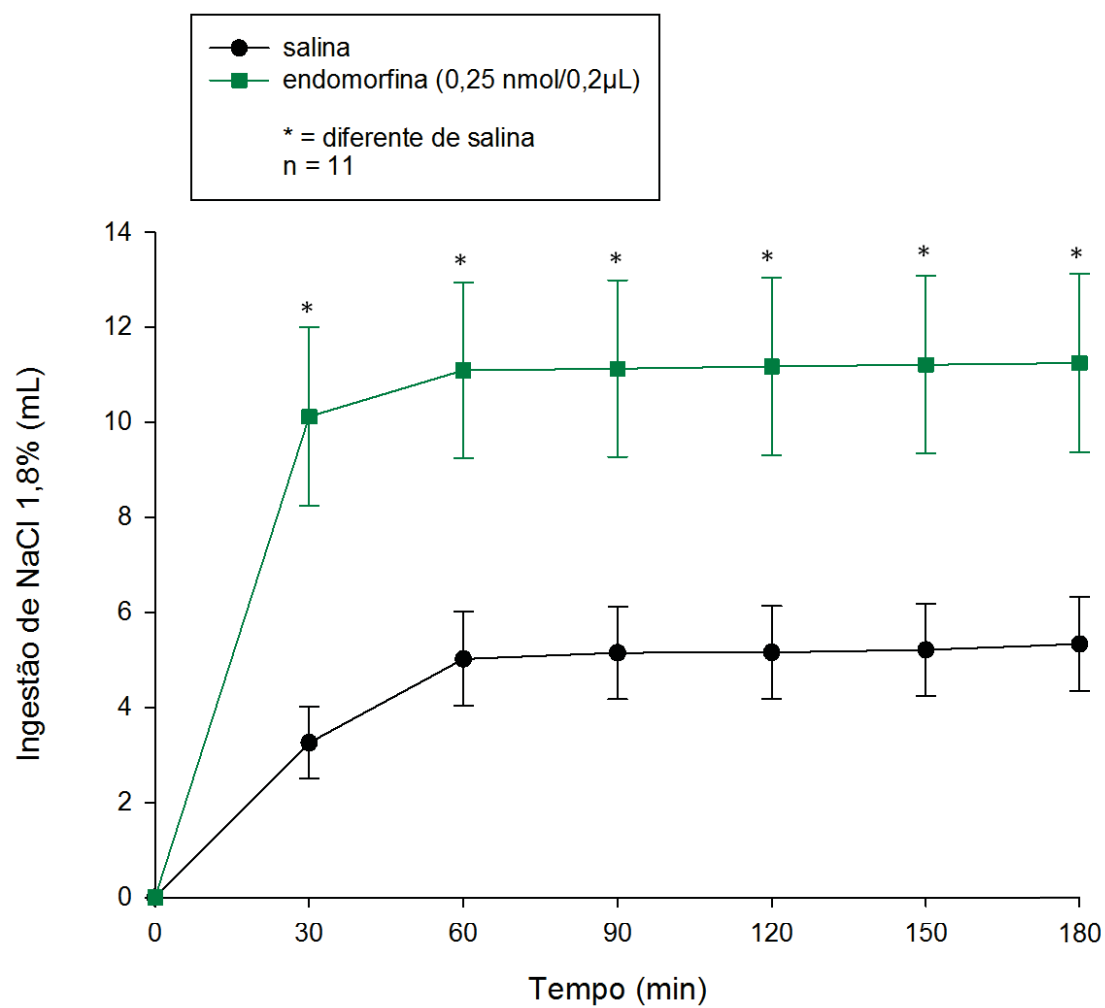


Figura IV: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (0,25 nmol/0,2 μ L) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 11).

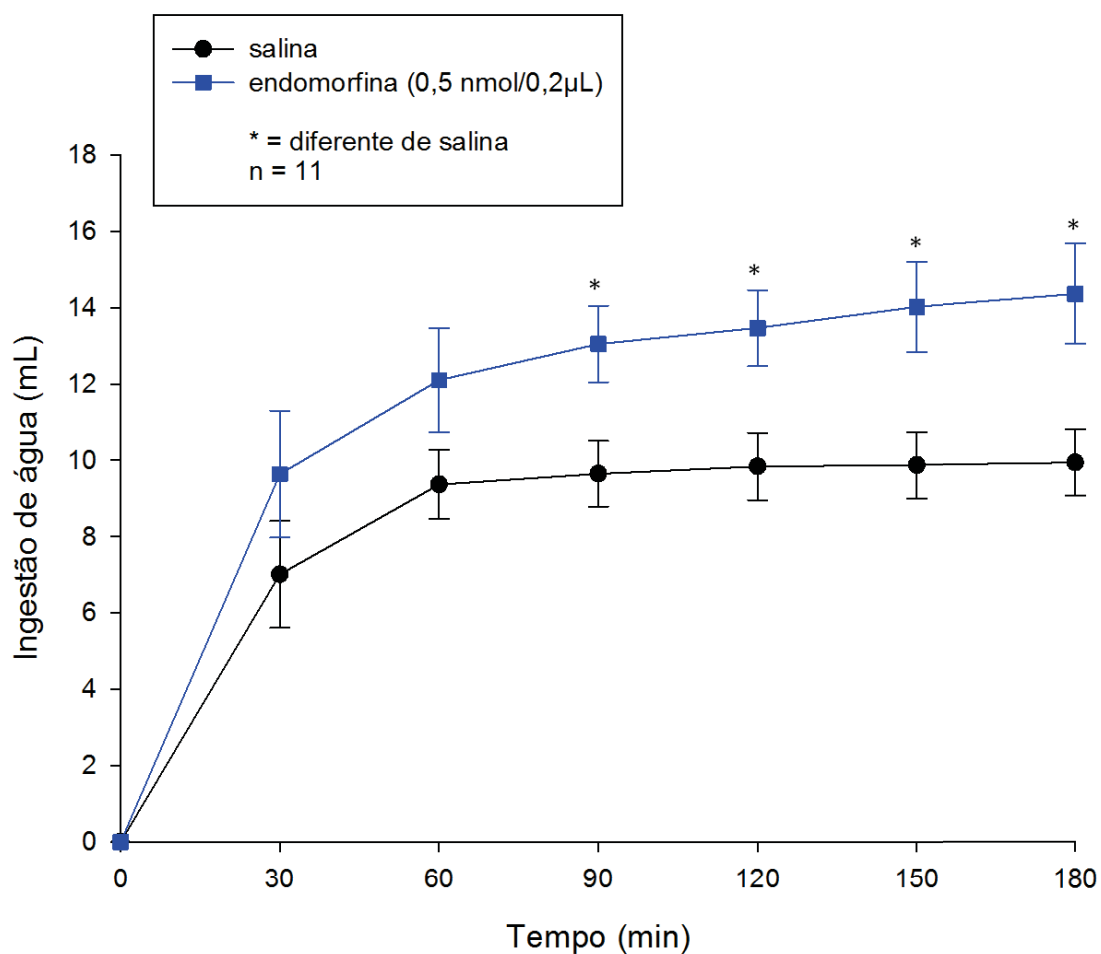


Figura V: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 11).

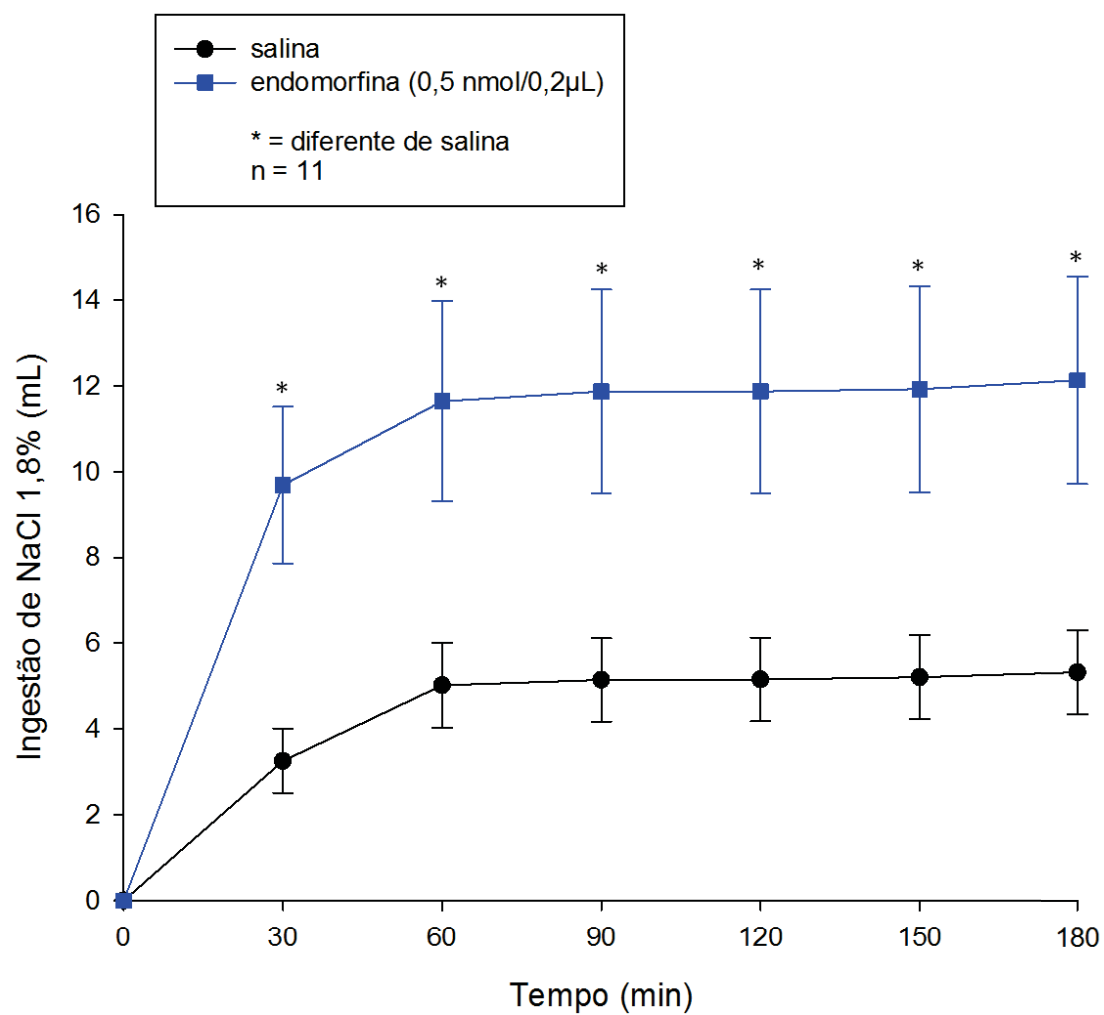


Figura VI: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (0,5 nmol/0,2 μ L) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 11).

8.1. Experimento 2. Efeitos da administração de endomorfina (1 ou 2 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.

Injeções de endomorfina (1 ou 2 nmol/0,2 µL) bilateralmente no NPBL aumentaram a ingestão de água ($27,0 \pm 2,6$ e $27,3 \pm 2,2$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $12,8 \pm 1,0$ mL/3 h) [$F(1, 7) = 37,4$; $F(1, 7) = 15,4$; respectivamente, $p < 0,05$] e de NaCl 1,8% ($21,1 \pm 2,4$ e $21,4 \pm 2,8$ mL/3 h, respectivamente, vs. sal: $8,6 \pm 1,5$ mL/3 h) [$F(1, 7) = 22,2$; $F(1, 7) = 24,7$; respectivamente, $p < 0,05$] após o tratamento furosemida + captopril sc. (Figuras VII, VIII, IX e X).

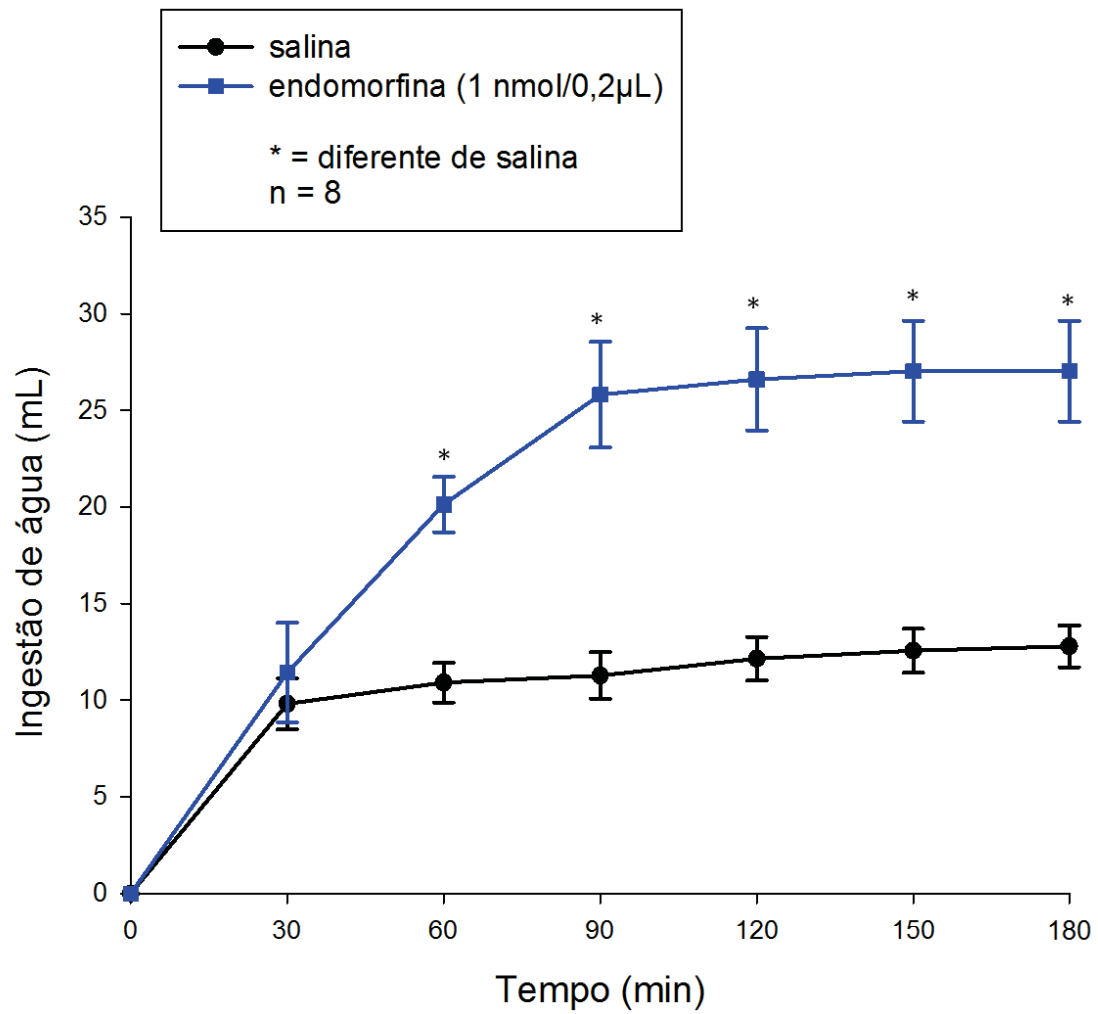


Figura VII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (1 nmol/0,2 μL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 8).

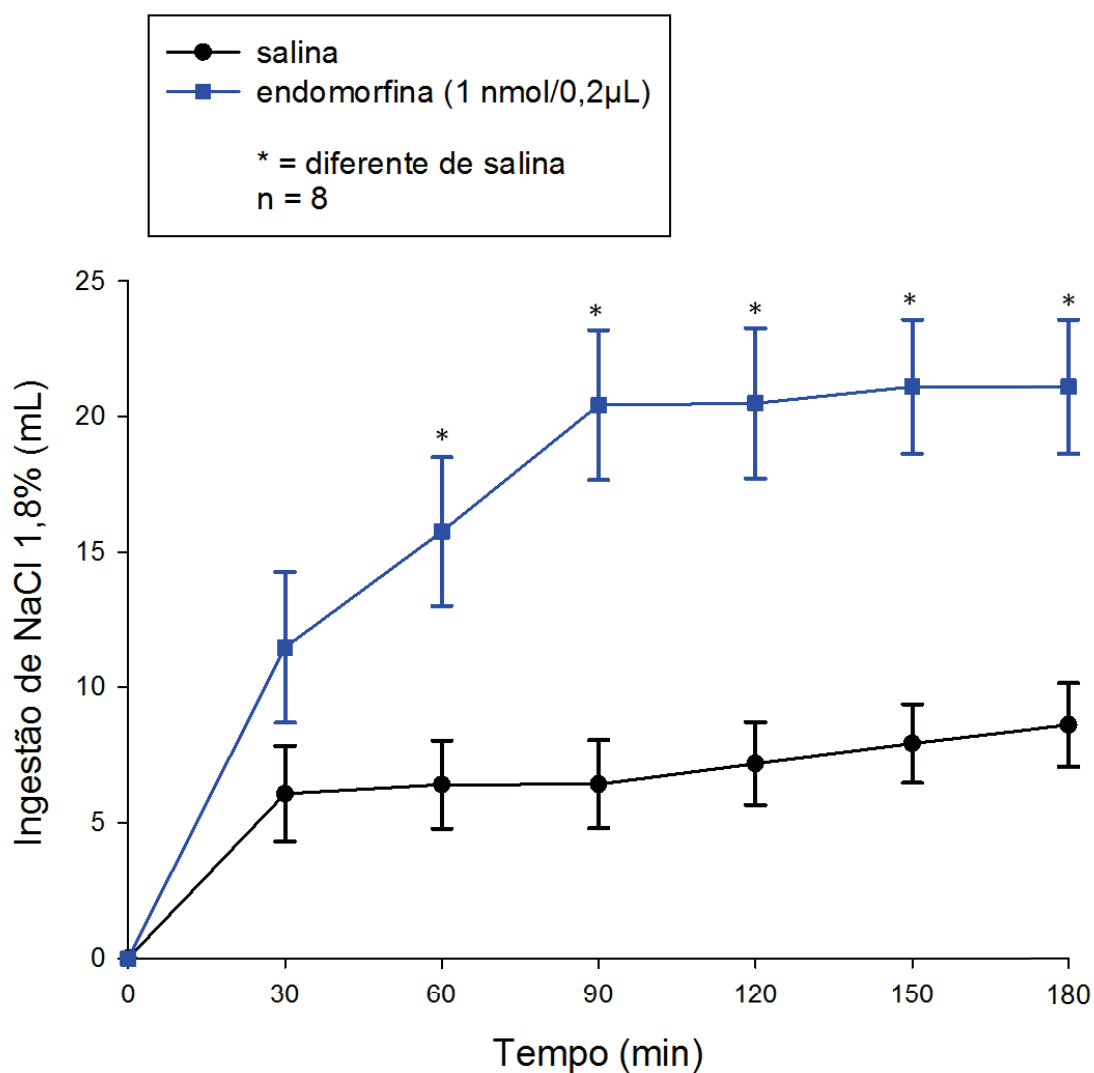


Figura VIII: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (1 nmol/0,2 μL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 8).

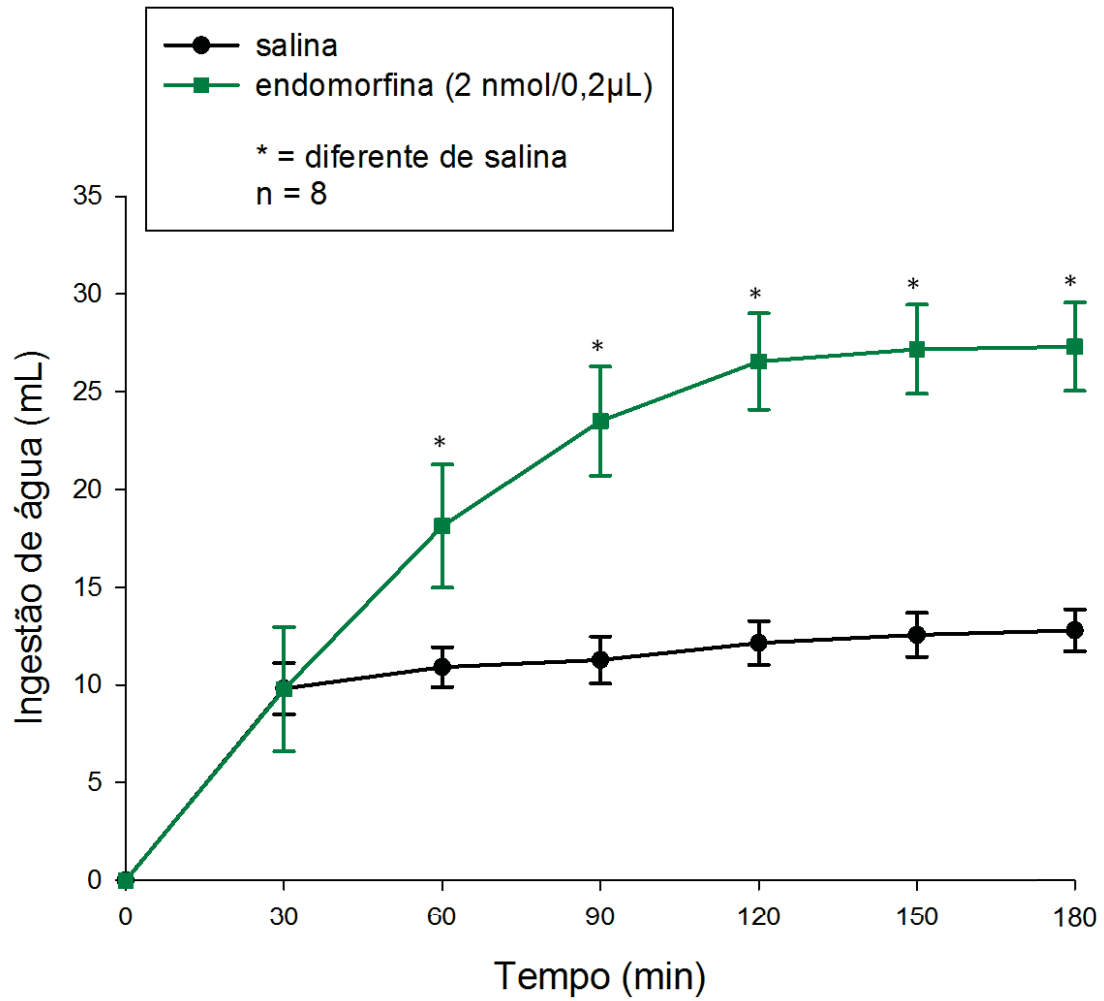


Figura IX: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (2 nmol/0,2 μL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 8).

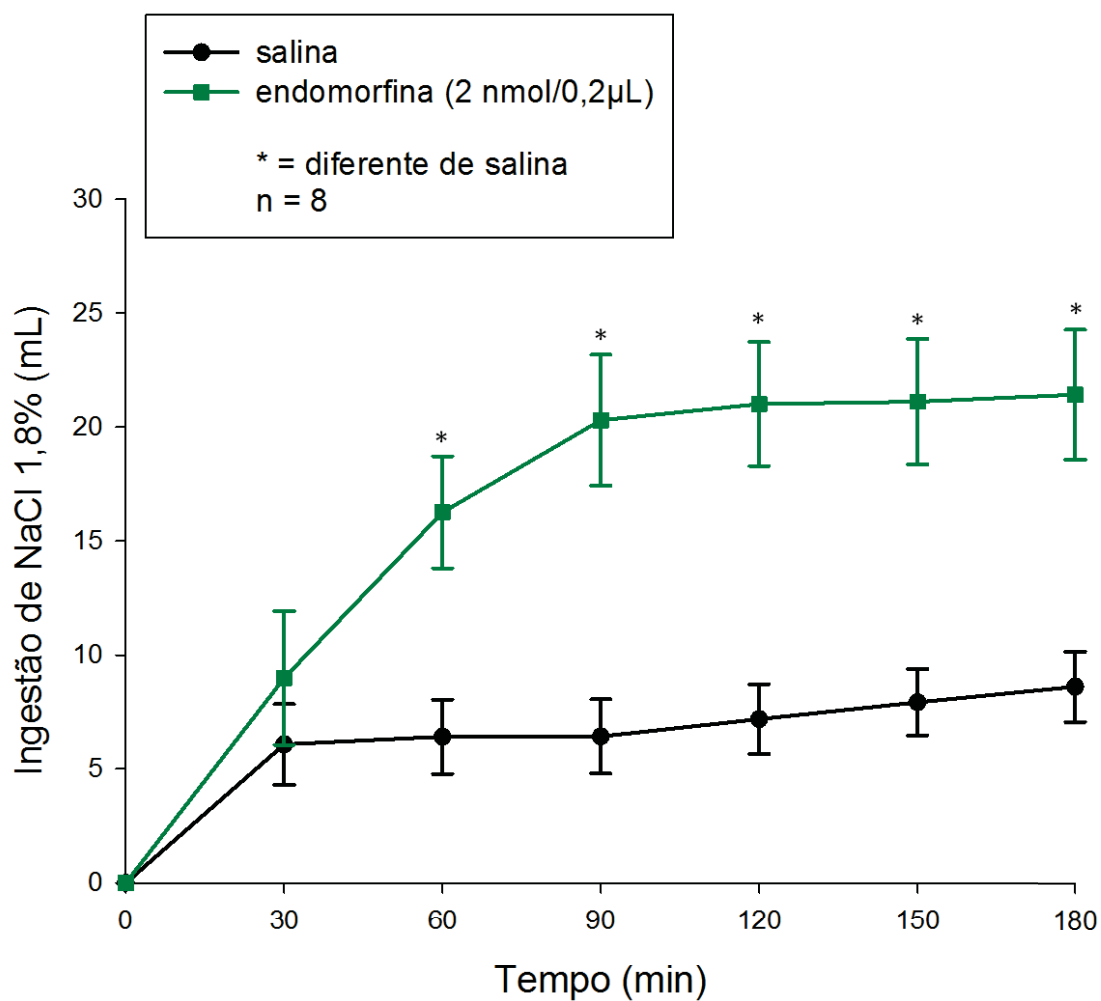


Figura X: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de endomorfina (2 nmol/0,2 μ L) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 8).

8.3. Experimento 3. Efeitos da administração de CTAP (1 ou 2 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril sc.

Na maior dose do antagonista, injeções de CTAP (2 nmol/0,2 µL) bilateralmente no NPBL diminuíram a ingestão de NaCl 1,8% ($4,8 \pm 1,1$ mL/3 h, vs. sal: $10,7 \pm 1,9$ mL/3 h) [$F(1, 8) = 8,1$; $p < 0,05$], mas não alteraram a ingestão de água ($13,1 \pm 1,3$ mL/3 h, vs. sal: $17,1 \pm 2,3$ mL/3 h) [$F(1, 8) = 3,6$; $p > 0,05$] após tratamento com furosemida + captopril sc (Figuras XI e XII).

No segundo grupo de animais, injeções de endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) bilateralmente no NPBL aumentaram a ingestão de água ($14,4 \pm 1,1$ mL/2 h, vs. sal: $9,5 \pm 0,7$ mL/2 h) [$F(3, 8) = 1,6$; $p > 0,05$] e de NaCl 1,8% ($13,0 \pm 2,0$ mL/2 h, vs. sal: $3,1 \pm 0,6$ mL/2 h) [$F(3, 8) = 5,2$; $p > 0,05$] em ratos tratados com furosemida + captopril, sc. Injeções bilaterais de CTAP (1 nmol/0,2 µL) não modificaram a ingestão de água ($11,5 \pm 1,4$ mL/2 h, vs. sal: $9,5 \pm 0,7$ mL/2 h) [$F(3, 8) = 1,6$; $p > 0,05$] ou de NaCl 1,8% ($6,3 \pm 1,6$ mL/2 h, vs. sal: $3,1 \pm 0,6$ mL/2 h) [$F(3, 8) = 5,2$; $p > 0,05$] induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc., no entanto, aboliram o aumento da ingestão de NaCl 1,8% ($7,7 \pm 1,6$ mL/2 h vs. sal.+endomorfina: $13,0 \pm 2,0$ mL/2 h) [$F(3, 8) = 5,2$; $p > 0,05$] produzido pelas injeções bilaterais de endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) não alteraram a ingestão de água ($13,3 \pm 1,0$ mL/2 h, vs. sal.+endomorfina: $14,4 \pm 1,0$ mL/2 h) [$F(3, 8) = 1,6$; $p > 0,05$] após tratamento com furosemida + captopril sc (Figuras XIII e XIV).

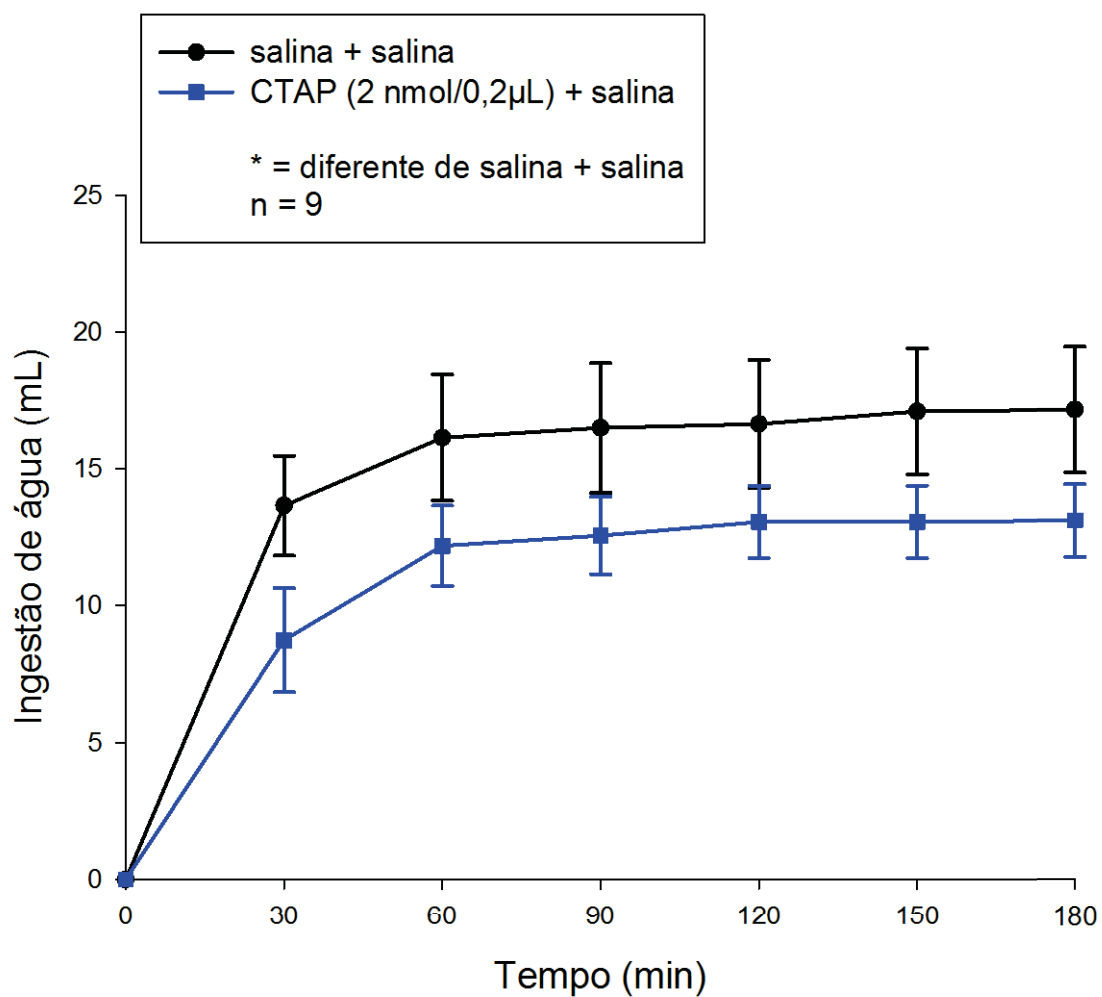


Figura XI: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de CTAP (2 nmol/0,2 μL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 9).

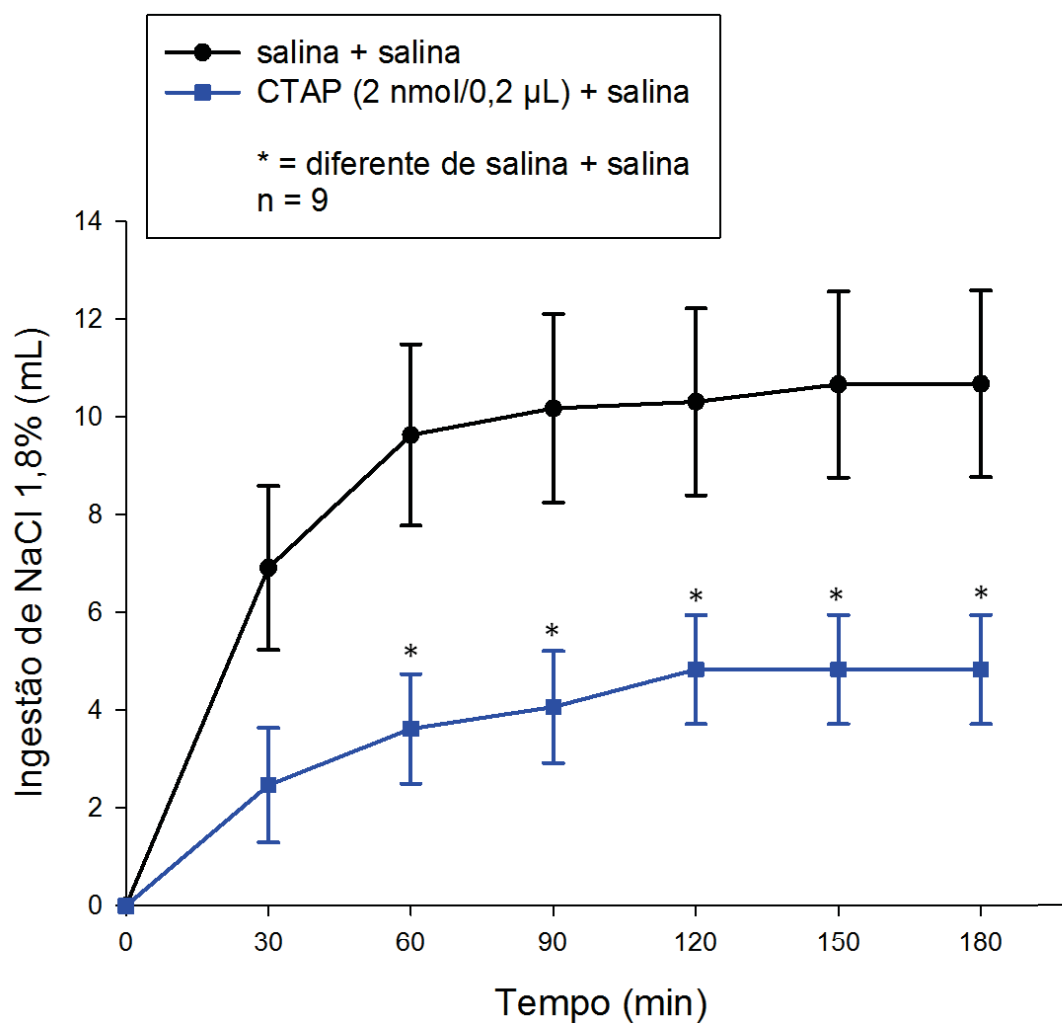


Figura XII: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções injeções bilaterais de CTAP (2 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 9).

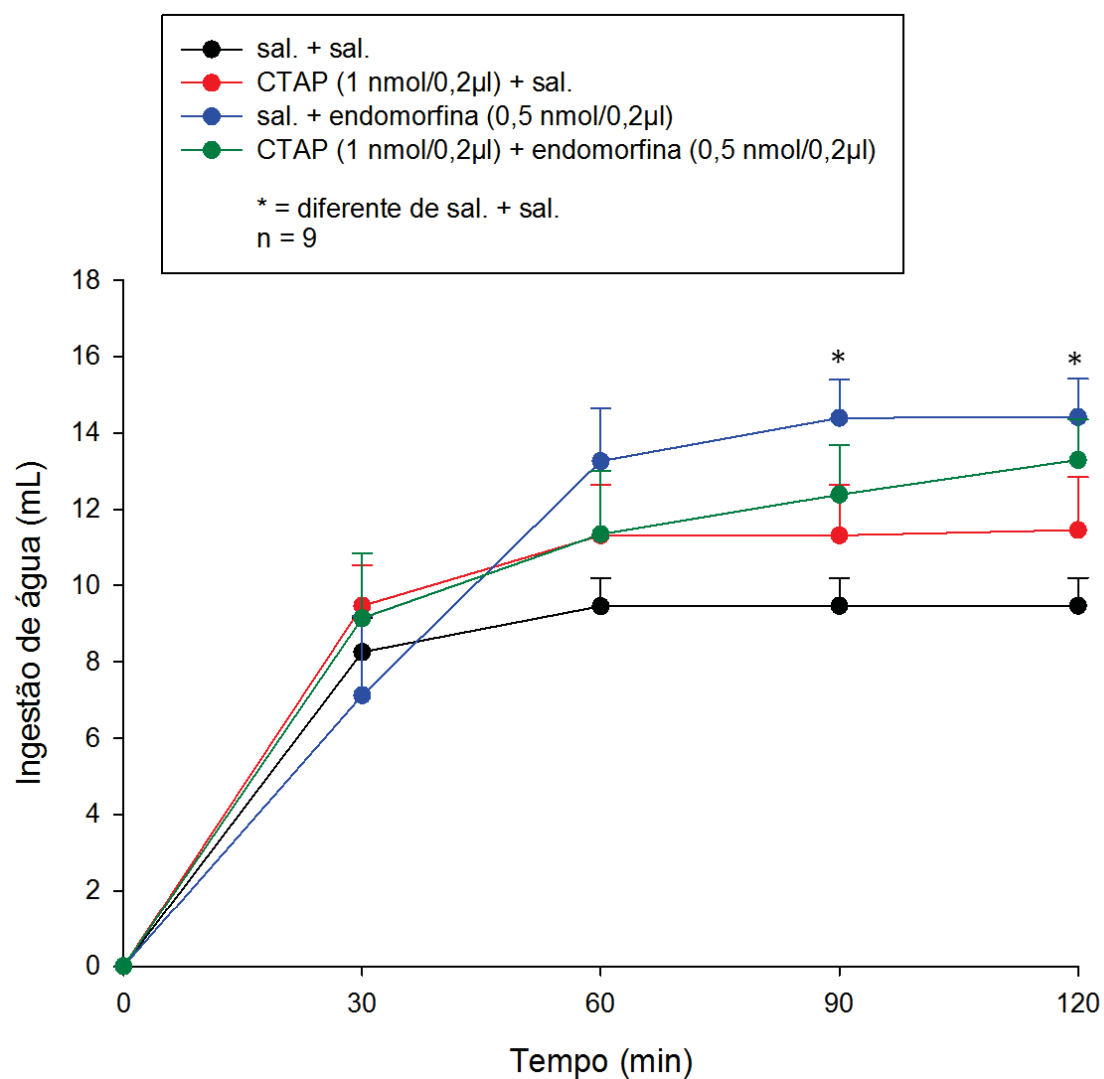


Figura XIII: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de CTAP (1 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 9).

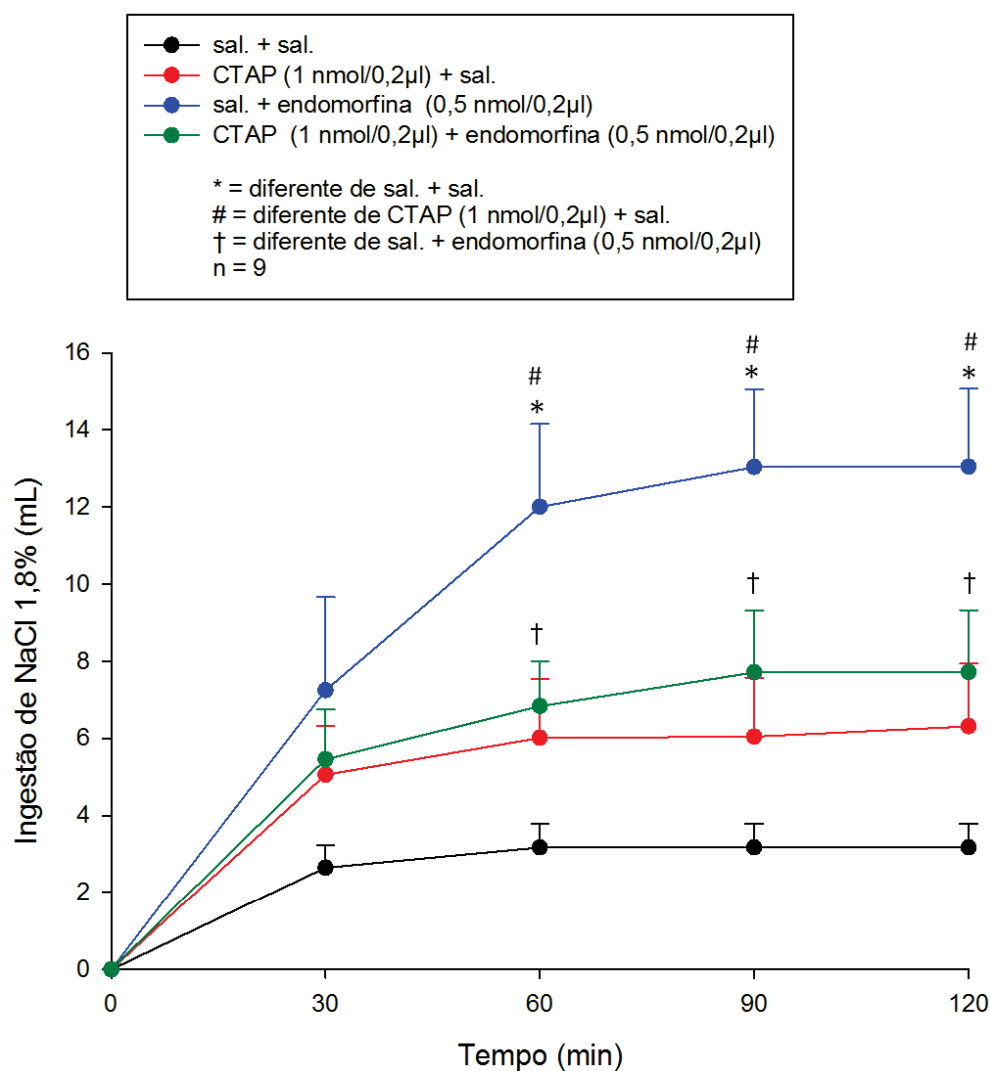


Figura XIV: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida + captopril subcutaneamente que receberam injeções bilaterais de CTAP (1 nmol/0,2 µL) sozinho ou combinado com endomorfina (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL. Os resultados estão expressos como média +/- EPM (n = 9).

9. HISTOLOGIA

A Figura XV abaixo representa um corte histológico transversal de um encéfalo de animal, mostrando (setas pretas) os locais das injeções no NPBL. O trajeto da cânula está evidenciado pelo corante azul de Evans. O núcleo parabraquial lateral está localizado dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior (pcs), região destacada com os círculos pontilhados pretos.



Figura XV: Fotomicrografia de um corte histológico transversal de um encéfalo de animal, mostrando os locais das injeções no NPBL.

10. DISCUSSÃO

Injeções bilaterais de endomorfina (0,1; 0,25; 0,5; 1 ou 2 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL promoveram um aumento significativo da ingestão de água e NaCl 1,8%. As doses maiores (1 e 2 nmol/0,2 µl) de endomorfina testadas produziram um grande aumento da ingestão, sem diferença de efeito entre elas. Isto sugere que estas doses produzem efeito máximo. As doses menores de endomorfina (0,1; 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL também promoveram um aumento significativo na ingestão de água e NaCl 1,8%, porém, nessas doses as respostas foram um pouco menores.

Injeções bilaterais do antagonista de receptores opióides μ CTAP sozinho no NPBL na dose maior (2 nmol/0,2 µl) reduziram a ingestão de NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com FURO + CAP, um efeito oposto ao observado com as injeções bilaterais de endomorfina. Na dose menor as injeções de CTAP (1 nmol/0,2 µl) sozinho no NPBL não modificaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP. Embora a dose menor de CTAP injetada no NPBL não tenha modificado a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP, ela foi capaz de abolir o aumento da ingestão de NaCl 1,8% produzido pelo tratamento com endomorfina no NPBL, o que contribui para a confirmação da hipótese de que existe uma via opioidérgica atuando no NPBL facilitando a ingestão de NaCl hipertônico ou seja, que aumenta o apetite ao sódio. Os efeitos das injeções de CTAP sozinho no NPBL reduzindo a ingestão de NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP sugerem o envolvimento dos receptores opióides μ na ingestão de sódio induzida por este tratamento periférico, porém, é preciso levar em conta que a dose mais baixa de CTAP injetada no NPBL não produziu o mesmo efeito o que levanta a possibilidade de algum efeito inespecífico da dose mais alta de CTAP injetada no NPBL na ingestão de sódio. Nenhuma dose de CTAP injetada sozinha no NPBL modificou a ingestão de água o que aparentemente seria um resultado contraditório com os efeitos da endomorfina. Porém, como os ratos simultaneamente ingerem água e NaCl

hipertônico, o aumento da ingestão de água produzido pelo tratamento com endomorfina no NPBL pode ser uma consequência do efeito osmótico produzido pela ingestão de grandes quantidades de solução hipertônica. Assim, pode ser que a ativação dos receptores μ opióides do NPBL aumente especificamente a ingestão de sódio e que o aumento da ingestão de água seja uma consequência da intensa ingestão de solução hipertônica de NaCl. Neste caso, os efeitos das injeções de CTAP no NPBL reduzindo apenas a ingestão de sódio induzida por FURO + CAP seria coerente com os efeitos das injeções de endomorfina no NPBL.

O sódio é o eletrólito mais abundante no compartimento extracelular e tem papel essencial na manutenção da homeostase hidromineral e cardiovascular, portanto, o entendimento de como ocorre a modulação do apetite ao sódio centralmente é de fundamental importância. Sabe-se que o NPBL tem importância no controle de diversos comportamentos ingestivos, especificamente mecanismos de ingestão de água e sódio. (Cooper, 1980; Jalowiec et al., 1981; Brown and Holtzman, 1981; Summy-Long et al., 1981; Rowland, 1982; Cooper and Gilbert, 1984; Beczkowska et al., 1992; Hubbell e McCutcheon, 1993; Eidi et al., 2003; Lucas et al., 2007). Além disso, possui grande quantidade de receptores opióides e a ativação de receptores opióides μ promove uma inibição da atividade neuronal (Milner et al., 1984; Christie e North, 1988; Xia and Haddad, 1991). Sinais de barorreceptores arteriais e de receptores de volume e gustatórios, além de sinais de outros receptores viscerais chegam ao NTS e depois ascendem ao NPBL. É bem conhecido que os sinais osmóticos, gustatórios e de barorreceptores e receptores de volume no geral inibem a ingestão de água e/ou de sódio. Portanto, os sinais oriundos destes receptores poderiam modular a atividade de neurônios do NPBL envolvidos no controle da ingestão de água e sódio (Norgren, 1981; Ciriello et al., 1984; Fulwiler and Saper, 1984; Shapiro and Miselis, 1985; Herbert et al., 1990; Krukoff et al., 1993; Jhamandas et al., 1996).

Já foi demonstrado previamente o envolvimento de receptores opióides do NPBL na ingestão de água e NaCl. Injeções bilaterais do agonista opióide inespecífico β -endorfina no NPBL induziram intensa ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos saciados e normovolêmicos, um efeito que foi bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista opióide inespecífico naloxona (De Oliveira et al., 2008). No entanto, não se sabia qual ou quais subtipos de receptores opióides (μ , δ ou κ) estariam envolvidos nesse mecanismo, pois a β -endorfina, assim como a naloxona injetados no NPBL em estudo anterior pode se ligar a qualquer um dos subtipos de receptores opióides. Estudos prévios também mostraram que injeções sistêmicas de naloxona reduzem a ingestão de soluções hipo e hipertônicas de NaCl (Brown and Holtzman, 1981; Summy-Long et al., 1981; Rowland, 1982; Cooper and Gilbert, 1984). Foi demonstrado também que a estimulação específica de receptores opióides μ com o agonista DAMGO no NPBL promove um aumento na ingestão de alimento. Este efeito hiperfágico do DAMGO foi bloqueado pelo o tratamento prévio com o antagonista específico μ CTAP (Wilson et al., 2003). Além disso, a microinfusão de DAMGO no NPBL promoveu um aumento significativo da expressão de proteína c-Fos no NPBL e em outras regiões envolvidas na regulação da ingestão calórica, como núcleo acumbens, núcleo paraventricular do tálamo, hipocampo e núcleo arqueado do hipotálamo, efeito bloqueado pelo pré-tratamento com CTAP. Foi demonstrado também que o CTAP inibe o acoplamento dos receptores opióides μ com a proteína G, o que impede a ativação opioidérgica μ dos neurônios parabraquiais, responsáveis pela excitação de áreas prosencefálicas (Denbleyker et al., 2009). No NPBL existem neurotransmissores que aumentam a atividade dos mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio do NPBL como a serotonina, colecistocinina (CCK), glutamato, fator liberador de corticotrofina (CRF) e outros como os opióides, mas também GABA, noradrenalina e trifosfato de adenosina (ATP) que reduzem ou bloqueiam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e

cols., 2000; Menani e Johnson, 1998; Callera et al., 2002; Callera et al., 2005; Xu et al., 1997; Andrade et al., 2004; De Castro e Silva et al., 2006; Colombari et al., 1996). No presente estudo foi observado que receptores opióides do subtipo μ no NPBL tem papel importante na modulação da atividade do mecanismo inibitório da ingestão de água e sódio presente no NPBL. Os receptores opióides normalmente tem localização pré-sináptica e a ativação dos mesmos poderia reduzir a liberação de neurotransmissores que aumentam a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL, ou seja, a ativação dos receptores opióides no NPBL poderia inibir a liberação de serotonina, CCK, glutamato e/ou CRF. A ativação de receptores opióides μ ou δ produz uma hiperpolarização da membrana através de ativação de canais de potássio (North et al., 1987). Assim, a neurotransmissão opioidérgica como a GABAérgica ou α_2 -adrenérgica poderia atuar no NPBL desativando os neurônios do NPBL que conduzem sinais inibitórios para a ingestão de sódio, o que resulta em um aumento da ingestão de sódio, quando há sinais facilitatórios ativados ou não (Andrade et al., 2004; Callera et al., 2005; De Oliveira et al., 2007, De Oliveira et al., 2008). Em conclusão os resultados obtidos e resultados anteriores demonstram que vias opioidérgicas, em especial o receptor opióide do subtipo μ do NPBL estão diretamente envolvidas nos mecanismos que regulam a ingestão de salina centralmente.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. A. F.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, 129: 25–34, 2004.
- BARBOSA, S. P.; DE GOBBI, J. I. F.; ZILIOLI, L.; CAMARGO, L. A. A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Role of adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. **Brain Res. Bullet.**, 37: 463-466, 1995.
- BECZKOWSKA, I. W.; BOWEN, W. D.; BODNAR, R. J. Central opioid receptor subtype antagonists differentially alter sucrose and deprivation induced water intake in rats. **Brain Res.**, 589(2):291–301, 1992.
- BRODY, M. J. and JOHNSON, A. K. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. **Frontiers in Neuroendocrinology**, edited by Martini, L. and Ganong, W.F. New York: Raven Press, p. 249-292, 1980.
- BROWN, D. R.; HOLTZMAN, S. G. Suppression of drinking by naloxona in the rat: A further characterization. **Eur. J. Pharmacol.**, 69:331–340, 1981.
- CALLERA, J. C.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR., L. A.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. Activation of GABA receptors in the lateral parabrachial nucleus induces sodium intake in rats. **Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington, DC: Society for Neuroscience**, 774.16, 2002.
- CALLERA, J. C.; OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, 134: 725-735, 2005.

- CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D. AND PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res.**, 322, 388–392, 1984.
- COLOMBARI, D. S. A.; HAIBARA, A. S.; CAMARGO, L. A. A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Role of medial septal area on the cardiovascular fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. **Brain Res. Bullet.**, 33: 249-254, 1994.
- COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. AND JOHNSON, A. K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am. J. Physiol.**, 271, R1470–R1476, 1996.
- COOPER, S. J.; GILBERT, D. B. Naloxona suppresses fluid consumption in tests of choice between sodium chloride solutions and water in male and female water-deprived rats. **Psychopharmacology (Berl.)**, 84:362–367, 1984.
- COOPER, S. J. Naloxona: effects on food and water consumption in the non-deprived and deprived rat. **Psychopharmacology (Berl)**, 71(1):1–6, 1980.
- COVIAN, M. R.; ANTUNES RODRIGUES, J.; GENTIL, C. G.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A.; SILVA NETO, C. R. Central control of salt balance. **Neural integration of physiological mechanisms and behavior**, MOGENSON, G. S. E CALARESU, F. R. (eds) University of Toronto Press 267-282, 1975.
- CHRISTIE, M. J.; NORTH, R. A. Agonists at mu-opioid, M2-muscarinic and GABAB-receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurons. **Br. J. Pharmacol.**, 95(3):896–902, 1988.

- DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropin releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 290(4):R1136–R1141, 2006.
- DE GOBBI, J. I. F.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Res.**, 880: 131-138, 2000.
- DE GOBBI, J. I.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR., L. A.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Activation of serotonergic 5-HT(1A) receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. **Brain Res.**, 1066: 1-9, 2005.
- DE OLIVEIRA, L. B.; CALLERA, J. C.; DE LUCA JR., L. A.; COLOMBARI, D. S.; MENANI, J. V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Res. Bull.**, 73(4–6):238–247, 2007.
- DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30: 497-502, 1997.
- DE LUCA JR., L. A.; VIVAS, L.; MENANI, J. V. Controle Neuroendócrino da ingestão de água e sódio. In: RODRIGUES, J. A., MOREIRA, A. C., CASTRO, M.; ELIAS, L. L. K. (Eds.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**, 1ª. ed. Rio de Janeiro, p. 116-134, 2004.
- DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, 155(2):350-358, 2008.
- DE PAULA, P. M.; SATO, M. A.; MENANI, J. V., DE LUCA JR., L. A. Effects of central α -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neurosc. Lett.**, 214: 155-158, 1996.

- DENBLEYKER, M.; NICKLOUS, D. M.; WAGNER, P. M.; WARD, H. G.; SIMANSKY, J. K. Activating μ -opioid receptors in the lateral parabrachial nucleus increases c-fos expression in forebrain areas associated with caloric regulation, reward and cognition. **Neuroscience.**, 162 224–233, 2009.
- EDWARDS, G. L. AND JOHNSON, A. K.. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am. J. Physiol.**, 261, R1039–R1044, 1991.
- EDWARDS, G. L.; BELTZ, T. G.; POWER, J. D.; JOHNSON, A. K. Rapid-onset “need-free” sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. **Am. J. Physiol.**, 264: R1242-R1247, 1993.
- EIDI, M.; ORYAN, S.; EIDI, A.; SEPEHRARA, L. Effect of morphine, naloxona and histamine system on water intake in adult male rats. **Eur. J. Pharmacol.** 478(2–3):105–110, 2003.
- FERRARI, A. C.; CAMARGO, L. A. A.; SAAD, W. A; RENZI, A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. **Brain Res.**, 522: 125-130, 1990.
- FERRARI, A. C.; CAMARGO, L. A. A.; SAAD, W. A; RENZI, A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Role of α_1 - and α_2 -adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. **Brain Res.**, 560: 291-296, 1991.
- FITTS, D. A.; MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behavioral Neuroscience**, 103(4):865-872, 1989.
- FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res. Rev.**, 7:229–259, 1984.
- GALAVARNA, O.; DE LUCA JR., L. A.; SCHULKIN, J.; YAO, S. Z.; EPSTEIN, A. N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, 28, 89-98, 1991.

- HERBERT, H.; MOGA, M. M. AND SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus to the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 293, 540–580, 1990.
- HUBBELL, C. L.; MCCUTCHEON, N. B. Opioidergic manipulations affect intake of 3% NaCl in sodium-deficient rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 46(2):473–476, 1993.
- JALOWIEC, J. E.; PANKSEPP, J.; ZOLOVICK, A. J.; NAJAM, N.; HERMAN, B. H. Opioid modulation of ingestive behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 15(3):477–484, 1981.
- JHAMANDAS, J. H.; PETROV, T.; HARRIS, K. H.; VU, T. AND KRUKOFF, T. L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat. Electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res. Bull.**, 39, 115–126, 1996.
- JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. **Current topics in neuroendocrinology**, vol.10, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 149-190, 1990.
- KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H. AND JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res. Bull.**, 30, 163–172, 1993.
- LUCAS, L. R.; GRILLO, C. A.; MCEWEN, B. S. Salt appetite in sodium-depleted or sodium-replete conditions: possible role of opioid receptors. **Neuroendocrinology**, 85(3):139–147, 2007.
- LUIZ, A. C.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; RENZI, A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Pressor dipsogenic, natriuretic and kaliuretic responses to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area. **Neurosc. Lett.**, 123: 195-198, 1991.

- MANGIAPANE, M. L.; SIMPSON, J. B. Subfornical organ: Forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. **Am. J. Physiol.**, 239: R382-R389, 1980.
- MENANI, J. V. AND JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am. J. Physiol.**, 269, R1044–R1049, 1995.
- MENANI, J. V. AND JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, 275, R1431–R1437, 1998.
- MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. AND JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am. J. Physiol.**, 274, R555–R560, 1998.
- MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A.; THUNHORST, R. L. AND JOHNSON, A. K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am. J. Physiol.**, 279, R126–R131, 2000.
- MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L. AND JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, 270, R162–R168, 1996.
- MILNER, T. A.; JOH, T. H.; MILLER, R. J.; PICKEL, V. M. Substance P, neurotensin, enkephalin and catecholamine-synthesizing enzymes: light microscope localizations compared with autoradiographic label in solitary efferents to the rat parabrachial region. **J. Comp. Neurol.**, 226(3):434–447, 1984.
- NEGRO VILLAR, A.; GENTIL, C. G.; COVIAN, M. R. Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in rats. **Physiol. Behav.**, 2: 167-170, 1967.

- NORGREN, R. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. In: **Brain mechanisms of sensation** (Katsuki Y, Norgren R, Sato M, eds), pp143–160. New York: Wiley, 1981.
- NORTH, R. A.; WILLIAMS, J. T.; SURPRENANT, A.; CHRISTIE, M. J. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. **Proc. Natl. Acad. SciUSA**, 84(15):5487–5491, 1987.
- OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am. J. Physiol.**, 256: R264-R269, 1989.
- OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake induced by right atrial stretch. **Brain Res.**, 695:275-278, 1995.
- ROWLAND, N. Comparison of the suppression by naloxone of water intake induced in rats by hyperosmolarity, hypovolemia and angiotensin. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 16:87–91, 1982.
- SCHULKIN, J.; MARINI, J.; EPSTEIN, A. N. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. **Behav. Neurosc.**, 103,178-185, 1989.
- SHAPIRO, R. E.; MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J. Comp. Neurol.**, 234:344–364, 1985.
- SIMPSON, J. B.; ROUETTENBERG, A. Subfornical organ: Site of drinking elicitation by angiotensin. **Science**, 181:1172-1175, 1973.
- SUMMY-LONG, J. Y.; KEIL, L. C.; DEEN, K.; ROSELLA, L.; SEVERS, W. B. Endogenous opioid peptide inhibition of the central actions of angiotensin. **J Pharmacol. Exp. Ther.**, 217(3):619–629, 1981.
- THUNHORST, R. L. AND JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. **Am. J. Physiol.**, 266, R458–R465, 1994.

- THUNHORST, R. L.; LEWIS, S. J.; JOHNSON, A. K. Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite. **Am. J. Physiol.**, 267: R1043-R1049, 1994.
- WILSON, J. D.; NICKLOUS, D. M.; ALOYO, V. J.; SIMANSKY, K. J. An orexigenic role for mu-opioid receptors in the lateral parabrachial nucleus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 285:R1055–R1065, 2003.
- XIA, Y.; HADDAD, G. G. Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem. **Brain Res.**, 549(2):181–193, 1991.
- XU, J.; WOODWORTH, C. H.; JOHNSON, A. K. Glutamate and the role of the lateral parabrachial nucleus in the control of water and salt intake in rats. **Soc. Neurosci. Abstr.** 23:1348, 1997.