

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – FOA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS - DCB

GEAN DOMINGOS DA SILVA SOUZA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E NA INGESTÃO DE NaCl
HIPERTÔNICO E ÁGUA INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE TRANS-4-
AMINOCROTONIC ACID (TACA) NO NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL (NPBL) DE RATOS**

Araçatuba
2011

GEAN DOMINGOS DA SILVA SOUZA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E NA INGESTÃO DE NaCl
HIPERTÔNICO E ÁGUA INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE TRANS-4-
AMINOCROTONIC ACID (TACA) NO NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL (NPBL) DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Callera

Co-orientador: Prof. Titular José Antunes Rodrigues

Araçatuba
2011

Dedicatória

Ao soberano Deus primeiramente, pela oportunidade me dada para cumprir com êxito esta etapa da minha vida gozando de plena saúde, vigor físico, mental e espiritual. A minha família com especial reconhecimento á minha Mãe *Leonice*, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho, o qual se tornou indispensável e fundamental para superar todos os obstáculos durante o percurso. Minha irmã *Bia* e meu Pai *Sebastião* pelo imenso carinho.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A amiga e companheira de laboratório **Talita de Melo e Silva** pelo valor inestimável da amizade cultivada durante o árduo desenvolvido de nosso trabalho e ao imenso companheirismo, colaboração e incentivo para a realização do mesmo, sem excluir Gabi, Rita, Camila Tami, Lucilene, Bruna Biffe, Taís, Natália Manrique, Simone, Rafael Astolphi, Felipe Munhoz, Vilma, Aline, Lígia, Fabiano, Samuel, Wagner, César, Ariane e a todos os demais companheiros do Departamento e do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – UNESP/SBFIS.

Ao Dr. **João Carlos Callera**, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, também por sua atenção e apoio durante o processo de definição e orientação.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **UNESP**, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP (2009/03006-4)**, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** - DCB, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório para obtenção dos resultados experimentais e a todos os Professores Doutores do DCB pela atenção e respeito. Ao professor Wilson Galhego e Cristina Antoniali por sempre me incentivar a enfrentar os desafios impostos pela pós-graduação.

Aos amigos mais íntimos que torceram para que eu realizasse mais essa conquista em minha vida, sempre me apoiando, orientando,

torcendo e orando por mim. São eles: *Denise, Deiva e Maria Clara Gonçalves, Eunice Demétrio, Aparecida e Edna Cardoso, Maria dos Anjos por seu amor incondicional, minha Tia Gladys e meus primos Diego, Cynthia, Carla e seus herdeiros Heitor e Júlia, respectivamente*, sem me esquecer de *Irene Barbosa*, sendo parte da minha família, por estar presente em todos os momentos. A Maria Clarice (tia Lei) a qual ofereço todo meu carinho e admiração. Não posso deixar de lembrar-me de amizades importantes como *Silvia Aparecida da Silva (in memorian)* e Ana Cristina, pois, sempre torceram por mim. A amiga *Amanda Baldoíno, Gabriela e Natália Motta, Ângela Patrícia e Gabriela Belizário* por sempre estarem presentes em minhas conquistas e torcendo pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Não poderia me esquecer da minha primeira professora do jardim de infância *Terezinha de Fátima Sândalo* e a do ensino fundamental *Neide Cervantes Gorgone Arruda*.

Επίγραφε

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão.”

Thomas Wolfe

Resumo

RESUMO

SOUZA, GDS. Efeitos cardiovasculares e na ingestão de NaCl 1,8% e água induzida pela injeção de trans-4-aminocrotonic acid (TACA) no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de ratos [Dissertação de Mestrado]. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Araçatuba) e Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis); 2011.

A ativação de receptores GABA_A e GABA_B no núcleo parabraquial lateral (NPBL) com muscimol e baclofen, respectivamente, induz a ingestão de água e NaCl hipertônico em ratos. No presente estudo, investigamos os efeitos da injeção no NPBL bilateral de trans-4-aminocrotonic acid (TACA), um agonista não seletivo dos receptores GABA_A e GABA_C na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por depleção aguda de água e sódio. Foram utilizados ratos Wistar com cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL. Estes animais foram depletados de água e sódio com injeções do diurético furosemida (FURO 10 mg/kg de peso corporal) combinado com baixa dose do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (CAP 5 mg/kg de peso corporal). Injeções bilaterais de um agonista seletivo do receptor GABA_A, muscimol (0,5 nmol/0.2 µl) no NPBL aumentou a ingestão de NaCl 1,8% e água (34.6±6.9 e 29.2±2.8 vs. salina: 4.4±2.4 e 9.4±2.5 ml/210 min, respectivamente) em ratos tratados com FURO+CAP. Injeções bilaterais de TACA (0,5 e 2,0 nmol/0.2 µl) no NPBL não alterou a ingestão de NaCl 1,8% induzida pela depleção de sódio (6.1±2.2 e 5.2±1.4 ml/210 min vs salina: 3.8±1.0 e 4.6±1.3 ml/210 min, respectivamente). A combinação de um antagonista GABA_C, Zapa sulphate (10 nmol/0.2 µl) e TACA (160 nmol/0.2 µl) injetados no NPBL não produziu nenhuma mudança na ingestão de NaCl 1,8%

($6,8 \pm 1.7$ ml/180 min). Injeções bilaterais isoladas de ZAPA sulphate no NPBL não mudou a ingestão de NaCl 1,8% e água. A Pressão Arterial e a Frequência Cardíaca não foram alteradas por injeções de TACA no NPBL. O resultados do presente estudo mostram que injeções bilaterais de TACA não inibiram ou facilitaram a ingestão de água e o apetite ao sódio durante a depleção aguda de água e sódio promovida por FURO+CAP.

Palavras-chave: apetite ao sódio, ingestão de água, núcleo parabraquial lateral, receptores de GABA_C.

Abstract

ABSTRACT

SOUZA, GDS. Cardiovascular effects and on 1,8% NaCl and water intake induced for trans-4-aminocrotonic acid injected into the lateral parabrachial nucleus (LPBN) of rats [Master degree]. Multicentric Graduated Program in Physiological Sciences at the Universidade Estadual Paulista (UNESP, Araçatuba, Brazil) and Brazilian Society of Physiology (SBFis); 2011.

Activation of GABA_A and GABA_B receptors in the lateral parabrachial nucleus (LPBN), with muscimol and baclofen, respectively, induces water and hypertonic NaCl intake in rats. In the present study we investigated the effects of bilateral injection of trans-4-aminocrotonic acid (TACA), an agonist of GABA_A and GABA_C receptors into the LPBN on water and 1.8% NaCl intake induced by acute fluid depletion. Male Wistar rats with stainless steel cannulas implanted bilaterally in the LPBN were used. They were acutely depleted of water and sodium by injections of the diuretic furosemide (FURO 10 mg/kg, bw) combined with low dose of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril (CAP 5 mg/kg, bw). Bilateral injections of a selective GABA_A receptor agonist, muscimol (0.5 nmol/0.2 µl) into the LPBN strongly increased NaCl 1.8% and water intake (34.6 ± 6.9 e 29.2 ± 2.8 vs saline: 4.4 ± 2.4 e 9.4 ± 2.5 ml/210 min) in FURO+CAP treated rats. Bilateral injections of TACA (0.5 and 2.0 nmol/0.2 µl) into the LPBN did not change sodium depletion-induced 1.8% NaCl intake (6.1 ± 2.2 and 5.2 ± 1.4 ml/210 min, respectively, vs saline: 3.8 ± 1.0 and 4.6 ± 1.3 ml/210 min). The combination of a GABA_C antagonist, ZAPA sulphate (10 nmol/0.2 µl) and TACA (160 nmol/0.2 µl) injected into the LPBN produced no change of 1.8% NaCl intake (6.8 ± 1.7 ml/180 min). Bilateral injections of ZAPA sulphate alone into the LPBN did not change water and 1.8% NaCl intake. Arterial blood pressure and heart rate were

not altered by TACA injected into the LPBN. We concluded that bilateral injection of TACA not inhibit or facilitate sodium appetite during acute fluid depletion.

KeyWords: sodium appetite, water intake, thirst, lateral parabrachial nucleus, GABAergic receptors

Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotomicrografia, mostrando o local de injeção bilateral no núcleo parabraquial lateral (NPBL) do corante Azul de Evans 2% (setas).....39
- Figura 2** – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA (0.5 nmol/0.2 µl, n=6) ou salina no NPBL41
- Figura 3** – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA (2 nmol/0.2 µl) e salina no NPBL43
- Figura 4** – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA (160 nmol/0.2 µl) e salina (veículo) no NPBL45
- Figura 5** – Efeito da injeção de ZAPA sulphate (10 nmol/0,2 µl) ou salina combinado com TACA (160 nmol/0.2 µl) ou salina injetados no NPBL bilateral na ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos depletados de sódio com furosemida + captopril46
- Figura 6** – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de muscimol (0.5 nmol/0,2 µl) e salina no NPBL48
- Figura 7** – Alterações na Pressão Arterial Média (mmHg) e Frequência Cardíaca (bpm) de ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA 2 nmol/0.2 µl e salina no NPBL50
- Figura 8** – Alterações na Pressão Arterial Média (mmHg) e Frequência Cardíaca (bpm) de ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA 80 nmol/0.2 µl e salina no NPBL52

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II - angiotensina II	mmHg – milímetros de mercúrio
AP - área postrema	mNTS – núcleo do trato solitário
bpm – batimentos por minuto	medial
Cl⁻ cloreto	Na⁺ - sódio
CAP - Captopril	NaCl – cloreto de sódio
CSN – sistema nervoso central	PAM – pressão arterial média
DOI - 2,5-Dimethoxy-4- iodoamphetamine	sc – subcutâneo
FURO – furosemida	TACA – ácido trans-4- aminocrotônico
GABA – ácido gama- aminobutírico	ZAPA – zapa sulphate
FC – Frequência cardíaca	sc – subcutânea
ip – intraperitoneal	α – alfa
icv - intracerebroventricular	μl – microlitro
K⁺ - potássio	β - beta
LPBN – núcleo parabraquial lateral	ρ - Rô
min - minutos	γ - gama
mm – milímetros	δ - delta
M2 – receptor muscarínico da acetilcolina	≤ - menor ou igual
	± - mais ou menos

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Implante de cânulas de aço inoxidável no NPBL	31
3.3 Injeção das drogas no NPBL	32
3.4 Drogas	33
3.5 Depleção de sódio e água (modelo FURO+CAP)	33
3.6 Registro de Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca	34
3.7 Análise histológica.....	34
3.8 Análise estatística	35
3.9 Protocolos experimentais	35
3.9.1 Injeções no NPBL bilateral de TACA ou muscimol na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados com FURO+CAP.....	36
3.9.2 Registro da PAM e FC em ratos depletados com FURO+CAP.....	36
4 RESULTADOS	
4.1 Histologia do NPBL	39
4.2 Efeito de injeções no NPBL bilateral de TACA na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados com FURO+CAP	40
4.3 Efeito de injeções no NPBL bilateral de muscimol na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados com FURO+CAP.....	47
4.4 Efeito de injeções no NPBL bilateral de TACA na Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos depletados com FURO+CAP	49

5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	73

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A osmolaridade plasmática é regulada por uma adequada ingestão e excreção de água e sódio. O comportamento de ingestão de água e sódio é importante para o controle do volume dos líquidos do organismo, que por sua vez é fundamental para a manutenção da Pressão Arterial (DE LUCA *et al.*, 2003).

As duas principais causas de ingestão de água e sódio são: a desidratação celular decorrente de um aumento da pressão osmótica do plasma e a hipovolemia causada por hemorragia e hipotensão (DENTON, *et al.*, 1984). Nestas situações, receptores e hormônios produzidos, sinalizam para o Sistema Nervoso Central (SNC) para desencadear respostas renais e/ou comportamentais de busca de água e sódio (THUNHORST *et al.*, 1994). Além disso, a ingestão ou apetite ao sódio é um comportamento que pode ocorrer em animais com necessidade de sódio pelo corpo (ingestão induzida) ou em animais que não precisam de sódio (ingestão livre) (FITZSIMONS, 1999).

Uma técnica de depleção de sódio induzida pelo tratamento com Furosemida seguido por 24 horas de dieta deficiente de sódio tem sido muito utilizada para pesquisas dos mecanismos de sede e apetite ao sódio devido à diurese e natriurese com conseqüente depleção de sódio e água (DENTON, 1984; FITZSIMONS, 1999; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). Outra técnica muito utilizada para estudo dos mecanismos de ingestão é a associação de furosemida com doses baixas subcutâneas de um inibidor periférico, mas não central da enzima conversora de angiotensina (captopril) que promove ingestão de sódio hipertônico (NaCl 1,8%) devido a formação de angiotensina II no SNC, sugerindo uma importante participação do sistema renina-angiotensina na ingestão de água e sódio (THUNHORST *et al.*, 1994; CALLERA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Entre as áreas posteriores do SNC envolvidas na regulação hidroeletrólítica, o Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL) localizada na ponte, dorsal ao pedúnculo cerebelar superior tem recebido bastante atenção (ANDRADE *et al.*, 2006; CALLERA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; MENANI *et al.*, 2002; MENANI *et al.*, 1995; MENANI *et al.*, 1998a,b,c; KIMURA *et al.*, 2008; OHMAN *et al.*, 1986). O NPBL recebe fibras provenientes de áreas posteriores do encéfalo envolvidas com o controle hidroeletrólítico, como a área postrema e a porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) (NORGREN, 1978; SHAPIRO *et al.*, 1985) e envia projeções para áreas mais anteriores, como para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo central da amígdala (CIRIELLO *et al.*, 1984; HERBERT *et al.*, 1990).

Estudos anteriores mostraram que a lesão eletrolítica do NPBL de ratos promoveu um aumento na ingestão de água induzida pela administração periférica ou central de angiotensina II ou injeção periférica de isoproterenol (OHMAN *et al.*, 1986, 1989; JOHNSON *et al.*, 1990), mas não alterou a ingestão de água induzida pela injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de carbacol (agonista colinérgico) (MENANI *et al.*, 1999), sugerindo o envolvimento de mecanismos específicos para a ingestão de água induzida pela angiotensina.

O NPBL tem um papel inibitório no controle da ingestão de água e sódio (DE LUCA *et al.*, 2003; CALLERA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; KIMURA *et al.*, 2008; MENANI *et al.*, 1995). Injeção no NPBL de metisergida (antagonista serotoninérgico) ou proglumide (antagonista da colecistocinina) promoveu aumento na ingestão de água e sódio induzida pela angiotensina II intracerebroventricular, pelo tratamento combinado furosemida (FURO) + captopril (CAP) (MENANI *et al.*, 1996; DE GOBBI *et al.*, 2001) e pelo tratamento com FURO seguido de manutenção dos ratos com dieta deficiente em sódio (MENANI *et al.*, 1998b). Portanto, estes estudos mostram também que a ingestão de água e sódio está sob influências inibitórias serotoninérgicas e colecistocinérgicas no NPBL.

O aminoácido inibitório GABA (ácido γ -aminobutírico) é o mais importante neurotransmissor inibitório nas porções gustatórias e viscerais do NPBL (KOBASHI *et al.*, 1998a,b). Dois diferentes subtipos de receptores que o neurotransmissor GABA pode ativar são: receptores ionotrópicos GABA_A que são ativados pelo agonista muscimol e bloqueados pelo antagonista bicuculina (AKAIKE *et al.*, 1985) e receptores metabotrópicos GABA_B que são ativados pelo agonista baclofen (BOWERY, 1989). No entanto, estudos têm mostrado a existência de um terceiro subtipo de receptor GABAérgico que é farmacologicamente diferente dos receptores GABAérgicos já descritos (ENZ *et al.*, 1998).

Os receptores GABA_A possuem diferentes subunidades, que são: subunidades α , subunidades β e subunidades γ além de uma subunidade δ . (GARRETT *et al.*, 2000; WHITING, 1999). Estudos de Fritschy *et al.* (1999) utilizando Western blot e imunohistoquímica mostraram que há também diferentes isoformas e subtipos de receptores GABA_B, denominados GABA_{B1a} e GABA_{B1b}. Este estudo mostrou a presença destes subtipos de receptores em células do hipocampo e dendritos das células de Purkinje. Esses receptores são distribuídos por todo o sistema nervoso de roedores com diferentes padrões de expressão. O predomínio do subtipo GABA_{B1a} está majoritariamente no núcleo estriado, hipocampo, giro denteado, a área pré-óptica, hipotálamo, o teto, camada de células granulares do cerebelo e o tronco encefálico. Enquanto os receptores GABA_{B1b} são altamente expressos nas camadas superficiais, habenula medial, núcleo interpeduncular, camada molecular do cerebelo e da medula espinal (FRITSCHY *et al.*, 1999; MARGETA-MITROVIC *et al.*, 1999). Existe outro subtipo de receptor denominado GABA_{B2}. Esta subunidade é encontrada principalmente em áreas do sistema nervoso central que incluem a maioria das camadas do neocortex, todas as áreas do hipocampo, estriado e células de Purkinje do cerebelo (CALVER *et al.*, 2000). Além disso, estudos de imunohistoquímica do cérebro humano demonstraram a existência dos receptores GABA_{B1} e GABA_{B2} em camadas

corticais, núcleo caudado e putâmen, hipocampo e em todas as regiões do tálamo, cerebelo e ponte (BILLINTON *et al.*, 2000).

Os receptores GABA_C foram descritos primeiramente na literatura com experimentos realizados com células da retina, descrevendo assim os primeiros neurônios com receptores para GABA_C (WOODWARD *et al.*, 1993). Estes receptores possuem uma eletrofisiologia diferenciada dos receptores GABA_A e GABA_B. As células neuronais dopaminérgicas da retina que expressam receptores GABA_C também expressam conjuntamente receptores para GABA_A e essas células são capazes de fazer ativação dos canais de cloreto intracelular (GUSTINCICH *et al.*, 1999).

Existem diferentes subunidades de receptores para GABA_C, e essas subunidades foram divididas em três categorias denominadas $\rho 1$, $\rho 2$ e $\rho 3$. Estes receptores GABA_C estão presentes em regiões do Sistema Nervoso Central como no hipocampo (ENZ *et al.*, 1995; WEGELIUS *et al.*, 1998; KIRISCHUK *et al.*, 2003), amígdala (DELANEY *et al.*, 1999) e tronco cerebral (MILLIGAN *et al.*, 2004). Os receptores GABA_C são ativados pelos agonistas CACA (cis-4-aminocrotonic - agonista seletivo) ou TACA (trans-4-aminocrotonic acid – agonista não-seletivo) sendo bloqueados pelo ZAPA sulphate (antagonista GABA_C) (WOODWARD *et al.*, 1992, 1993). Vale ressaltar, que os receptores GABA_C são insensíveis ao bloqueio com bicuculina (antagonista GABA_A) ou ativação com o baclofen (agonista GABA_B) (BORMANN *et al.*, 1996).

O TACA também pode agir como um agonista de algumas subunidades de receptores GABA_A. No entanto, ele também é classificado como um antagonista competitivo dos receptores $\rho 1$ e um agonista parcial sobre os receptores $\rho 2$ no encéfalo humano (VIEN *et al.*, 2002). No entanto, a maioria dos estudos que utilizaram TACA até o momento foram realizados *in vitro*. Através de técnicas de PCR em tempo real (RT-PCR), a subunidade $\rho 1$ de receptores GABA_C foi identificada principalmente na retina de ratos adultos e dos gânglios da raiz dorsal e expressa em menor quantidade no colículo superior, no hipocampo, tronco cerebral e tálamo

(VIEN *et al.*, 2002). A hibridização *in situ* revelou a expressão de $\rho 2$ na retina de ratos adultos e algumas outras partes das vias visuais (JOHNSTON *et al.*, 2003). Uma elevada expressão da subunidade $\rho 2$ foi observada na superfície da substância cinzenta, colículo superior e núcleo geniculado lateral dorsal. Também foi detectada expressão dessa subunidade na sexta camada do córtex visual e em células piramidais do hipocampo. Expressões de mRNA da subunidade $\rho 3$ foi claramente diferente da outras das subunidades $\rho 1$ e $\rho 2$, sendo expressas majoritariamente no hipocampo e minoritariamente na retina, nos gânglios da raiz dorsal e no córtex (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Estudos anteriores (DE LUCA *et al.*, 2003; CALLERA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; KIMURA *et al.*, 2008), foram realizados com o objetivo de avaliar o envolvimento dos mecanismos GABAérgicos no NPBL na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos. Estes estudos mostraram que a ativação no NPBL de receptores GABA_A com muscimol promoveu aumento de pressão arterial e induziu ingestão de NaCl 1.8% e água em ratos saciados e tratados com FURO+CAP (CALLERA *et al.*, 2005). Além disso, muscimol injetado bilateralmente no NPBL induziu ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos hiperosmóticos (tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 0.2 M) (KIMURA *et al.*, 2008), tratamento que induz hipernatremia, hiperosmolaridade e redução da renina plasmática, sem redução da volemia (PEREIRA *et al.*, 2002). Além do agonista GABA_A injetado bilateralmente no NPBL promover aumento na ingestão de água e NaCl 1,8%, um estudo recentemente publicado por De Oliveira *et al.* (2011), mostrou que injeções no NPBL de baclofen (agonista GABA_B) também promoveram aumento na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos saciados, porém não alterou os parâmetros cardiovasculares de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).

Portanto, qual seria o efeito da ativação dos receptores GABA_C no NPBL nos parâmetros cardiovasculares e na ingestão de água e sódio hipertônico em ratos?

Considerando que não existem informações na literatura mostrando o envolvimento dos receptores GABA_C no NPBL no controle cardiovascular e na ingestão de água e NaCl 1,8%, estudamos neste trabalho os efeitos da injeção no NPBL do agonista não seletivo GABA_A/GABA_C (TACA) nos valores basais de PAM e FC e na ingestão de água e sódio hipertônico em ratos depletados de sódio utilizando o modelo FURO+CAP. Os resultados encontrados, foram comparados com os resultados obtidos com a injeção de muscimol no NPBL de ratos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Investigar os efeitos da ativação ou bloqueio dos receptores GABA_C com injeções no NPBL bilateral de agonista e antagonista, TACA e ZAPA sulphate, respectivamente, na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados de sódio com injeções subcutâneas de furosemide e captopril.

2.2 Investigar os efeitos da ativação dos receptores GABA_C com injeções no NPBL bilateral de TACA, sobre valores basais de PAM e FC, em ratos depletados de sódio com injeções subcutâneas de FURO+CAP.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar com peso padronizado entre 290 e 320 gramas no início dos experimentos. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba (FOA). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no laboratório sob condições adequadas de umidade ($55 \pm 10\%$) e temperatura (22°C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas começando às 7 horas da manhã. Água, NaCl 1.8% e ração granulada estavam livremente disponível nas gaiolas. Estudo aprovado em 12/02/2009, pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da FOA (Protocolo número 2008-001332).

3.2 IMPLANTE DE CÂNULAS DE AÇO INOXIDÁVEL NO NPBL

Os ratos foram anestesiados com injeções intraperitoneais (i.p.) de Ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf). Com o auxílio de duas barras auriculares, a cabeça do animal foi colocada em posição fixa no estereotáxico. Após a assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal e o tecido subcutâneo foi removido, expondo as linhas lambda e bregma que foram utilizadas como referência para nivelar a cabeça do rato no mesmo nível horizontal. Utilizando-se a linha bregma e a linha mediana, foram determinados os

pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável, segundo as coordenadas obtidas do Atlas Histológico de Paxinos e Watson (1986): 9,4 mm caudal ao bregma; 2,2 mm lateral a linha média e 3,9 mm abaixo da dura-máter. Nestes pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Cânulas de aço inoxidável (12 mm) confeccionadas à partir de agulhas hipodérmicas (25x0,6 mm) foram posicionadas bilateralmente 2 mm acima do NPBL. Essas cânulas foram fixadas ao crânio do rato com resina acrílica de uso odontológico e ancorada por pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente introduzidos no osso. Após a completa fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e para impedir a obstrução da cânula guia até a realização dos experimentos foi introduzida na mesma um mandril (12 mm) também de aço inoxidável. O rato foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática após a cirurgia, foi injetado 0.2 ml de um antibiótico veterinário (associação de penicilina com estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular. Terminada a cirurgia cerebral, os ratos foram devolvidos em suas gaiolas individuais com ração, água e NaCl 1,8% por um período de pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos.

3.3 INJEÇÃO DAS DROGAS NO NPBL

As drogas TACA e ZAPA sulphate (agonista e antagonista dos receptores GABA_C, respectivamente), além de muscimol (agonista GABA_A) foram dissolvidas em salina fisiológica e injetadas no NPBL de ratos, usando-se uma seringa Hamilton de 10 µl, conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (30 gauge de diâmetro)

que foi introduzida através da cânula guia previamente fixada no mesmo. A cânula injetora foi 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume da injeção foi de 0.2 µL.

3.4 DROGAS

As drogas utilizadas foram: muscimol Hydrobromide (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na dose de 0.5 nmol/0.2 µL, TACA (Trans-4-aminocrotonic acid – Tocris, Ellisville, MO, USA) em doses de 0.5, 2.0, 80 e 160 nmol/0.2 µL, ZAPA Sulphate (Tocris, Ellisville, MO, USA) na dose de 10 nmol/0.2 µL, Furosemida (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na dose de 10 mg/kg e Captopril (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na dose de 5 mg/kg.

3.5 DEPLEÇÃO AGUDA DE SÓDIO E ÁGUA (MODELO FURO+CAP)

Depleção aguda de sódio e água foi induzida por injeções subcutâneas (sc) de furosemida (FURO, 10 mg/kg de peso corporal) associado com captopril (CAP, 5 mg/kg de peso corporal), como descrito previamente em estudos anteriores (MENANI *et al.*, 1996; DE GOBBI *et al.*, 2001; CALLERA *et al.*, 2005). Os ratos foram removidos das gaiolas para a injeção de FURO+CAP e retornaram as suas respectivas gaiolas na ausência da água, NaCl 1.8% e ração. Uma hora mais tarde, as buretas contendo água e NaCl 1.8% foram colocadas nas gaiolas e a ingestão foi medida de forma cumulativa em intervalos de 30 minutos durante 210

minutos de experimento. Os experimentos tiveram o intervalo de 48 horas.

3.6 REGISTRO DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os ratos foram anestesiados com Ketamina sc (80 mg/kg de peso) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal). Após este procedimento, tubo de polietileno (PE 10 conectada a um PE 50) foi inserido na artéria aorta abdominal através da artéria femoral. A cânula foi guiada por via subcutânea e exteriorizada na região cervical do animal. No dia seguinte, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão P23 Db (Statham Gould), acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences) conectado a um sistema de aquisição de sinais por computador Powerlab (Powerlab 8SP, ADInstruments) para registro de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos não anestesiados. Depois do registro dos parâmetros cardiovasculares durante ≥ 20 min (registro controle), os ratos foram depletados com FURO+CAP. Após 45 minutos, os ratos receberam injeções bilaterais de salina ou TACA (2 ou 80 nmol/0.2 μ l) no NPBL. Os valores de PAM e FC foram registradas durante 90 minutos após a injeção no NPBL e os valores registrados a cada 30 min. Durante as gravações de PAM e FC, água, NaCl 1,8% e ração não estavam disponíveis aos animais.

3.7 HISTOLOGIA CEREBRAL

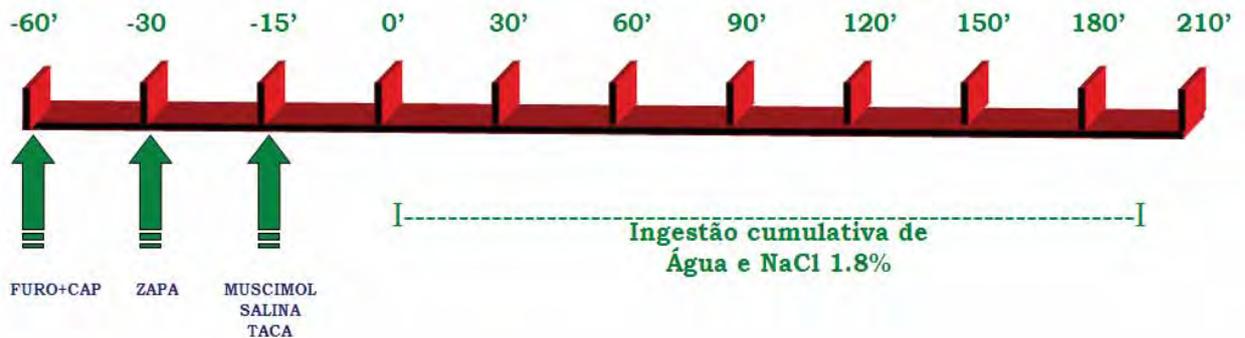
Terminados os experimentos, os ratos receberam uma injeção no NPBL bilateral do corante Azul de Evans 2% (volume de 0.2 µl) para determinar o local específico das injeções. A seguir, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (80 mg/kg i.p.) e submetidos a abertura da região torácica para exposição do coração para perfusão cerebral com salina tamponada (30 ml) seguida de perfusão com solução de formalina 10% (30 ml). Para facilitar a perfusão cerebral, a artéria aorta descendente foi bloqueada com pinça hemostática e a cava superior seccionada. A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formol 10% por alguns dias. Cortes transversais (60 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeções das drogas no NPBL com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina, foram analisados a fresco para se localizar os pontos das injeções. Somente os ratos que apresentaram marcações no NPBL bilateral foram considerados na análise estatística dos resultados.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls foram utilizados para as comparações entre os diferentes tratamentos. As diferenças estatísticas foram aceitas como significativas para $p < 0.05$.

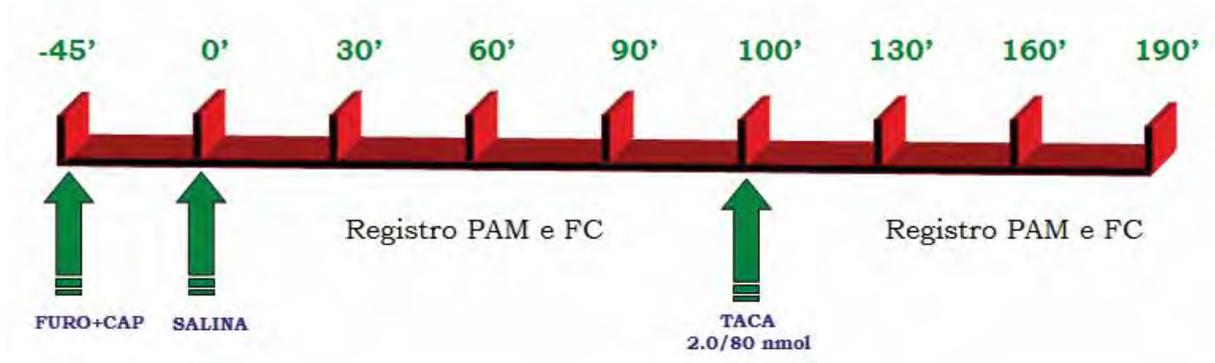
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.9.1. Injeções no NPBL bilateral de TACA ou muscimol na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados com FURO+CAP



Uma hora antes da realização dos experimentos os animais foram tratados com injeções subcutâneas de FURO+CAP para depleção aguda de água e sódio e imediatamente após este tratamento, os animais foram mantidos sem água, ração e NaCl 1,8% durante a execução do protocolos experimentais. Após 30 minutos do tratamento com FURO+CAP os animais receberam injeções do antagonista GABA_C ZAPA sulphate (10 nmol/0.2 µl). As injeções no NPBL de TACA (agonista GABA_A/GABA_C – em doses de 0.5, 2.0, e 160 nmol/0.2 µl) ou muscimol (agonista GABA_A – na dose de 0.5 nmol/0.2 µl) foram feitas 15 minutos antes do início das medidas de ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8%. Os ratos foram devolvidos nas gaiolas sem ração, água e NaCl 1.8% e após mais quinze minutos foram ofertadas aos animais, as buretas graduadas contendo solução de NaCl 1,8% e água. As medidas de ingestão foram realizadas de forma cumulativa aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos.

3.9.2. Registro da PAM e FC em ratos depletados com FURO+CAP



A medida da pressão arterial foi realizada em animais normotensos e não anestesiados um dia após a canulação da artéria femoral. Após um período de adaptação do animal ao local de registro (± 5 min) os animais receberam injeções sc de FURO+CAP. Após 45 minutos da depleção, foi injetado bilateralmente no NPBL salina 0,9% (0.2 μ l) e o registro da PAM e FC se deu por 30, 60 e 90 minutos. Logo após esta etapa, foram injetados bilateralmente TACA (2 ou 80 nmol/0.2 μ l) e realizados registros por mais 30, 60 e 90 min.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Histologia do NPBL

A Figura 1 mostra um corte histológico do núcleo parabraquial lateral (NPBL) de um rato representativo dos grupos estudados que recebeu as injeções do corante azul de Evans 2% no NPBL bilateral.



Figura 1- Fotomicrografia, mostrando o local de injeção bilateral no Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL) do corante Azul de Evans 2% (setas).

4.2 Efeito de injeções no NPBL bilateral de TACA na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados com FURO+CAP

A figura 2, mostra os resultados de injeções no NPBL de TACA (0.5 nmol/0.2 μ l, n=6) na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados de sódio com FURO+CAP. Não foram observadas modificações na ingestão de sódio e água com a administração de TACA, em animais depletados de sódio pelo modelo FURO+CAP (6.18 ± 2.24 e 5.65 ± 2.07 vs salina: 3.86 ± 1.03 e 5.38 ± 1.31 ml/210 min, respectivamente, $p > 0.05$).

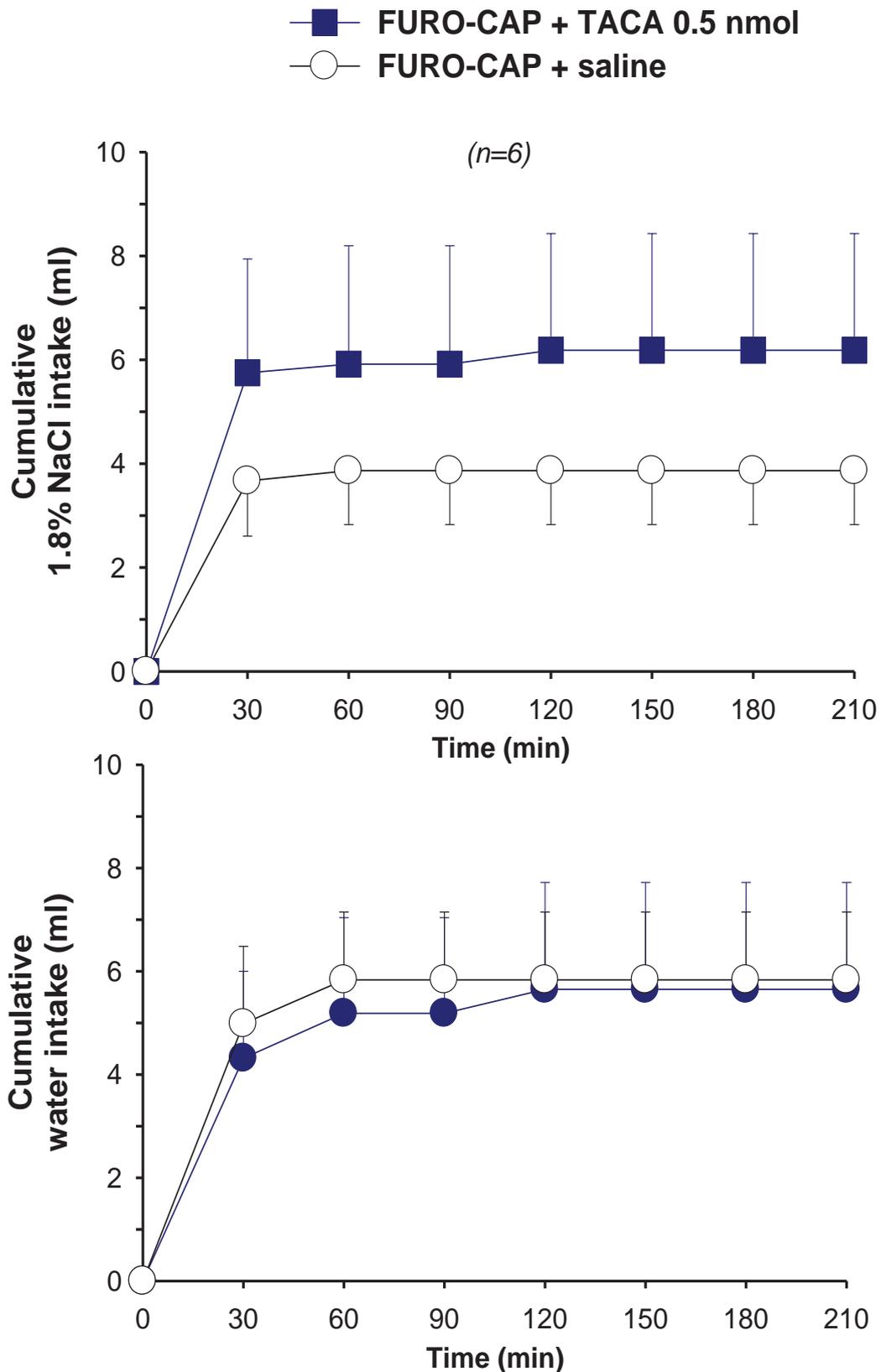


Figura 2 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA (0.5 nmol/0.2 μ l, n=6) e salina no NPBL. O primeiro gráfico representa ingestão de sódio, o segundo representa a ingestão de água. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM (n = número de ratos).

A figura 3, apresenta os resultados de injeções no NPBL de TACA (2 nmol/0.2 µl, n=11) na ingestão de água e NaCl 1.8% induzida pelo modelo FURO+CAP de depleção de sódio. Também não foram observadas modificações na ingestão de sódio e água com a administração de TACA nesta dose (5.20 ± 1.44 e 7.07 ± 1.38 vs salina: 4.65 ± 1.30 e 7.46 ± 1.58 ml/210 min, respectivamente, $p > 0.05$).

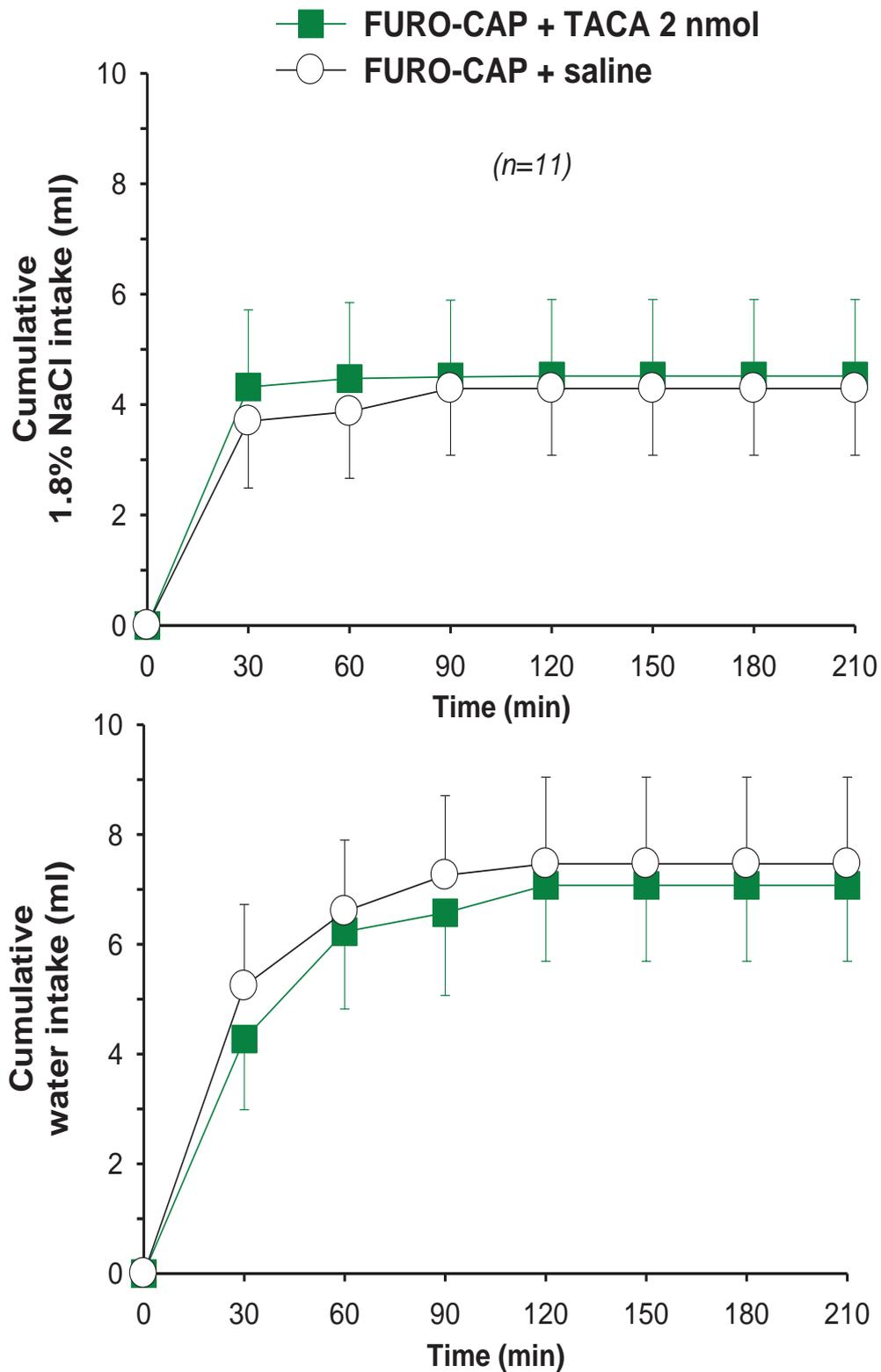


Figura 3 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA (2 nmol/0.2 μ l) e salina no NPBL. O primeiro gráfico representa ingestão de sódio, o segundo representa a ingestão de água. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM (n = número de ratos).

A figura 4, mostra os resultados de injeções no NPBL bilateral de TACA (160 nmol/0.2 μ l, n=10) na ingestão de água e NaCl 1.8% induzida pelo modelo FURO+CAP de depleção de sódio. Não foram observadas modificações na ingestão de NaCl 1.8% e água com a administração de TACA nesta dose (7.3 \pm 1.9 e 11.7 \pm 2.0 vs salina: 4.3 \pm 1.3 e 8.0 \pm 1.9 ml/210 min, respectivamente). A figura 5, mostra os resultados de injeções no NPBL do antagonista ZAPA sulphate (10 nmol/0.2 μ l, n=10), sozinho ou previamente ao TACA (160 nmol/0.2 μ l). Podemos observar que a ingestão de sódio e água não foi modificada após a administração sozinha de ZAPA sulphate no NPBL em ratos depletados de sódio (5.0 \pm 2.4 e 9.1 \pm 1.7 vs salina: 4.3 \pm 1.3 e 8.0 \pm 1.9 ml/210 min, respectivamente).

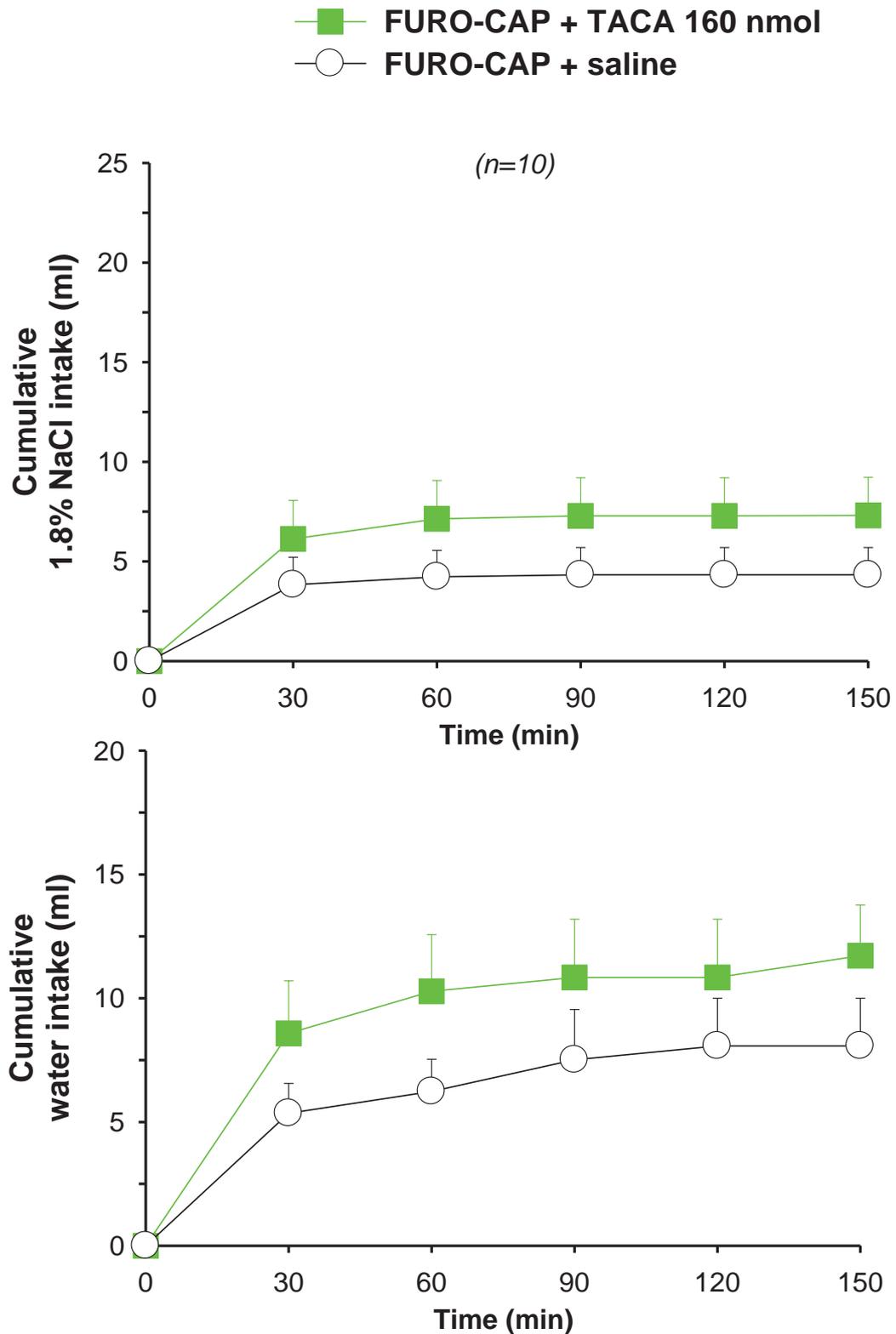


Figura 4 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA (160 nmol/0.2 μ l) e salina (veículo) no NPBL. O primeiro gráfico representa ingestão de sódio e o segundo representa a ingestão de água. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM (n = número de ratos).

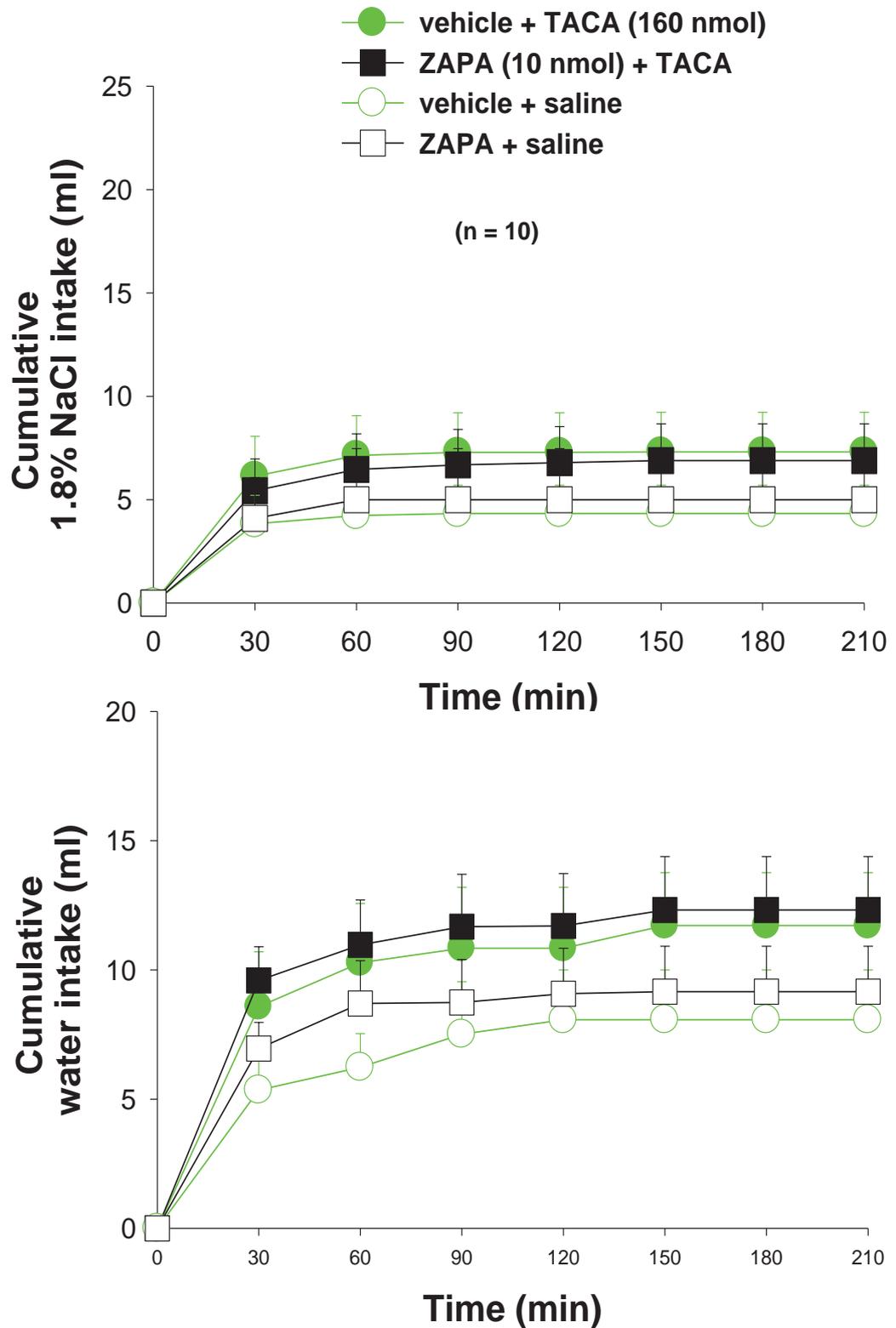


Figura 5: Efeito da injeção de ZAPA sulphate (10 nmol/0,2 µl) ou salina combinado com TACA (160 nmol/0.2 µl) ou salina injetados no NPBL bilateral na ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos depletados de sódio com furosemida + captopril (n = número de ratos).

4.3 Efeito de injeções no NPBL bilateral de muscimol na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados com FURO+CAP

Estudo anterior (Callera *et al.*, 2005), mostrou que injeções no NPBL bilateral de muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l), um agonista seletivo de receptores GABA_A, promoveu aumento da ingestão de NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP. Neste protocolo experimental, procuramos avaliar se injeções de muscimol, na mesma região do NPBL onde foi feita a injeção de TACA, observaríamos alterações na ingestão de NaCl 1.8% e água. A figura 6, mostra os resultados de injeções no NPBL do muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l, n=6) na ingestão de NaCl 1.8% e água no modelo de depleção de sódio promovido pela administração simultânea do diurético furosemida (10 mg/kg sc) e baixas doses do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (5 mg/kg sc).

Injeções de muscimol no NPBL promoveu aumento significativo da ingestão de NaCl 1.8% e água induzido pelo tratamento prévio com FURO+CAP (34.6 \pm 6.9 e 29.2 \pm 2.8 vs salina: 4.4 \pm 2.4 e 9.4 \pm 2.5 ml/210 min, p<0.05).

Os resultados apresentados, sugerem que a administração no NPBL bilateral de TACA (um agonista não seletivo dos receptores GABA_C), diferentemente da administração no NPBL de muscimol (um agonista dos receptores GABA_A), não exerce efeito excitatório ou inibitório sobre a ingestão de NaCl 1.8% e água em animais previamente tratados com FURO+CAP.

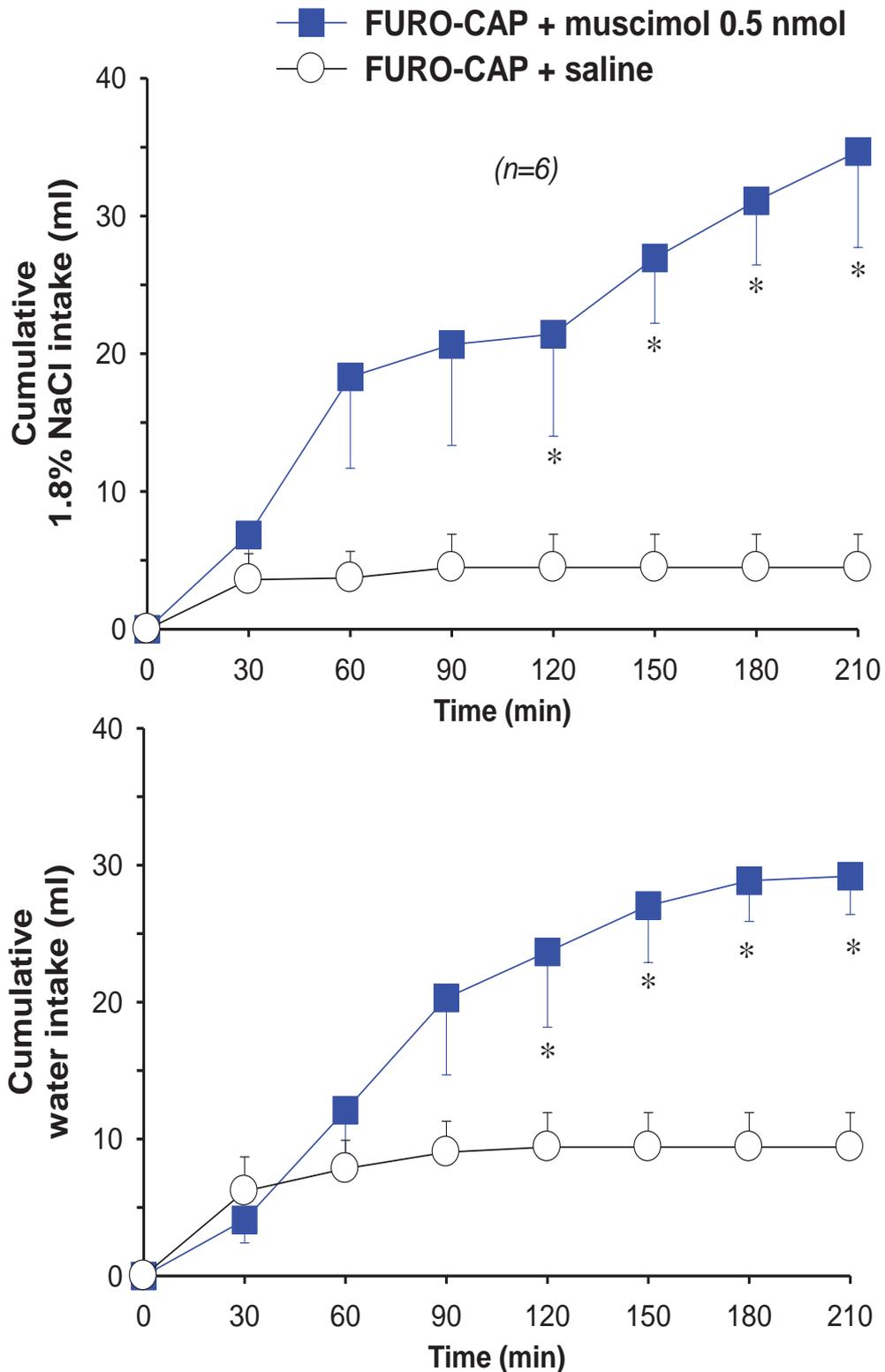


Figura 6 – Ingestão cumulativa de água e NaCl 1.8% em ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de muscimol (0.5 nmol/0,2 μ l) e salina no NPBL. O primeiro gráfico representa ingestão de sódio, o segundo representa a ingestão de água. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM (n = número de ratos).

4.4 Efeito de injeções no NPBL bilateral de TACA na Pressão Arterial Média e Freqüência Cardíaca em ratos depletados com FURO+CAP

A figura 7, mostra os resultados de injeções no NPBL de TACA (2 nmol/0.2 µl, n=6) na Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Freqüência Cardíaca (FC, bpm) em ratos depletados com FURO+CAP.

Em ratos normotensos (PAM: 101 ± 4 mmHg e FC: 423 ± 23 bpm) não foram observadas modificações na PAM e FC após injeções bilaterais no NPBL de TACA (2 nmol/0.2 µl, n=6) em animais depletados de sódio pelo modelo FURO+CAP (PAM: 2.9 ± 3.4 mmHg e FC: -9.3 ± 21.8 bpm vs salina: PAM: 3.3 ± 4.9 mmHg e FC: 9.9 ± 18.2 bpm/30 min), (PAM: 0.1 ± 4.0 mmHg e FC: -14.8 ± 23.1 bpm vs salina: PAM: 4.2 ± 4.6 mmHg e FC: -18.3 ± 19.3 bpm/60 min), (PAM: -0.2 ± 6.7 mmHg e FC: -10.5 ± 16.1 bpm vs salina: PAM: 9.8 ± 6.6 mmHg e FC: -13.7 ± 22.7 bpm/90 min).

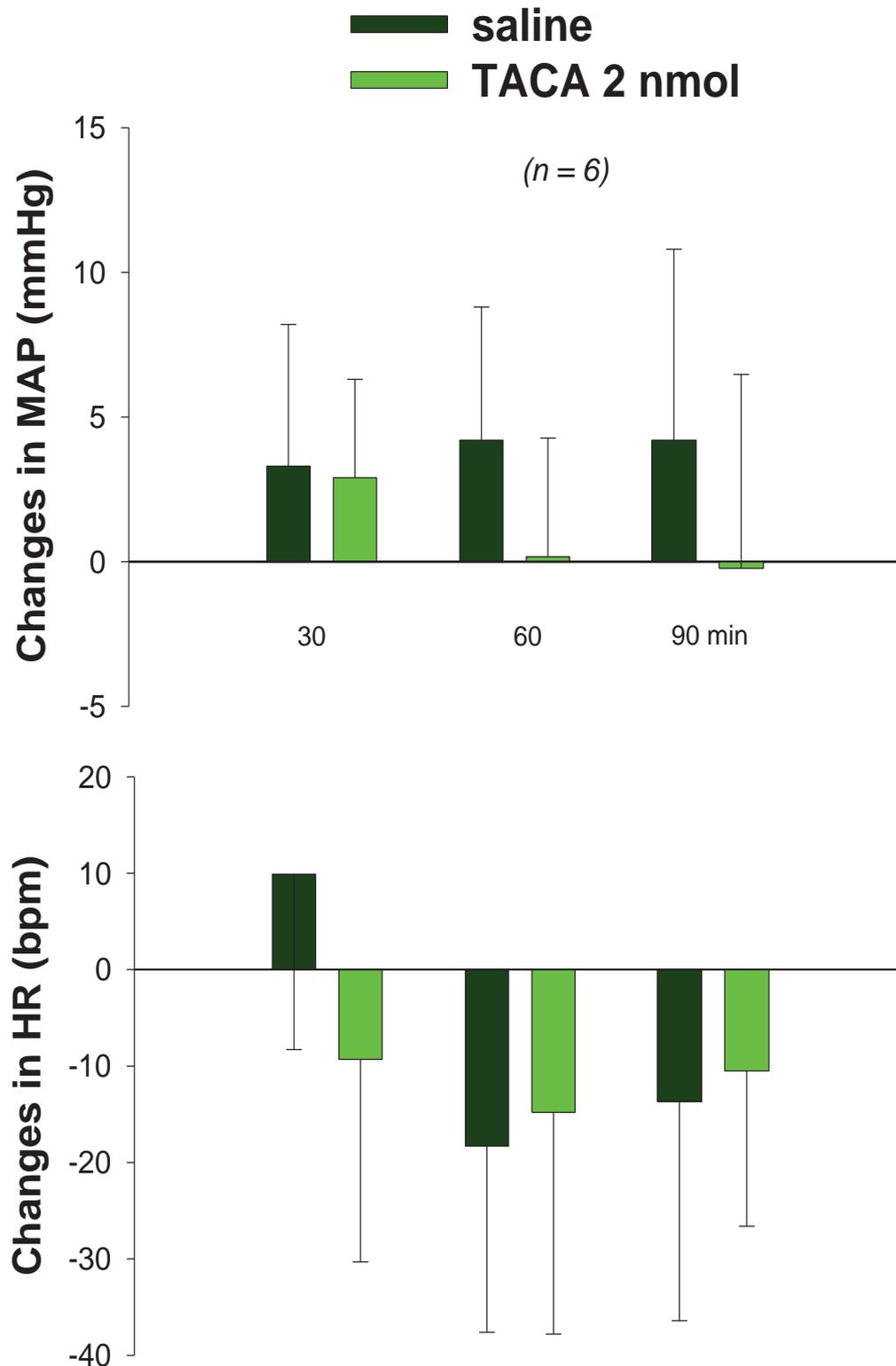


Figura 7 – Alterações na Pressão Arterial Média (mmHg) e Frequência Cardíaca (bpm) de ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA 2 nmol/0.2 μ l ou salina no NPBL. O primeiro gráfico representa pressão arterial média, o segundo representa a frequência cardíaca. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM (n = numero de ratos).

A figura 8 mostra os resultados de injeções no NPBL de TACA (80 nmol/0.2 μ l, n=4) na Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos depletados com FURO+CAP. Não foram observadas modificações na PAM e FC em animais depletados de sódio pelo modelo FURO+CAP. Com 30 min (PAM: -4.0 ± 6.5 mmHg e FC: $-6.7.0 \pm 42.6$ bpm vs salina: PAM: -2.1 ± 5.5 mmHg e FC: 2.8 ± 14.2 pbm/30 min), (PAM: $-9.9 \pm 7,1$ mmHg e FC: -18.5 ± 35.1 bpm vs salina: PAM: -2.2 ± 3.3 mmHg e FC: $-33.5 \pm 1+.5$ pbm/60 min), (PAM: -8.0 ± 5.0 mmHg e FC: 14.0 ± 29.8 bpm vs salina: PAM: 3.3 ± 6.0 mmHg e FC: -6.8 ± 11.2 pbm/90 min).

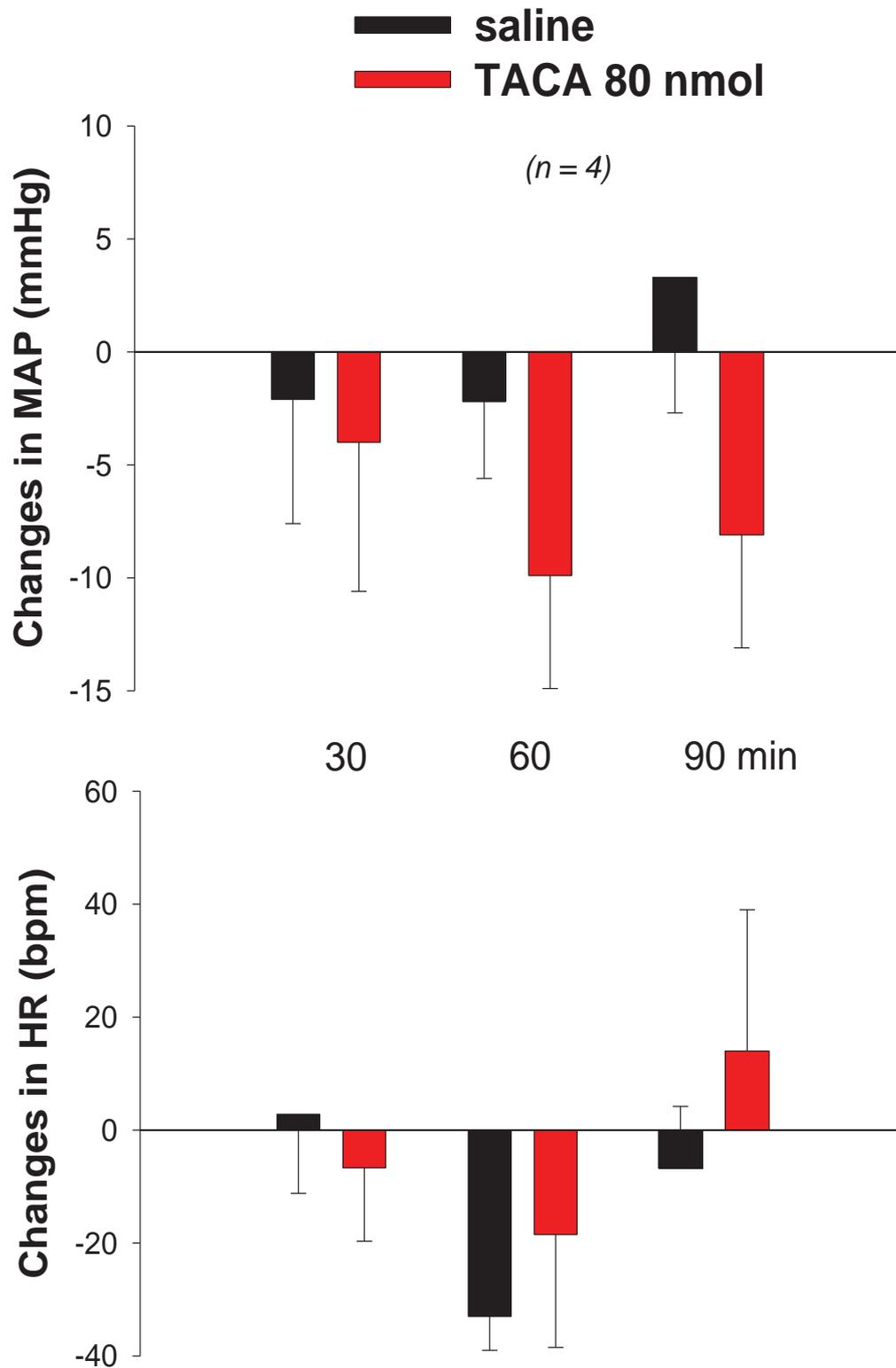


Figura 8 – Alterações na Pressão Arterial Média (mmHg) e Frequência Cardíaca (bpm) de ratos tratados com FURO+CAP que receberam injeções bilaterais de TACA 80 nmol/0.2 μ l e salina no NPBL. O primeiro gráfico representa Pressão Arterial Média, o segundo representa a Frequência Cardíaca. Os resultados foram expressos pela média \pm EPM (n = número de ratos).

Discussão

5 DISCUSSÃO

De acordo com estudos anteriores (Callera *et al.*, 2005), injeções no Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL) de muscimol, um agonista dos receptores GABA_A, promoveram aumento na ingestão de NaCl 1,8% e água em animais depletados de sódio com injeções subcutâneas (sc) de FURO+CAP. Em nossos resultados, injeções no NPBL bilateral de muscimol, também promoveu aumento na ingestão de água e sódio 1,8% em animais previamente tratados com FURO+CAP. O envolvimento dos receptores GABA_A do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl pode ser observado com injeções no NPBL bilateral do antagonista do receptor GABA_A bicuculina que diminui a ingestão de água e NaCl hipertônico induzida por injeções de muscimol, o que sugere que o muscimol ativa os receptores GABA_A para aumentar a ingestão de sódio em ratos saciados e depletados de sódio (CALLERA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo, mostram que injeções no NPBL bilateral de TACA (ácido trans-4-aminocrotônico), um agonista não seletivo do receptor GABA_C (WOODWARD *et al.*, 1992, 1993; FEIGENSPAN *et al.*, 1998) em diferentes doses (0,5, 2,0 e 160 nmol/0.2 µl) não altera a ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO+CAP. Nenhuma alteração ocorreu com os parâmetros cardiovasculares, como Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) após injeções no NPBL de TACA. Diferentemente, Callera *et al.*, (2005), mostraram que injeções no NPBL de muscimol produziu aumento na Pressão Arterial Média. O presente estudo mostra também que o pré-tratamento com injeções bilaterais do antagonista do receptor GABA_C ZAPA sulphate no NPBL combinado ou não com TACA injetado no NPBL, não promoveu alterações na ingestão de água e NaCl 1,8%.

Importantes mecanismos para o controle da ingestão de sódio e água estão presentes no NPBL, uma estrutura pontina localizada dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior (ANDRADE *et al.*, 2006; DE LUCA *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; MENANI *et al.*, 1995; MENANI *et al.*, 1998a,b,c; MENANI *et al.*, 2002;). Injeções bilaterais de metisergida no NPBL, um antagonista dos receptores serotoninérgicos aumentou a ingestão de NaCl hipertônico induzida pela angiotensina II (ANG II), administrada intracerebroventricular ou no órgão subfornical (OSF) (COLOMBARI *et al.*, 1996; MENANI *et al.*, 1996) ou por 24 horas de privação de água ou por 24 h de depleção de sódio ou por injeções subcutâneas (sc) de acetato deoxicorticosterona - DOCA (MENANI *et al.*, 1995; MENANI *et al.*, 1996; MENANI *et al.*, 1998a,b; DE GOBBI *et al.*, 2000). O bloqueio de receptores colecistocinérgicos ou a ativação de receptores alfa-2 adrenérgicos no NPBL aumenta a ingestão de NaCl em ratos tratados com FURO+CAP (ANDRADE *et al.*, 2006; DE GOBBI *et al.*, 2001).

O NPBL mantém conexões com áreas do prosencéfalo, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo, o núcleo central da amígdala, núcleo pré-óptico mediano, regiões bulbares, área postrema (AP) e a porção medial do núcleo do trato solitário (mNTS). Portanto, tais conexões permitem que o NPBL possa mediar respostas que vão da AP e mNTS para as áreas mais anteriores do cérebro que são capazes de regular comportamentos como os relacionados com ingestão de água e sódio. (NORGREN, 1978; CIRIELLO *et al.*, 1984; FULWILER *et al.*, 1984; HERBERT *et al.*, 1990; JHAMANDAS *et al.*, 1996).

O processamento neural no núcleo parabraquial está sob uma forte inibição GABAérgica mediada por diferentes tipos de receptores GABA (GUTHMANN *et al.*, 1998). Além de expressar diferentes tipos de receptores GABA como por exemplo, GABA_A e GABA_B, o NPBL também expressa receptores opióides e receptores muscarínicos (M2). A ativação desses receptores é capaz de aumentar a condutância da membrana ao

potássio promovendo uma hiperpolarização celular ocasionando inibição neuronal (CHRISTIE *et al.*, 1988).

Tem sido relatado que a ativação de receptores GABA_A com muscimol no NPBL produz aumento da Pressão Arterial Média em ratos saciados e aumenta a ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos depletados de sódio tratados com FURO+CAP subcutâneo (sc) (CALLERA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). Além disso, o bloqueio de mecanismos inibitórios no NPBL por injeções de muscimol produz aumento na ingestão de NaCl hipertônico em ratos com desidratação intracelular (KIMURA *et al.*, 2008). Um estudo recente, mostrou que a ativação de receptores GABA_B com baclofen no NPBL também induz a ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos saciados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O GABA é o neurotransmissor inibitório mais abundante presente no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos. Este neurotransmissor exerce suas atividades atuando em três tipos de receptores que são: GABA_A, GABA_B e GABA_C. Estes receptores possuem características farmacológicas diferentes. Os receptores GABA_A e GABA_C são canais iônicos, ou seja, receptores ionotrópicos. Já os receptores GABA_B são receptores metabotrópicos clássicos que atuam através de uma proteína G (CHEBIB *et al.*, 1999; BORMANN, 2000).

Os receptores GABA_A são compostos à partir de diferentes subunidades para formar uma estrutura pentamérica. Várias classes de subunidades, com múltiplas isoformas foram identificadas pela seqüência de sua homologia. No cérebro, esses receptores GABA parecem ser compostos por seis diferentes α -subunidades ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), três β -subunidades ($\beta 1$ - $\beta 3$), três γ -subunidades ($\gamma 1$ - $\gamma 3$) e uma subunidade δ . As subunidades de receptores GABA_A mais encontradas no SNC que exercem atividades inibitórias são compostas de 2 subunidades α , 2 subunidades β e uma subunidade γ (GARRETT *et al.*, 2000; WHITING, 1999).

Estudos eletrofisiológicos sugerem que diferentes subunidades ou combinações de subunidades de receptores GABA_A podem mediar

diferentes propriedades fisiológicas e farmacológicas dos canais iônicos operados por ligantes (SIEGHART, 1995; RUDOLPH *et al.*, 2001). Uma análise da distribuição imunohistoquímica de subunidades dos receptores GABA_A evidenciou a presença das subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\gamma 3$ no NPBL (PIRKER *et al.*, 2000). Portanto, baseados nestas evidências, podemos sugerir que o aumento na ingestão de NaCl hipertônico e água após injeção no NPBL de muscimol em ratos saciados ou tratados com FURO+CAP seja por ativação de subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\gamma 3$ dos receptores GABA_A.

Estudos realizados por Rudolph *et al.* (1999), mostraram que uma única mutação da subunidade $\alpha 1$ prejudica a sensibilidade dos receptores GABA_A para benzodiazepínicos, sem alterar a afinidade ao GABA, provocando uma perda do efeito sedativo, amnésico e anticonvulsivante dos receptores GABAérgicos. Estes dados indicam que as ações sedativa, amnésica e anticonvulsivante são mediadas principalmente por receptores contendo uma subunidade α em funcionamento. Portanto, os dados do presente estudo, também podem sugerir que o efeito do muscimol no NPBL em relação ao apetite ao sódio depende da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_A presente no NPBL.

Um estudo de Araki *et al.* (1992), investigou a distribuição de diferentes subunidades dos receptores GABA_A no SNC através de hibridização *in situ* e mostrou que há diferentes padrões de expressão de subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ dos receptores GABA_A em algumas regiões do SNC. No córtex cerebral, núcleo olfatório anterior, septo lateral, núcleos lateral e medial do complexo amigdalóide, núcleos anteriores do tálamo, sensoriais do trigêmeo e núcleo coclear foram algumas das áreas estudadas para identificar a expressão mRNA das subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ de receptores GABA_A. Os resultados deste estudo mostraram que há uma forte expressão tanto para a subunidade $\alpha 3$ quanto para a subunidade $\alpha 4$ nessas regiões. No entanto, foram observadas no bulbo olfatório, área pré-óptica e locus coeruleus, uma forte expressão de mRNA apenas da

subunidade $\alpha 3$. Em regiões como a camada granular do bulbo olfatório, caudado-putamen, núcleos dorsomedial e ventrolateral do tálamo e núcleos pontinos, o estudo mostrou uma forte expressão de mRNA das subunidades $\alpha 4$. No NPBL foi observada uma forte expressão de mRNA da subunidade $\alpha 3$ e uma moderada expressão da subunidade $\alpha 4$ (ARAKI *et al.* 1992).

Os receptores GABA_C são complexos protéicos homooligoméricos formados exclusivamente por subunidades ρ , das quais existem três. A expressão de receptores GABA_C é restrita a algumas estruturas, em contraste com a distribuição dos receptores GABA_A. Através da utilização de reação da polimerase em cadeia via transcriptase reversa (PCR) e hibridização *in situ* estudos mostraram que em ratos existem três subunidades de receptores GABA_C sendo elas $\rho 1$, $\rho 2$ e $\rho 3$, estando localizadas predominantemente na retina (CHEBIB *et al.*, 1999; BORMANN, 2000). No entanto, subunidades ρ também são expressas em neurônios centrais, incluindo o hipocampo (ENZ *et al.*, 1995; WEGELIUS *et al.*, 1998; KIRISCHUK *et al.*, 2003), a amígdala (DELANEY *et al.*, 1999) e tronco cerebral (MILLIGAN *et al.*, 2004), porém, não há evidências de que as subunidades ρ são expressas em neurônios do NPBL. Havendo ou não diferenças na densidade das subunidades ρ de receptores GABA_C existentes na retina e em outras estruturas do cérebro, como no NPBL, a expressão da subunidade $\rho 1$ parece ser necessária para formar receptores GABA_C funcionais. Essa conclusão se deu a partir de experimentos que foram realizados em células da retina e, portanto, o efeito inibitório mediado pela ativação de receptores GABA_C foi eliminado na ausência da expressão da subunidade $\rho 1$ (MCCALL *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Vien *et al.*, (2002) classificou o TACA como um agonista parcial capaz de atuar sobre as subunidades $\rho 1$ e $\rho 2$ dos receptores GABA_C, além de descrevê-lo como sendo útil para a distinção entre as subunidades $\rho 1$, $\rho 2$ e $\rho 3$ de receptores GABA_C (VIEN *et al.*, 2002). No ser humano, as subunidades $\rho 1$ e $\rho 2$ não se combinam com

as subunidades α , β e γ de receptores GABA_A, indicando que as ρ -subunidades não fazem parte da família de subunidades dos receptores GABA_A (RAGOZZINO et al., 1996, CHEBIB et al., 1998, HACKAM et al., 1998, CHEBIB et al., 1999). A subunidade $\rho 3$ de receptores GABA_C, como também as subunidades $\rho 1$ e $\rho 2$, têm-se mostrado insensíveis a bicuculina e aos moduladores de receptores GABA_A (VIEN et al., 2002).

Além das subunidades ρ de receptores GABA_C não fazerem combinações, também não há co-localização com as subunidades dos receptores GABA_A (KOULEN et al., 1998). Os receptores GABA_C se mostraram insensíveis ao antagonista de receptores GABA_A bicuculina, e ainda possuem alta afinidade ao seu agonista natural GABA. Os receptores GABA_C possuem características distintas dos receptores GABA_A e GABA_B, pois, sua cinética de ativação e inativação é lenta quando comparada aos outros receptores GABAérgicos (FEIGENSPAN et al., 1994a,b).

De acordo com os resultados apresentados, injeções no NPBL bilateral de TACA não promoveram alterações na ingestão de água e NaCl 1,8% e também não foram observadas alterações na Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC). Diferentemente, de acordo com Callera et al., (2005), injeções no NPBL do agonista GABA_A, muscimol, promove aumento significativo na Pressão Arterial Média (PAM) em animais saciados. Portanto, também podemos supor que os subtipos de receptores GABA_C podem não estar presentes na região do núcleo parabraquial onde foram feitas as injeções de TACA.

No presente estudo, utilizou-se o mais potente agonista do receptor GABA_C ácido trans-4-aminocrotônico (TACA), que ativa os receptores GABA_C de maneira não-seletiva. Estudos têm demonstrado que esse agonista pode atuar como agonista GABA_A e GABA_C (WOODWARD et al., 1993; BORMANN et al., 1995). Além disso, TACA também é eficaz nas subunidades $\rho 1$ e α/β de receptores GABA expressos em *Xenopus oocytes* (KUSAMA et al., 1993).

A ausência de efeitos de injeções bilaterais no NPBL de TACA na ingestão de água e sódio 1,8%, Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC), além de injeções bilaterais do antagonista dos receptores GABA_C (ZAPA) na ingestão de água e sódio 1,8%, sugere a possibilidade de que os receptores GABA_C ou as subunidades $\rho 1$, $\rho 2$ e $\rho 3$ podem não estar expressas em neurônios do NPBL, ou que o receptor GABA_C não está envolvido na modulação da sede e do apetite ao sódio. Ao nosso conhecimento, não existem dados disponíveis na literatura da expressão das subunidades dos receptores GABA_C no NPBL de ratos. Estudos de Milligan *et al.* (2004), utilizando a transcrição reversa - PCR e hibridização *in situ* mostraram que a subunidade $\rho 1$ é altamente expressa em neurônios do tronco encefálico.

Estudos a partir de preparações *in vitro* de lampreias, avaliaram o papel dos antagonistas e agonistas dos receptores GABA na atividade respiratória (BONGIANNI *et al.*, 2006). Os agonistas GABA_A e GABA_B promoveram a diminuição da atividade respiratória e o agonista do receptor GABA_C não modificou o padrão respiratório (BONGIANNI *et al.*, 2006). Os Resultados apresentados neste estudo são semelhantes ao mostrado acima, uma vez que, injeções no NPBL de TACA e ZAPA sulphate, agonista não-seletivo e antagonista dos receptores GABA_C, respectivamente, também não promoveram alterações na PAM e na ingestão de água e sódio 1,8% em animais tratados com FURO+CAP, diferente de injeções do muscimol.

Os resultados deste estudo, permite sugerir que o TACA não está agindo no receptor GABA_A porque injeções de diferentes doses de TACA no NPBL não produziram alterações na ingestão de água e sódio, diferentemente do muscimol, um agonista clássico do receptor GABA_A, que quando injetado no NPBL promoveu aumento da ingestão de sódio e água em ratos tratados com FURO+CAP (CALLERA *et al.*, 2005). Podemos sugerir que as subunidades ρ de receptores GABA_C, não estão envolvidas

no controle da ingestão de água e de sódio, ou ainda que a subunidade ρ pode representar uma população muito pequena nos neurônios do NPBL.

Portanto, os resultados apresentados neste estudo e anteriores (Callera *et al.*, 2005; De Oliveira *et al.*, 2007, 2011), mostram que a ativação dos receptores GABA_A e GABA_B, mas não GABA_C no NPBL facilita a ingestão de NaCl hipertônico e água em ratos depletados de sódio. Novos estudos devem ser realizados, incluindo experimentos com a substância cis-4-aminocrotonic acid (CACA), um agonista do receptor GABA_C, sendo menos potente, porém mais seletivo para os receptores GABA_C.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- A ativação de receptores GABA_A no NPBL de ratos promove o aumento na ingestão de água e sódio hipertônico em ratos previamente tratados com FURO+CAP.
- Injeções bilaterais de agonista e antagonista GABA_C, TACA e ZAPA sulphate, respectivamente, não promovem alterações na ingestão de água e NaCl hipertônico em ratos previamente tratados com FURO+CAP.
- Injeções no NPBL bilateral de TACA não promovem alterações nos níveis basais de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE N, HATTORI K, OOMURA Y, CARPENTER DO. Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric-acid gated cl⁻ conductance by different mechanisms. *Experientia*. 1985;41(1):70-1.

ANDRADE CAF, DE LUCA Jr LA, COLOMBARI DSA, MENANI JV. Alpha(2)-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. *Neuroscience*. 2006 Sep;142(1):21-8

ARAKI T, TOHYAMA M. Region-specific expression of gaba-a receptor alpha-3 and alpha-4 subunits messenger-rnas in the rat-brain. *Molecular Brain Research*. 1992;12(4):293-314.

BILLINTON A, STEAN TO, BOWERY NG, UPTON N. GABA(B(1)) splice variant mRNAs are differentially affected by electroshock induced seizure in rats. *Neuroreport*. 2000;11(17):3817-22.

BONGIANNI F, MUTOLO D, NARDONE F, PANTALEO T. GABAergic and glycinergic inhibitory mechanisms in the lamprey respiratory control. *Brain Research*. 2006;1090:134-45.

BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2000.

BORMANN J, FEIGENSPAN, A. GABA(C) RECEPTORS. *Trends in Neurosciences*, v. 18, n. 12, p. 515-519, 1995.

BORMANN J, FEIGENSPAN, A. Selective agonists for GABA(C) receptors - Reply. *Trends in Neurosciences*, v. 19, n. 5, p. 190-190, 1996.

BOWERY N. Gabab receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 10, n. 10, p. 401-407, 1989.

CALLERA JC, DE OLIVEIRA LB, BARBOSA SP, COLOMBARI DSA, DE LUCA Jr LA, MENANI JV. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial

nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. *Neuroscience*. 2005;134(3):725-35.

CALVER AR, MEDHURST AD, ROBBINS MJ, CHARLES KJ, EVANS ML, HARRISON DC, STAMMERS M, HUGHES SA, HERVIEU G, COUVE A, MOSS SJ, MIDDLEMISS DN, PANGALOS MN. The expression of GABA (B1) and GABA (B2) receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. 2000; *Neuroscience* 100, 155-170.

CHEBIB M, JOHNSTON GAR. The 'ABC' of GABA receptors: A brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 26, n. 11, p. 937-940, 1999.

CHEBIB M, MEWETT KN, JOHNSTON GAR. GABA(c) receptor antagonists differentiate between human p1 and p2 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology*. 1998;357(2-3):227-34.

CHRISTIE MJ, NORTH RA. Agonists at mu-opioid, m-2-muscarinic and gabab-receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurons. *British Journal of Pharmacology*, v. 95, n. 3, p. 896-902, 1988.

CIRIELLO J, LAWRENCE D, PITTMAN QJ. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. *Brain Research*. 1984;322(2):388-92.

COLOMBARI DSA, MENANI JV, JOHNSON AK. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 271, n. 6, p. R1470-R1476, 1996.

DE GOBBI JI, DE LUCA LA, MENANI JV. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Res*, v. 880, n. 1-2, p. 131-8, Oct 2000.

DE GOBBI JIF, DE LUCA LA, JOHNSON AK, MENANI JV. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 May;280(5):R1301-7.

DE LUCA Jr LA, BARBOSA SP, MENANI JV. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience*. 2003;121(4):1055-61.

DE OLIVEIRA LB, DE LUCA Jr LA, COLOMBARI DSA, COLOMBARI E, CALLERA JC, MENANI JV. Treatment with serotonergic 5HT(2A/2C) agonist inhibits NaCl intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. *Faseb Journal*. 2005;19(5):A1649-A.

DE OLIVEIRA LB, CALLERA JC, DE LUCA LA, COLOMBARI DSA, MENANI JV. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Research Bulletin*. 2007 Jul;73(4-6):238-47.

DE OLIVEIRA LB, KIMURA EH, CALLERA JC, DE LUCA LA, COLOMBARI DSA, MENANI JV. Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium chloride and sucrose intake in rats. *Neuroscience*, v. 183, p. 160-170, 2011.

DELANEY AJ, SAH P. GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 22, p. 9698-9704, 1999.

DENTON D. The hunger for salt: an anthropological, physiological and medical analysis, 2 nd Edition , Springer, Berlin. 1984

ENZ R, BRANDSTATTER JH, HARTVEIT E, WASSLE H, BORMANN J. Expression of gaba receptor rho-1 and rho-2 subunits in the retina and brain of the rat. *European Journal of Neuroscience*. 1995;7(7):1495-501.

ENZ R, CUTTING, GR. Molecular composition of GABA(C) receptors. *Vision Research* [S.I.], v. 38, n. 10, p. 1431-1441, 1998.

FEIGENSPAN A, BORMANN J. differential pharmacology of gaga(a) and gaba(c) receptors on rat retinal bipolar cells. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section*, v. 288, n. 1, p. 97-104, 1994a.

FEIGENSPAN A, BORMANN J. Modulation of gaba(c) receptors in rat retinal bipolar cells by protein-kinase-c. *Journal of Physiology-London*, v. 481, n. 2, p. 325-330, 1994b.

FEIGENSPAN A, BORMANN J. GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 17, n. 1, p. 99-126, 1998.

FEIGENSPAN A, WASSLE H, BORMANN J. Pharmacology of gaba receptor cl- channels in rat retinal bipolar cells. *Nature*. 1993;361(6408):159-62.

FITZSIMONS JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite (vol 78, pg 583, 1998). *Physiological Reviews*, v. 79, n. 2, p. U4-U4, 1999.

FRITSCHY JM, MESKENAITE V, WEINMANN O, HONER M, BENKE D, MOHLER H. GABA(B)-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *European Journal of Neuroscience*. 1999;11(3):761-8.

FULWILER CE, SAPER CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research Reviews*, v. 7, n. 3, p. 229-259, 1984.

GARRETT EM, HADINGHAM KL, WHITING PJ. Sequence and organisation of the mouse GABA-A epsilon gene. *European Journal of Neuroscience*. v. 12, 400-400, 2000.

GUSTINCICH S, FEIGENSPAN A, SIEGHART W, RAVIOLA E. Composition of the GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(18):7812-22.

GUTHMANN A, FRITSCHY JM, OTTERSEN OP, TORP R, HERBERT H. GABA, GABA transporters, GABA(A) receptor subunits, and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *Journal of Comparative Neurology*. 1998;400(2):229-43.

HACKAM AS, WANG TL, GUGGINO WB, CUTTING GR. Sequences in the amino termini of GABA rho and GABA(A) subunits specify their selective interaction in vitro. *Journal of Neurochemistry*. 1998;70(1):40-6.

HERBERT H, MOGA MM, SAPER CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular-formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1990;293(4):540-80.

JHAMANDAS JH, PETROV T, HARRIS KH, VU T, KRUKOFF TL. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: Electrophysiological and anatomical observations. *Brain Research Bulletin*. 1996;39(2):115-26.

JOHNSON AK, EDWARDS GL. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: GANTEN, D. Current topics in neuroendocrinology, behavioral aspects of neuroendocrinology. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 149-190, 1990.

JOHNSTON GA, CHEBIB M, HANRAHAN JR, MEWETT KN. GABA(C) receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003 Aug;2(4):260-8.

KIMURA EH, OLIVEIRA LB, COLOMBARI DSA, DE LUCA LA, MENANI JV, CALLERA JC. Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA(A) receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus. *Brain Research*. 2008 Jan;1190:86-93.

KIRISCHUK S, AKYELI J, IOSUB R, GRANTYN R. Pre- and postsynaptic contribution of GABA(C) receptors to GABAergic synaptic transmission in rat collicular slices and cultures. *European Journal of Neuroscience*. 2003;18(4):752-8.

KOBASHI M, BRADLEY RM. Differences in the intrinsic membrane characteristics of parabrachial nucleus neurons processing gustatory and visceral information. *Brain Research*. 781(1-2):218-26, 1998a.

KOBASHI M, BRADLEY RM. Effects of GABA on neurons of the gustatory and visceral zones of the parabrachial nucleus in rats. *Brain Research*. 799(2):323-8, 1998b

KOULEN P, BRANDSTATTER JH, ENZ R, BORMANN J, WASSLE H. Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina. *European Journal of Neuroscience*. 1998;10(1):115-27.

KUSAMA T, WANG TL, GUGGINO WB, CUTTING GR, UHL GR. Gaba rho-2 receptor pharmacological profile - gaba recognition site similarities to rho-1. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section*. 1993;245(1):83-4.

MARGETA-MITROVIC M, MITROVIC I, RILEY RC, JAN LY, BASBAUM AI. Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 1999;405(3):299-321.

MCCALL MA, LUKASIEWICZ PD, DEMARCO PJ, PEACHEY NS. Elimination of the GABA(C) receptor alters inner retinal signaling in the cone pathway. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43:896.

MENANI JV, JOHNSON AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms - angiotensin-induced pressor and drinking responses. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 1995;269(5):R1044-R9.

MENANI JV, THUNHORST RL, JOHNSON AK. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 1996;270(1):R162-R8.

MENANI JV, COLOMBARI DSA, BELTZ TG, THUNHORST RL, JOHNSON AK. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Research*.;801(1-2):29-35, 1998a.

MENANI JV, DE LUCA LA, JOHNSON AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol*. Feb;274(2 Pt 2):R555-60, 1998b.

MENANI JV, JOHNSON AK. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275(5):R1431-R7, 1998c.

MENANI JV, SATO MA, HAIKEL L, VIEIRA AA, DE ANDRADE CAF, DA SILVA DCF, RENZI A, DE LUCA LA. Central moxonidine on water and NaCl intake. 1999; *Brain Research Bulletin* 49, 273-279.

MENANI JV, BARBOSA SP, DE LUCA LA, DE GOBBI JIF, JOHNSON AK. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2002;282(3):R837-R41.

MILLIGAN CJ, BUCKLEY NJ, GARRET M, DEUCHARS J, DEUCHARS SA. Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA(A) and GABA(C) receptor subunits in native central neurons. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(33):7241-50.

NORGREN R. Projections from nucleus of solitary tract in rat. *Neuroscience*. 1978;3(2):207-218.

OHMAN LE, JOHNSON AK. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin-ii and isoproterenol. *American Journal of Physiology*. 1986;251(3):R504-R9.

OHMAN LE, JOHNSON AK. Brain-stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *American Journal of Physiology*. 1989;256(1):R264-R9.

PEREIRA DTB, VENDRAMINI RC, DAVID RB, NOZAKI PN, MENANI JV, DE LUCA LA. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiology & Behavior*, 2002, v. 76, n. 4-5, p. 501-505.

PIRKER S, SCHWARZER C, WIESELTHALER A, SIEGHART W, SPERK G. GABA(A) receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*. 2000;101(4):815-50.

RAGOZZINO D, WOODWARD RM, MURATA Y, EUSEBI F, OVERMAN LE, MILEDI R. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid(C) receptor antagonist. *Molecular Pharmacology*. 1996;50(4):1024-30.

RUDOLPH U, CRESTANI F, BENKE D, BRUNIG I, BENSON JA, FRITSCHY JM, MARTIN JR, BLUETHMANN H, MOHLER H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*. 1999;401(6755):796-800.

RUDOLPH U, CRESTANI F, MOHLER H. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001;22(4):188-94.

SHAPIRO RE, MISELIS RR. The central neural connections of the area postrema of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1985;234(3):344-64.

SIEGHART W. Structure and Pharmacology of gamma-aminobutyric acid(a) receptor subtypes. *Pharmacological Reviews*. 1995;47(2):181-234.

THUNHORST RL, JOHNSON AK. Renin-angiotensin, arterial blood-pressure, and salt appetite in rats. *American Journal of Physiology*. 1994;266(2):R458-R65.

VIEN J, DUKE RK, MEWETT KN, JOHNSTON GAR, SHINGAI R, CHEBIB M. trans-4-Amino-2-methylbut-2-enoic acid (2-MeTACA) and (+/-)-trans-2-aminomethylcyclopropanecarboxylic acid (+/-)-TAMP) can differentiate rat rho 3 from human rho 1 and rho 2 recombinant GABA(C) receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2002;135(4):883-90.

WEGELIUS K, PASTERNAK M, HILTUNEN JO, RIVERA C, KAILA K, SAARMA M, REEBEN M. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *European Journal of Neuroscience*. 1998;10(1):350-7.

WHITING PJ. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochemistry International*. 1999;34(5):387-90.

WOODWARD RM, POLENZANI L, MILEDI R. Characterization of bicuculline baclofen-insensitive gamma-aminobutyric-acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl⁻ channel inhibitors. *Molecular Pharmacology*. 1992;42(1):165-73.

WOODWARD RM, POLENZANI L, MILEDI R. Characterization of bicuculline baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric-acid receptors expressed in *xenopus* oocytes .2. Pharmacology of gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobutyric acidb receptor agonists and antagonists. *Molecular Pharmacology*. 1993;43(4):609-25.

