



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} DO NÚCLEO DORSAL DA RAFA NO MECANISMO DE SACIEDADE AO SÓDIO EM RATOS WISTAR

FABRICIA VIANA FONSECA

2011

FABRICIA VIANA FONSECA

**PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT1A DO NÚCLEO
DORSAL DA RAFE NO MECANISMO DE SACIEDADE
AO SÓDIO EM RATOS WISTAR**

Sob a Orientação do Professor
Luís Carlos Reis

e co-orientação
José Antunes Rodrigues

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

FABRICIA VIANA FONSECA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / / 2011.

Prof. Dr. Luís Carlos Reis – UFRRJ
(Orientador)

Prof. Dra. Denise Pires Carvalho – UFRJ

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura– UFPR

Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares – UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu irmão Juninho família mineira e em especial à minha família carioca representada pela minha segunda mãe, amiga e irmã Patrícia e meu segundo pai e cunhado André e aos meus sobrinhos lindos GU e GUTO pessoas maravilhosas que sempre me acolheram dividindo comigo casa, quarto, computador, alegrias, amor e sabedoria. Obrigada por tudo, amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luís Carlos Reis meu ilustríssimo orientador, meus sinceros agradecimentos pelo ensinamento constante mostrando que se faz ciência em qualquer lugar independente de situação financeira, “mestre dos mestres” amigo e exemplo de vida a ser seguido, sempre presente, exemplo disso é suas infinitas horas extras acumuladas na Rural.

A Rural por todos esses anos de formação, aliás, graduação e mestrado são por volta de 7 anos de convivência.

A sociedade Brasileira de Fisiologia pela criação do Programa e ao Professor Antunes, coordenador geral que sempre incentivou e ajudou na elaboração desse programa de pós-graduação.

Ao André Mecawi amigo de faculdade e futuro padrinho do meu casamento pelas idéias e colaboração constante na elaboração dessa dissertação tendo sempre muita paciência quando realizava perguntas, foi e está sendo uma das pessoas mais importantes na minha construção acadêmica e na pesquisa científica.

Aos demais futuros padrinhos Cema pessoa maravilhosa, carinhosa e exemplo de dedicação e amizade que tornou desde o primeiro dia de faculdade uma querida amiga, sempre pronta a ajudar e ensinar, teve uma importante participação nesta dissertação. A minha amiga maluca e linda Ailin pessoa que amo mesmo não estando perto, mas que inicialmente contribuiu muito para minha formação na pesquisa. Ao meu amigo Danilo por ter tornado a convivência no laboratório mais agradável, agradeço nossas intermináveis horas de conversas que de uma forma ou de outra contribuíram muito para minha formação.

Ao Victor e Vinicius por fazerem parte da minha formação acadêmica e em especial ao meu amigo de faculdade Vitinho por está sempre pronto a me escutar.

Aos professores do Departamento Luís, Magda, Welligton, Emerson, Frederico e Jairo que mesmo antes de entrar para o departamento me ensinaram a gostar de ciências básicas. Aos demais professores Fábio, Micheli, Luciano, Norma, Bruno e Alba que mesmo conhecendo depois percebo que seus ensinamentos são essenciais e por isso são integrantes desse grupo.

Aos funcionários do departamento representados por Vicente, Maria Rita, Franklin, Juca, Seu Nei e Dona Leni por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas de laboratório Claudinho, Raquel (fisio), Lígia, Rafael, Raquel (farmaco), Anderson, Guiniver, Nayane, Tine e Nátilia por tornarem a convivência mais agradável e em especial ao Robertinho e Gislaïne por terem me ajudado na execução de alguns protocolos bem como sendo pessoas em quem posso sempre confiar.

Aos professores do Cursão/USP pelo ensinamento e compromisso com a fisiologia e aos colegas de cursão por terem contribuído de forma intelectual nesta minha nova etapa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao meu noivo e futuro marido Hamilton, pessoa maravilhosa que tenho verdadeira admiração, me fez entender o verdadeiro amor entre homem e mulher, despertando em mim esse sentimento, e me tornando a mulher mais feliz do mundo. Amor da minha vida obrigada por fazer parte dessa estória. TE AMO.

À família do Hamilton, representada por minha sogra Nídia exemplo de vida, pessoa humilde e bondosa, a minha cunhada Fernanda e meu concunhado Tieppo, Nátilia, Oliveira, Guilherme, Elias, Dona Neil, seu cachorro Tosh e aos seus vizinhos de Santa Cruz obrigada pela torcida.

À família do meu cunhado André, galera de Nilópolis representada pela Marlene, Marquinho, Olga, Zé, Ana Clara, Big, Larissa, Beto, Eliane, Léo e Pedro pela agradável convivência diária sempre fazendo parte da minha rotina.

Aos meus avós falecidos Vovó Olivia e Vovô Zé Viana que sempre rezaram por mim, pedindo a Deus que me guiasse no melhor caminho e no lugar onde eles estejam estão olhando por

mim e sei que o quanto estaria orgulhosos por mais essa conquista. A tia Lina, tio Miguel e demais tios e primos que sempre torceram muito por essa conquista.

Aos meus amores eternos Gustavo e Augusto, meus sobrinhos que fazem da minha vida muito mais alegre e engraçada, são as “figuraças” da titia não sei o que seria da minha vida sem vocês. Obrigada meus amores por vocês existirem. Titia ama muito vocês!

À minha irmã Patrícia pela paciência e por sua dedicação e apesar de parecer mais nova do que eu sinto um amor de mãe por você. Obrigada maninha e te amo muito. Ao meu cunhado por me aturar todos esses anos sem reclamar “não querendo nunca que eu case” obrigada mesmo por tudo!

À mãe por ter depositado em mim a confiança investindo “sem reclamar” contribuindo financeiramente e pedindo sempre a Deus que me guiasse. Mãe obrigada por tudo, TE AMO muito tá!!! Ao meu querido pai por ter sempre paciência comigo, escutado minhas teorias sobre sal e pressão alta. Pai te amo muito e tenho muito orgulho de ser sua filha.

Ao meu irmão contador de histórias Juninho, mas que tenho uma verdadeira admiração por sua inteligência e seu jeito engraçado de ser e que mesmo depois de lhe dar um prejuízo de quase quatro mil nunca hesitou em cobrar!!! Te amo maninho.

Obrigada a Deus por guiar meus passos e tornar meu sonho realidade.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2-** Representação esquemática de secção sagital do encéfalo mostrando conexões entre area postrema (AP),parede da região antero-ventral do 3º ventrículo (AV3V) núcleo dorsal da rafe mesencefálica (DRN), núcleo parabraquial lateral (LPBN), nucleus tractus solitarius (NTS), pituitária (Pit), núcleo paraventricular do hipotálamo(PVN), órgão subfornicial (SFO). As linhas contínuas representam neurônios serotoninérgicos típicos originados noDRN e linhas interrompidas representam neurônios que contêm serotonina (mas não constituem os tipicamente serotoninérgicos) a partir da AP e NTS. Observam-se as conexões bidirecionais entre SFO e DRN e entre DRN e LPBN presumivelmente implicadas com a modulação do apetite ao sódio.....25
- Figura 3-** Fotografia do animal submetido a Cirurgia de esterotaxia.....32
- Figura 4-** Fotomicrografia de corte histológico com localização da cânula na região dorso-medial do DRN.....33
- Figura 5:** Escala Temporal do grupo de ratos repletos tratado agudamente com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.....34
- Figura 6:** Escala Temporal do grupo de ratos submetidos estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL e tratado agudamente com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.....34
- Figura 7:** Escala Temporal do grupo de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado) tratado cronicamente durante 6 dias com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. O Experimento foi realizado 24 horas após o ultimo dia de administração. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.....35
- Figura 8:** Escala Temporal do grupo de ratos submetidos ao Protocolo de Furosemida tratado cronicamente durante 6 dias com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. O Experimento foi realizado 24 horas após o tratamento com furosemida. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.....36
- Figura 9:** Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida) que receberam água ad libitum durante a depleção. Administração sistêmica de WAY100135 na dose de 5mg/kg intraperitoneal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.....36
- Figura 10:** Linha Temporal dde grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida), privação hídrica, administração de WAY100135 na dose de 5mg/kg intraperitoneal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.....37

- Figura 11: Linha Temporal do grupo de ratos em condição basal, microinjetado intra-DRN, na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....38**
- Figura 12: Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida), com água ad libitum, microinjeção aguda intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....38**
- Figura 13: Linha Temporal do grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida), privação hídrica, microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....38**
- Figura 14: Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção aguda de sódio (FUROCAP), microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....39**
- Figura 15: Linha temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção aguda de sódio (FUROCAP MODIFICADO), microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....40**
- Figura 16: Linha temporal de grupo de ratos, estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo (ISOPROTERENOL). Microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....40**
- Figura 17: Linha temporal de grupo de ratos, estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo (ISOPROTERENOL MODIFICADO). Microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.....41**
- Figura 18- Ingestão cumulativa de água (gráfica A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) animais em condições basais, tratados agudamente por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato . *P<0,05 quando comparado ao controle.....43**
- Figura 19- Ingestão cumulativa de água (gráfica A) e NaCl 1,8% (gráfico B) animais submetidos á estimulação estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL , tratados agudamente por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato.....45**
- Figura 20- Ingestão cumulativa de água (gráfica A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) em animais em condições basais, tratados cronicamente por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato . *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....46**
- Figura 21- Ingestão cumulativa de água (gráfica A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) em animais submetidos a depleção de volume, tratados**

cronicamente (6 dias) por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 quando comparado ao controle.....	48
Figura 22- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) em animais submetidos a depleção de volume pelo protocolo furosemida tratado sistemicamente com WAY100135 na dose de 5mg/kg, numa única administração, via intraperitoneal. **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....	50
Figura 23- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) em animais submetidos a depleção de volume pelo protocolo furosemida com privação hídrica tratado sistemicamente com WAY100135 na dose de 5mg/kg, numa única administração, via intraperitoneal.....	51
Figura 24- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais em condição basal tratado intra-DRN com uma única administração de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....	52
Figura 25- Ingestão cumulativa de água (gráfico A), NaCl 1,8% (gráfico B) em animais submetidos a depleção de volume pelo protocolo furosemida tratado agudamente com microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. **P<0,02 e ***P<0,01 quando comparado ao controle.....	54
Figura 26- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos ao protocolo de furosemida com privação hídrica e microinjeção aguda intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....	55
Figura 27- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) e de animais submetidos ao protocolo FUROCAP e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....	56
Figura 28- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos ao protocolo FUROCAP Modificado e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....	57
Figura 29- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos á estimulação estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato.....	58
Figura 30- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos á estimulação estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL Modificado e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.....	59

LISTA DE SIGLAS

SIGLA	NOME
3V	Terceiro Ventrículo (do inglês)
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial (do inglês)
ANG II	Angiotensina II
AP	Área Postrema
AV3V	Região Anteroventral do Terceiro Ventrículo (do inglês)
AVP	Argínina Vassopressina
BHE	Barreira Hematoencefálica
BVL	Amígdala basolateral (do inglês)
BST	Núcleo leito da estria terminal (do inglês)
CAP	Captobril
CVOs	Orgãos Circunventriculares (do inglês)
DRN	Núcleo Dorsal da Rafe (do inglês)
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FG	Fluorogold
IP	Intraperitonal
ICV	Intracerebroventricular
ISRS	Inibidores da recaptção de serotonina
LC	Locus Coeruleus (do inglês)
LPBN	Núcleo Parabraquial Latera (do inglês)
MnPO	Núcleo Préoptico Mediano (do inglês)
MnPOd	Núcleo Préoptico Mediano dorsal (do inglês)
MnPOv	Núcleo Préoptico Mediano ventral (do inglês)
MRN	Núcleo Mediano da Rafe (do inglês)
NA	Núcleo Accumbens (do inglês)
NTS	Núcleo Trato Solitário (do inglês)
OT	Ocitocina
OVLT	Orgão Vasculoso da Lamina Terminal (do inglês)
PVN	Núcleo Paraventricular (do inglês)
SC	Subcutâneo
SFO	Orgão Subfornicial (do inglês)
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo Supra-Óptico (do inglês)
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
5-HT	Serotonina

RESUMO

Nós investigamos o possível papel dos autorreceptor somatodentritico 5-HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe (NDR) sobre a resposta do consumo de sal em condições basais e após desafios natriorexigênicos induzido pela depleção de sódio em ratos. Ratos em condição basal, ratos submetidos a protocolos de depleção de sódio, onde os animais foram tratados com furosemida (20mg/kg, SC) ou protocolo FUROCAP, FUROCAP modificado, estimulação beta-adrenérgica ou modificação do protocolo de estimulação beta-adrenérgicos. Os animais que foram tratados com furosemida foram divididos em dois grupos de ratos: um sem acesso à água, e com água *ad libitum*. A cirurgia estereotáxica foi realizada para administração (7,5 nmol / rato) de 8-OH-DPAT e (2nmol / ratos) WAY100135 intra-DRN. Sistemicamente os animais receberam WAY100135 (5mg/kg, IP). Curiosamente, a microinjeção de 8-OH-DPAT no DRN promoveu um aumento suplementar de longa duração da ingestão de 0,3 M NaCl em ratos em condição basal, apesar de um elevado volume ingerido 30 minutos após a injeção central. Por outro lado, repetidas doses de microinjeção intra-DRN (7,5 nmol / rato) provocou uma diminuição significativa a longo prazo na ingestão de 0,3 M NaCl em ratos em condições basais e submetidos aos protocolos de depleção. Administração de WAY100135 não alteraram as respostas de ingestão de água ou NaCl 0,3 M no grupo sem acesso à água. Por outro lado, a administração sistêmica e intra-DRN de antagonista 5-HT_{1A} promoveu redução intensa e prolongada na resposta natriorexigênica, no grupo que recebeu água *ad libitum*. A administração aguda de antagonistas 5-HT_{1A}, diminuiu significativamente a ingestão de 0,3 M de NaCl nos protocolos de Furocap e Isoproterenol Modificado. Esta resposta, possivelmente, exigiu um aumento da atividade da 5-HT durante saciedade sal de sinalização ao longo da fase de consumação. Estes resultados mostram um claro envolvimento do 5-HT_{1A} DRN na saciedade ao sódio em condições basais e durante a fase de consumo de sal em ratos depletados.

ABSTRAT

We investigated the possible role of 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus (DRN) on salt intake response during basal conditions and following natriorexigenic challenge aroused by sodium depletion in rats. Rats in condition basal, rats submitted to protocols of sodium depletion, where the animals were treated with furosemide (20mg/kg, SC), protocol FUROCAP, modified FUROCAP, beta-adrenergic stimulated or modified beta-adrenergic protocols rats. Animals that were treated with furosemide were divided into two groups of rats with sodium depletion: one without access to water, and the other received water ad libitum. A stereotaxic surgery was realized for administering (7.5 nmol/rat) of 8-OH-DPAT and (2nmol/rats) WAY100135 intra- DRN. The animals received systemic WAY100135 (5 mg / kg, ip). Interestingly, microinjection of 8-OH-DPAT into the DRN raised an additional long-lasting increase of 0.3 M NaCl intake in sodium-depleted rats despite a high volume ingested 30 min after central injection. Conversely, repeated intra-DRN microinjection (7.5 nmol/rat) evoked a significant long-term decrease in 0.3 M NaCl intake in basal conditions and sodium-depleted rats. Administration of WAY100135 did not alter the responses of ingestion of water or 0.3 M NaCl in the group with no access to water. On the other hand, the 5-HT_{1A} antagonist promoted intense and long-term reduction in the natriorexigenic response, in the group that received water ad libitum. Acute administration of 5-HT_{1A} antagonist significantly decreased de 0.3 M NaCl ingestion in modified FUROCAP and modified beta-adrenergic protocols rats . This response possibly demanded an increased 5-HT activity during salt satiety signaling along the consummatory phase. These results show a clear-cut involvement of the DRN 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptors in sodium satiety signaling under basal conditions and during the consummatory phase of salt intake in sodium-depleted rats.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRAT.....	13
ÍNDICE.....	15
1-INTRODUÇÃO.....	17
2-OBJETIVOS.....	27
Objetivo Geral.....	28
Objetivos Específicos.....	28
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1-Apreciação Bioética da Experimentação Animal	30
3.2-Animais utilizados.....	30
3.3-Procedimento Cirúrgico.....	30
3.4-Injeção intra-DRN dos fármacos.....	31
3.5-Histologia.....	31
3.6-Fármacos utilizadas.....	32
3.7-Aferição da ingestão de água e sódio	32
3.8-Desafios Experimentais.....	32
3.9-Análise estatística dos resultados.....	33
3.10-Grupos Experimentais.....	33
4-RESULTADOS.....	42
4.1-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado).....	43
4.2-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos submetidos ao Protocolo Isoproterenol.....	45
4.3-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos em condição basal (normovolêmicos e normohidratado).....	46
4.4-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos depletados de sódio pelo Protocolo de Furosemida.....	48
4.5-Efeito da administração sistêmica aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos depletados pelo Protocolo Furosemida com água ad libitum.....	50
4.6-Efeito da administração sistêmica aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos depletados pelo Protocolo Furosemida sem acesso a água.....	51
4.7-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado).....	52

4.8-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos depletados de sódio pelo Protocolo Furosemida.....	54
4.9-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos depletados de sódio pelo Protocolo Furosemida com privação hídrica.....	55
4.10-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos á depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP.....	56
4.11-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos á depleção pelo Protocolo FUROCAP modificado.....	57
4.12-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos á estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL.....	58
4.13-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos á estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL Modificado.....	59
5-DISCUSÃO.....	61
6-CONCLUSÕES.....	72
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1-Papel do íon sódio na homeostase hidroeletrolítica

O íon sódio, obtido a partir da ingestão alimentar geralmente sob a forma de cloreto de sódio (NaCl) é essencial para a função fisiológica. A ausência de sua ingestão ou a incapacidade de retê-lo é incompatível com a sobrevivência. Este é o principal cátion do compartimento extracelular sendo o potássio do meio intracelular. Dessa forma o íon sódio desempenha um papel essencial na regulação da osmolaridade dos fluidos corporais, ou seja, o gradiente que regula o movimento de água. Neste contexto, uma alteração no estado de hidratação do corpo desencadeia respostas neuroendócrinas associadas a mecanismos integrados de aprendizado e memória. O comportamento de sede em humanos decorre de uma redução de osmolaridade plasmática cerca de 10% e um aumento de volume cerca de 2% (Fitzsimons, 1985). Os mecanismos neuroendócrinos e comportamentais garantem a manutenção da homeostase de sódio no organismo. Tendo em vista que o comportamento de ingestão de água e sódio é a única forma que seres humanos e animais possuem para repor a perda de ambos, o organismo dispõe de uma maquinaria funcional que compreende sistemas neurais prosencefálicos integrados ao eixo hipotálamo-hipofisário.

1.2-Mecanismo humorais que regulam volume e osmolaridade

O comportamento de ingestão de água e sal é um exemplo de estado motivado caracterizado por sinais fisiológicos integrados de controle do mecanismo de regulação de volume e osmolaridade. Dessa forma, destacam-se mecanismos humorais e centrais que medeiam essa regulação. Em circunstâncias normais a alteração da homeostase dos fluidos do corpo é corrigida primariamente pelos rins. O papel renal nesta função é de restabelecer os níveis de sódio via ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Tal sistema é acionado mediante uma condição de hiponatremia, bem como diminuição do volume do líquido extracelular (LEC). As condições descritas acima evocam ativação de sensores localizados nas células justaglomerulares da arteríola eferente, tais sensores são sensíveis à variação da concentração de sódio no LEC, eles estão localizados em células do túbulo distal num complexo celular conhecido como mácula densa. Este sistema renal promove a liberação de renina, que será responsável pela ativação do SRAA (Tigerstedt & Bergman, 1898; Buoninconti, 1966; Sadowska & Kochanowska, 1966; Poulsen, 1970; Davis & Freeman, 1976; Peart, 1978; Fitzsimons, 1998) Um subproduto importante desse SRAA é angiotensina II (ANG II) que induz diretamente o aumento da reabsorção de sódio pelo túbulo proximal e indiretamente aumenta a reabsorção de sódio pelo túbulo distal e coletor via atuação da aldosterona. ANG II tem um papel importante na indução de sede e apetite ao sódio, atuando em estruturas neurais.

Além dessas funções descritas acima a ANG II pode atuar promovendo aumento da liberação de arginina vasopressina (AVP) via ativação dos núcleos hipotalâmicos, regulação da pressão arterial e também pode atuar no mecanismo de aprendizado e memória (Fitzsimons, 1998). A aldosterona é o produto final do SRAA (Gaten & Stock, 1978; Kater et al. 1982) que tem sua liberação modulada pela ANGII e pela concentração plasmática de potássio; periféricamente atua regulando a reabsorção de sódio e potássio nos ductos coletores e colón (Booth et al. 2002). Foi descrita uma atuação central da aldosterona, aumentando o apetite por sódio (Sakai et al. 1996).

Ainda neste panorama de regulação da homeostase do íon sódio há importantes sistemas fisiológicos que são acionados em condição de hipernatremia e aumento do volume do LEC, tais sistemas integram os fatores inibidores como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e a ocitocina (OT). O ANP é liberado pelos cardiomiócitos atriais; o estímulo para sua liberação se deve a um aumento da pressão arterial e distensão da parede atrial. Tem uma participação relevante na regulação hidroeletrolítica uma vez que é considerado um potente agente diurético, natriurético e ainda tem ação vasodilatadora (De Bold et al. 1981). A atuação central do ANP foi descrita por Antunes-Rodrigues et al. (1986). Neste trabalho ele realizou administração intracerebroventricular (ICV) de ANP e evidenciou uma redução da ingestão de sódio em ratos submetidos à depleção de volume.

Outro fator inibitório é a OT produzida por neurônios localizados em núcleos hipotalâmicos como núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico (SON) tendo uma maior expressão de

neurônios ocitocinérgicos no PVN. Este peptídeo desempenha um papel semelhante ao do ANP como mostrado por Verbalis et al. (1995), onde a administração ICV de OT induziu resposta de inibição do apetite ao sódio.

Outro peptídeo hipotalâmico descrito é AVP que é produzida por estes mesmos núcleos hipotalâmicos descritos acima, porém com maior expressão no SON, embora haja diferenças eletrofisiologicamente entre os neurônios que produz OT e AVP (Armstrong, 1995). Além disso, a função fisiológica do AVP é também distinta a da OT. O AVP ao nível periférico atua nos ductos coletores renais aumentando a reabsorção de água, uma vez que aumenta a inserção de aquaporina 2 na membrana apical dos ductos coletores. Como já foi descrito por Klusmann (2000) a expressão de aquaporinas 3 e 4 na membrana basolateral é definitiva e assim a água é reabsorvida da urina para o sangue. Centralmente o AVP atua reduzindo o limiar para a sede osmótica (Szczepanska-Sadowska, 1982).

1.3- Mecanismos centrais que regulam osmolaridade e volume

Estudos realizados nos laboratórios que executam protocolo de depleção de sódio observam que o aumento da ingestão de salina hipertônica induzida e espontânea (Leshem et al. 2004) está atrelado a alterações de plasticidade do sistema nervoso, haja vista que salina hipertônica uma substância considerada aversiva se torna prazerosa frente a um estímulo de déficit de sódio. Neste contexto postula-se uma atuação do sistema nervoso central na modulação do balanço hídrico e de eletrólitos bem como nos componentes motivacionais relacionados com a ingestão de sódio.

Sabe-se atualmente da existência do (Sistema-Renina-Angiotensina) SRA central (Beresford & Fitzsimons, 1992; Sakai & Epstein, 1990) do qual neurônio angiotensinérgicos faz parte. Estes neurônios liberam ANG II centralmente em estruturas prosencefálicas localizadas na lâmina terminal (McKinley et al. 1986). Dentre tais estruturas, o órgão subfornicial (SFO) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) são denominados órgãos sensoriais circunventriculares (CVOs), portanto, destituídos de barreira hematoencefálica (BHE) (Johnson & Gross, 1993). Ainda nesta mesma linha de raciocínio, essas estruturas são responsáveis pelo controle central de apetite ao sódio e sede (Fitts et al. 1990; Weisinger et al. 1990; Thunhorst et al. 1998).

A integração do SRA periférico com SNC se deve à ausência de BHE nestas estruturas. Estas estruturas estão localizadas ao longo da parede do terceiro ventrículo (região ântero-ventral do 3º ventrículo, AV3V). Compõe ainda a lâmina terminal, o núcleo pré-óptico mediano, porção dorsal e ventral (MnPOd, MnPOv). O SFO tem múltiplas conexões eferentes e aferentes com várias regiões cerebrais que estão envolvidas na regulação central da função cardiovascular e regulação dos fluidos corporais (Saper & Loewy, 1980; Zardetto-Smith & Watson, 1987). Há em regiões específicas dos CVOs células sensíveis às variações de pressão osmótica, bem como alteração da concentração de sódio no plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR). Tais células são chamadas de osmoreceptores e sensores para íons sódio (Mc Kinley et al. 1978; Noda 2007). Achados de biologia molecular demonstraram que esses sensores de sódio são canais atípicos de sódio (Nax), devido à mínima homologia com os canais de sódio voltagem dependente (Goldin et al. 2000; Shimizu et al. 2007; Noda, 2007). No mesmo ano Watanabe et al. (2000) identificou esses canais nos CVOs e hipófise. Estudos realizados por Noda (2007) demonstraram uma interação entre neurônio e célula glial no controle da homeostase de sal. Neste trabalho ele observou que essa interação se deve à participação de canais Nax em células gliais do epêndima particularmente no SFO. Estes canais são ativados por um aumento do nível de sódio nos fluidos corporais tendo como mecanismos de sinalização neurônios gabaérgicos como inibidores de neurônios de projeção.

A região AV3V inclui a parte ventral do MnPO e o OVLT. Neurônios sensíveis à alteração de osmolaridade plasmática e no LCR estão localizados especificamente na região AV3V e SFO (Bisley et al. 1996). O hipotálamo também integra esse sistema cerebral de controle comportamental de ingestão de sal (Antunes-Rodrigues & Covian, 1963). Existem vários estudos que demonstraram a existência de um circuito neuronal modulando o equilíbrio hidroeletrólito através de conexão direta dessa estruturas descritas acima com outras estruturas prosencefálicas e mesencefálicas.

Evidências experimentais utilizando injeções de dois traçadores retrógrados fluorescentes no SON e o outro marcador para o PVN ipsilateral demonstraram marcação de neurônios no SFO e estruturas da região AV3V. Neste trabalho algumas células destas regiões foram encontradas duplamente marcadas sugerindo que elas projetam para ambos os PVN e SON através de ramificação dos axônios. (Weiss et al. 1990). Em 1995, Smith e colaboradores descreveram uma conexão direta do MnPO para grupos pontinos de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos. Tal grupo compreendia os núcleos da rafe região dorsal e locus coeruleus (LC) na ponte. Neste contexto, estas conexões parecem ser intrínsecas para respostas integradas do sistema endócrino com o sistema nervoso autônomo, bem como mudanças comportamentais objetivando restaurar o equilíbrio dos fluidos corporais (Antunes-Rodrigues et al. 2004).

Informações viscero-sensoriais gustativas chegam ao cérebro através de três principais relés: inervação vagal (X) da faringe, glossofaríngeo (IX) a inervação da língua posterior e facial (VII) a inervação da língua anterior. É através deste último que a sensação gustativa de sódio é transmitida ao SNC (Frank et al. 1983). A transecção da corda do tímpano, ramo do nervo facial, desencadeia ausência de percepção de sabor do NaCl, enquanto outras medidas de discriminação de gosto permaneceram intactas (Breslin et al. 1993). Estas inervações terminam na porção rostral do núcleo do trato solitário (NTS) (Hamilton & Norgren, 1984) e daí, projeções ascendem ao núcleo parabraquial lateral (NBPL) o qual projeta vias para a porção póstero-medial do tálamo, que por sua vez enviam fibras para áreas corticais implicadas com a discriminação gustativa.

Além desta principal via ascendente, existem vários níveis de ramificação que incluem projeções para estruturas, tais como a amígdala, núcleo leito da estria terminal e hipotálamo lateral.

Ainda neste panorama, a área postrema (AP) e porção medial adjacente do NTS são regiões importantes que podem influenciar a ingestão de sódio e água. Esta região recebe projeções aferentes de receptores que detectam alteração de volume como os barorreceptores atriais e cardiopulmonares (Johnson & Thunhorst, 1997). Ainda nesta mesma linha de raciocínio foi observado que lesões na AP bem como no NTSm induzem a respostas semelhantes a uma efetiva lesão no NPBL em relação a ingestão de água (Ohman & Johnson, 1989). O NPBL tem sido descrito como uma região cerebral que recebe projeções serotoninérgicas da AP e NTS (Lanca & Van der Kooy, 1985) e enviando fibras para outras regiões do cérebro conhecidas por desempenhar um papel importante na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al. 1990).

Neste contexto, NPBL localizado no tronco cerebral especificamente dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar é uma importante estrutura que atua modulando e integrando sinais relacionados com apetite ao sal e mecanismo de sede. Vários estudos têm demonstrado um papel inibitório do NPBL no apetite ao sódio e água (Menani & Johnson, 1995; Menani et al. 1996; Colombari et al. 1996; Menani et al. 1998; Darven & McKilenley, 2010). Lesões eletrolíticas no NPBL evocam aumento da resposta dipsogênicas e natriorexigênicas em ratos submetidos à administração periférica com isoproterenol (Ohman et al. 1986). Callera et al. (2005) mostraram que a administração bilateral de muscimol (agonista GABA-A) no NPBL induzia uma maior resposta natriorexigênica em ratos.

O núcleo accumbens (NAC) e a sinalização dopaminérgica constituem substrato neuroquímico criticamente envolvido na mediação de mecanismos de recompensa associados à alimentação e adição por drogas (Kelley, 1999). Evidências experimentais com microdiálise no NAC em ratos submetidos à depleção de sódio evocaram aumento dos níveis de dopamina extracelular após a ingestão de salina hipertônica (Hoebel et al. 1989). Esse aumento pode estar vinculado a uma menor atividade do transportador de dopamina (DAT) como foi observado por Roitman et al. (1999). Neste trabalho foi detectada uma menor atividade do DAT em ratos submetidos à depleção de sódio pela administração de furosemida e em estudo *in vitro* com a administração de aldosterona. Redução na atividade do DAT aumenta dopamina extracelular no NAC. Estes resultados sugerem um forte estado de motivação, semelhante ao estado que o apetite por sódio produz. Ratos submetidos à depleção de sódio por mais de uma vez apresentaram aumento da expressão de c-Fos no NAC e amígdala basolateral (BLA), em comparação aos ratos

depletados apenas uma vez, bem como ratos em condição basal (Morris et al. 2008). Estes dados sugerem que a necessidade de restabelecer os níveis de sódio pode induzir plasticidade cerebral em locais relacionados não só com o equilíbrio corporal de fluidos, mas também com a motivação, recompensa e humor.

O núcleo leito da estria terminal (BST) é um grupo de neurônios do prosencéfalo que circunda a comissura anterior e situa-se rostralmente ao tálamo. O BST recebe projeção direta de neurônios sensíveis à angiotensina II originados do SFO e OVLT (Sunn et al. 2003) sendo descrito como o destino de uma densa projeção aferente provenientes dos neurônios do NTS (Ricardo & Koh, 1978).

Ainda neste panorama de envolvimento central no balanço hidroeletrólítico relatos demonstram a participação de um sistema nitrérgico central na modulação desses sistemas mencionados anteriormente. Neste contexto tal sistema atuaria modulando a liberação de peptídeos como AVP e OT (Pow, 1992; Ventura et al. 2005). Estudos realizados por Ventura et al. (2005) observaram que o aumento dos níveis plasmáticos de OT e AVP foi acompanhado por um aumento da atividade da (NO sintase) NOS no PVN e SON. Evidências obtidas por Reis et al. (2010) demonstraram que uma única microinjeção de L-NAME (inibidor da NOS) no ICV induz aumento da ingestão de água e sal, bem como aumenta as concentrações plasmáticas de AVP, OT e ANP, com isto tal estudo retratou o envolvimento do sistema central nitrérgico na participação de respostas angiotensinérgicas que facilitam a liberação de AVP e OT evocadas por privação de água e hipovolemia.

1.4-Papel do núcleo dorsal da rafe (DRN) no equilíbrio hidroeletrólítico

Por fim, mais ainda nesta mesma linha de raciocínio que discute o envolvimento central da regulação da homeostase dos fluidos corporais os núcleos da rafe (NR) mais precisamente as regiões, dorsal e mediana participam de forma relevante neste controle. O papel do núcleo dorsal da rafe (DRN) no equilíbrio hidroeletrólítico foi descrito pela primeira vez por Reis et al. (1994) onde foi demonstrado um envolvimento do sistema serotoninérgico ascendente na estimulação e liberação de ANP. Neste estudo ele realizou lesão eletrolítica no DRN e evidenciou uma redução significativa nos níveis plasmáticos de ANP em animais submetidos à expansão de volume. Esses resultados suportam a hipótese da existência de uma atividade tônica de neurônios serotoninérgicos que tem seus corpos celulares localizados no DRN que se projetam para AV3V (Stein, 1987).

Anterior a esses achados Azmitia & Segal (1978) numa análise autorradiográfica identificou projeções do DRN para regiões que regulam alteração no equilíbrio hidroeletrólítico como OVLT, MnPO, SFO. Especificamente no SFO Lind, (1986) propôs uma conexão bidirecional desta estrutura com o DRN. Posteriormente Tanaka et al. (1998) relatou que injeção intra-carótida de ANG II induz alterações eletrofisiológicas dos neurônios do DRN, neste trabalho eles mostraram que os neurônios do SFO com projeções descendentes para o DRN são sensíveis à ANG II administrada. Sugeriram então que os neurônios do SFO que se projetam para o DRN podem monitorar o nível circulante de ANG II e transmitir as informações para o mesmo.

Franchini et al. (2002) realizando experimentos com a técnica de imunistoquímica detectou uma diminuição significativa da expressão c-Fos em neurônios serotoninérgicos localizados no DRN após depleção de sódio induzida pela diálise peritoneal. Por sua vez neste mesmo trabalho eles evidenciaram um aumento da expressão de c-Fos logo após a ingestão espontânea e induzida de sódio, sugerindo que há uma inibição tônica do apetite ao sódio por neurônios serotoninérgicos deste local.

1.5-Papel dos neurônios serotoninérgicos (5-HT) nos núcleos da rafe mesencefálica

Recentes estudos eletrofisiológicos têm demonstrado a heterogeneidade de neurônios serotoninérgicos (5-HT) nos núcleos da rafe mesencefálica. O DRN é constituído por agrupamento neuronal que basicamente é representado por neurônios serotoninérgicos, principalmente na região rostro-medial que se projetam rostralmente (Azmitia & Segal, 1978; Steinbusch, 1981; Azmitia,

1987; Bosler & Descarries, 1988). Desta forma, a resposta fisiológica depende de vários fatores vinculados a síntese e liberação de serotonina, bem como sua atuação em receptores específicos.

A primeira identificação de 5-HT no SNC foi feita por Twarog & Page (1953) achado considerado um importante marco para neurociência. Ela age como um neurotransmissor e foi identificada numa ampla variedade de locais no SNC, periférico e no tubo digestório (Jacobs & Azmitia, 1992). A sinalização serotoninérgica parece desempenhar um papel fundamental na geração e modulação de várias funções cognitivas e comportamentais. (Griebel, 1995; Artigas et al. 1996; Graeff et al. 1996). A síntese de 5-HT é regulada pelos níveis de triptofano, seu precursor primário, e pela atividade de isoformas de triptofano hidroxilase (TPH1 e TPH2), sendo a TPH2, uma enzima exclusivamente cerebral (Walther et al. 2003). A partir de sua síntese é posteriormente liberada para desencadear suas funções fisiológicas e em seguida recaptada pelo transportador 5-HT para subsequente degradação, pela ação da monoamina oxidase (MAO). Sua ação fisiológica é dependente da ativação de diferentes famílias de receptores serotoninérgicos.

1.6-Receptores serotoninérgicos

Atualmente são conhecidos 15 genes que codificam os receptores serotoninérgicos são eles 5-HT1A/B/D/E/F, 5-HT2A/B/C, 5-HT3A / B e 5-HT3C/D/E, 5-HT4, 5-HT5A / B, 5-HT6, 5-HT7. Esta população de receptor vem sendo alvo de vários estudos tendo em vista a necessidade de compressão da função atribuída a cada um dos receptores 5-HT no cérebro. A maioria dos receptores de serotonina pertence à família de receptores de membrana de sete domínios acoplados a proteína G, que realiza o mecanismo de transdução de sinais interferindo na atividade da fosfolipase C e adenilato ciclase. A única exceção é a classe de receptor 5HT3 que constituem canais iônicos.

1.7- Receptor 5-HT1A

O receptor 5-HT1A O receptor 5-HT1A foi o primeiro dos receptores serotoninérgicos a ser clonado e sequenciado (Fargin et al. 1988; Albert et al. 1990). Dentre essas classes de receptores citadas acima o receptor 5-HT1A está implicado em um mecanismo de autorregulação importante para modular a atividade serotoninérgica sendo designados neste caso como autorreceptores somatodendríticos. A densidade de receptores 5-HT1A é consideravelmente alta no sistema límbico, especialmente no hipocampo, outras regiões como septo lateral, áreas corticais (em especial o córtex cingulado e córtex entorrinal), e também os DRN e MDR. Em particular, os autoreceptores 5-HT1A no DRN pode desempenhar um papel crucial no controle fisiológico de vias ascendentes 5-HT, modulando a ativação excessiva dos neurônios 5-HT por vias excitatórias aferentes a partir das diferentes estruturas do prosencéfalo. Azmitia et al. (1996) relatou a existência de receptores 5-HT1A nas células cerebrais gliais, porém tal relato não foi confirmado por outros trabalhos (Burnet et al.1995; Kia et al. 1996).

Estudos realizados por Sotela et al. (1990), forneceu, com a técnica de imunohistoquímica, a primeira demonstração direta da existência de autorreceptores 5-HT1A no soma e dendritos dos neurônios serotoninérgicos nos DRN e MDR. Vários trabalhos vêm mostrando a importância da utilização de antagonistas 5-HT1A na terapia antidepressiva (Gartside et al. 1995; Artigas et al. 1996; Hashimoto et al. 1997; Mitchell & Redfern, 1997; Grignaschi et al. 1998; Trillat et al. 1998).

O aumento dos níveis de serotonina extracelular no prosencéfalo é induzido por inibidores da recaptação de serotonina (ISRS) que é limitado por um feedback negativo envolvendo autorreceptores localizados na rafe (Artigas et al.1996). Experimentos eletrofisiológicos têm estabelecido que a ativação do receptor 5-HT1A causa hiperpolarização neuronal, um efeito mediado por proteína Gi e resultante abertura de canais para K⁺ (Nicoll et al. 1990; Aghajanian. 1995; Kobilka et al. 1987). Além da principal via de transdução de sinal por ativação de subunidades G α induzindo a inibição da guanilato ciclase, há também envolvimento de subunidades $\beta\gamma$ ativando vias adicionais de transdução de sinal, como a ativação da fosfolipase C e proteína quinase C, bem como na modulação da condutância de canais para K⁺, ânions e outros cátions. (Raymond et al., 1999, 2001).

Curiosamente, a heterogeneidade observada na distribuição dos receptores 5-HT_{1A} tem sido associada com a diversidade na transdução de sinal do receptor. Atualmente o uso de agonistas (Blair et al. 1990) e antagonistas (Griebel, 1995) na clínica representam uma classe importante de moléculas com potenciais efeitos terapêuticos nos transtornos de ansiedade ou estresse.

O agonista mais estudado atualmente é o 8-OH-DPAT sendo altamente seletivo. Ele exibe alta afinidade tendo um $K_d = 0,3-1,8$ nm (Zifa & Fillion, 1992; Harikumar & Chattopadhyay, 1998; Harikumar et al. 2000; Kalipatnapu et al. 2004).

Estudos realizados por Fletcher et al. (1993) definiram o WAY100135 como sendo um antagonista altamente seletivo de ambos receptores 5-HT_{1A}, somatodendríticos e pós-sinápticos. Dados recentes indicam o antagonista WAY100135 tem propriedades agonistas parciais, pelo menos em alguns modelos (Schoeffter et al. 1997). Os receptores 5-HT_{1A} estão implicados na regulação da pressão arterial, apetite, termorregulação, aprendizado e memória, comportamento defensivo caracterizado como imobilidade tônica (Ferreira & Menescal-Oliveira, 2007) ciclo sono-vigília.

1.8-Papel do sistema serotoninérgico na excreção renal de sódio

Desde 1991 Reis e colaboradores demonstraram uma importante influência do sistema serotoninérgico na taxa de excreção renal de sódio (Reis et al. 1991; 1994), isto também foi visto anteriormente por Montes & Johnson (1990) onde eles atribuíram a resposta natriurética da serotonina a uma diminuição da atividade elétrica do nervo simpático renal.

O sistema serotoninérgico também influencia na liberação de ANP, como dito anteriormente (Reis et al. 1994), OT e AVP (Magalhães-Nunes et al. 2007). Neste trabalho Magalhães-Nunes e colaboradores evidenciaram um aumento significativo na concentração plasmática de OT e AVP em ratos tratados sistemicamente com sertralina (inibidor da recaptção de serotonina) por 21 dias, neste mesmo trabalho também foi observada uma inibição da ingestão de água em vários desafios experimentais.

1.9-Papel do sistema serotoninérgico no apetite por sódio

Anterior ao trabalho de Magalhães-Nunes e colaboradores, evidências experimentais do nosso laboratório demonstraram a participação desse sistema na regulação de mecanismo de modulação do apetite ao sódio como foi visto por Badauê-Passos et al. (2003), neste trabalho eles evidenciaram que administração sistêmica de agonista de receptor 5-HT_{2C} induziu inibição da ingestão de sódio. Neste mesmo ano Olivares et al. (2003) ao realizar lesões eletrolíticas no DRN em ratos submetidos a protocolo de depleção de volume também foram observados diminuição significativa na ingestão de NaCl 1,8%. Ainda neste mesmo panorama estudos realizados por Lima et al. (2004) com fármacos que induz depleção cerebral de serotonina como o PCPA (inibidor da triptofano hidroxilase) promoviam exacerbação do apetite ao sódio. Nesta mesma linha, trabalhos realizados pelo grupo de Reis promovendo lesão no DRN evidenciaram que esse mecanismo serotoninérgico de modulação de saciedade ao sal provavelmente é originário do DRN (Cavalcante-Lima et al. 2005a; 2005b; Reis 2007).

Em 2007, Badauê-Passos e colaboradores na realização de estudo imunohistoquímico onde os ratos foram previamente tratados Flurogold intra-DRN e decorridos 7 dias após a administração os animais foram submetidos ao protocolo de depleção de sódio por 24 horas (furosemida). Dessa forma, eles demonstraram que no período da fase ingestiva de fluidos, mecanismos fisiológicos centrais são acionados para promover saciedade. Esta fase que corresponde à saciedade é decorrente de uma rápida recuperação da osmolalidade plasmática, concentração de sódio e de volume extracelular, alterações detectados por estruturas da LT. Neste contexto, o DRN projeta-se para tais estruturas através de conexões monossinápticas possivelmente relacionadas com a modulação do apetite ao sódio.

Os mecanismos pelo qual o sistema serotoninérgico especificamente, a partir do DRN promove saciedade ao sal durante a fase de consumo ainda não estão totalmente desvendados, mas vários estudos têm contribuído para descrever as principais conexões neurais integradas nesta

importante função fisiológica. Ressalte-se que estruturas prosencefálicas que regulam o equilíbrio hidroeletrólítico como hipotálamo lateral, SFO, OVLT, MnPOv, MnPOd, PVN e SON são inervados por neurônios serotoninérgicos (Azmitia & Segal, 1978; Reis, 2007).

1.10-Circuitos neuronais que integra o DRN e SFO

Estudo realizado por Lind (1986) foi relevante para o entendimento desses circuitos neuronais que integra o DRN a outras estruturas envolvidas no mecanismo de controle homeostático dos eletrólitos, uma vez que ele identificou um circuito neuronal bidirecional entre SFO e DRN. Este circuito integra informações importantes para regulação hidroeletrólítica e cardiovasculares.

1.10-Circuitos neuronais que integra o DRN e núcleos hipotalâmicos

Neste contexto estudos evidenciaram a presença de terminais serotoninérgicos em áreas vasopressinérgicas e ocitocinérgicas, tais como no PVN e NSO (Sawchenko et al. 1983; Larsen et al. 1996). Achados experimentais de Franchini & Vivas (1999) em ratos submetidos à diálise peritoneal demonstraram através de análise de imunorreatividade de proteína Fos que durante a fase de consumo de sódio induzida pela diálise o sistema ocitocinérgico do PVN parece ser ativado por neurônio serotoninérgicos localizados no DRN. O aumento de OT plasmática, bem como a atividade de neurônios ocitocinérgicos torna-se expressiva após a ingestão de sal sendo este mecanismo fisiológico de inibição de apetite mais específico ao sódio (Godino et al. 2007). Com isso, essa integração parece representar um dos mecanismos que estaria diminuindo o apetite por sódio.

1.10-Circuitos neuronais que integra o DRN e LPBN

Outra região cerebral que foi estudada nessa integração é o LPBN. Estudos realizados por Menani et al. (1996) demonstraram, através de administração de metisergida, um antagonista de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} no LPBN em ratos submetidos ao protocolo FUROCAP apresentaram aumento da ingestão de salina hipertônica. Ainda discutindo o envolvimento do LPBN no mecanismo de saciedade ao sódio que integra o DRN, Margatho et al. (2008) realizando estudos imunohistoquímicos em ratos submetidos à expansão de volume detectou atividade neuronal em regiões do DRN que se projetam para o NPBL.

Estudos dos grupos de Menani, Vivas e Antunes-Rodrigues (Menani et al. 1996; 1998a; 1998b; 2002; Franchini et al. 2002; Margatho et al. 2007) reunidos às nossas evidências suscitaram a possibilidade de uma integração do LPBN em circuito com o DRN para a veiculação de informações às estruturas prosencefálicas implicadas com a regulação homeostática dos líquidos corpóreos, através do aumento da excreção de sódio e da saciedade ao sal.

Trabalhos usando microdiálise no LPBN em ratos submetidos ao protocolo de FUROCAP evidenciaram que quando estes animais ingeriam salina hipertônica (1,8%) e água, os níveis extracelulares de serotonina e seus metabolitos aumentaram no LPBN em contrapartida nos animais que não tiveram acesso aos bebedouros contendo água e salina hipertônica nesses animais tinha os níveis extracelulares de serotonina e seus metabolitos reduzidos. Neste mesmo trabalho foi evidenciado que esta redução também ocorria quando realizava microinjeção de ANG II no SFO (Tanaka et al. 2004). Neste contexto os níveis extracelulares de serotonina e seus metabolitos no LPBN parece crítica para induzir saciedade no momento que o animal está ingerido NaCl 1,8% e água.

1.11-Participação dos receptores 5-HT_{1A} do DRN na saciedade ao sal.

A atividade ascendente de neurônios serotoninérgicos, portanto, parece ser essencial para a modulação da resposta de apetite ao sódio. Reunindo todas as evidências elucidadas anteriormente os estudos até aqui sugerem a participação dos receptores 5-HT_{1A} do DRN no mecanismo de sinalização fina de sinalização de saciedade ao sal.

Estudos realizados pelo grupo de Ciccocioppo demonstraram que a administração sistêmica aguda de agonistas 5-HT_{1A} (Cooper et al. 1988; Cooper & Ciccocioppo, 1993) aumentava a

ingestão de sal em animais submetidos à privação hídrica. Entretanto, estes autores analisaram a ingestão de fluidos por apenas 30 minutos. Por outro lado, a administração sistêmica por longo prazo de agonistas serotoninérgicos de receptores 5-HT_{1A} provoca alterações na plasticidade dos autorreceptores somatodendríticos do DRN. Estas alterações neuroquímicas são representadas inicialmente por infra-regulação e posteriormente por dessensibilização destes receptores com concomitante aumento da liberação sináptica de serotonina (Sprouse & Aghajanian 1987, Hutson et al. 1989, Invernizzi et al. 1991).

Estas evidências na plasticidade dos autorreceptores somatodendríticos introduziram o conceito de que a obtenção de respostas terapêuticas por tratamentos crônicos com antidepressivos (especificamente os que são realizados com agonistas que ativam os receptores 5-HT_{1A}) é dependente de aumento da atividade serotoninérgica ascendente durante o tratamento da depressão (Hjorth et al. 2000; Assié et al. 2006; Watanabe et al. 2006).

1.12-Justificativa

Neste estudo pretendemos investigar este mecanismo de controle que integra autorreceptores somatodendríticos localizados no DRN, onde se acredita existir subnúcleos de neurônios serotoninérgicos que integram mecanismo de regulação do sódio corporal. Com isto, ensejamos a hipótese da existência de um grupamento de neurônios serotoninérgicos que ascendem a estruturas prosencefálicas para modular o apetite ao sódio e iniciar a saciedade ao sal.

Nesta condição, relevamos que a ativação dos autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos reduz a frequência de disparo dos neurônios serotoninérgicos, conforme amplo reconhecimento (Aghajanian, 1987; Blier & Montgny, 1990; Liu et al. 2005). Portanto, conjecturamos que uma resultante redução da transmissão serotoninérgica promove uma desinibição do mecanismo de modulação do apetite ao sódio levando a um aumento da ingestão de sal após administração aguda de agonista 5-HT_{1A}. Desta forma, defendemos a hipótese de que quando usamos um antagonista específico desse receptor, diminuindo sua atividade (ou seja, reduzindo a probabilidade de interação da serotonina com o receptor), possivelmente o oposto aconteça e o animal tende a reduzir a ingestão de salina NaCl 1,8% .

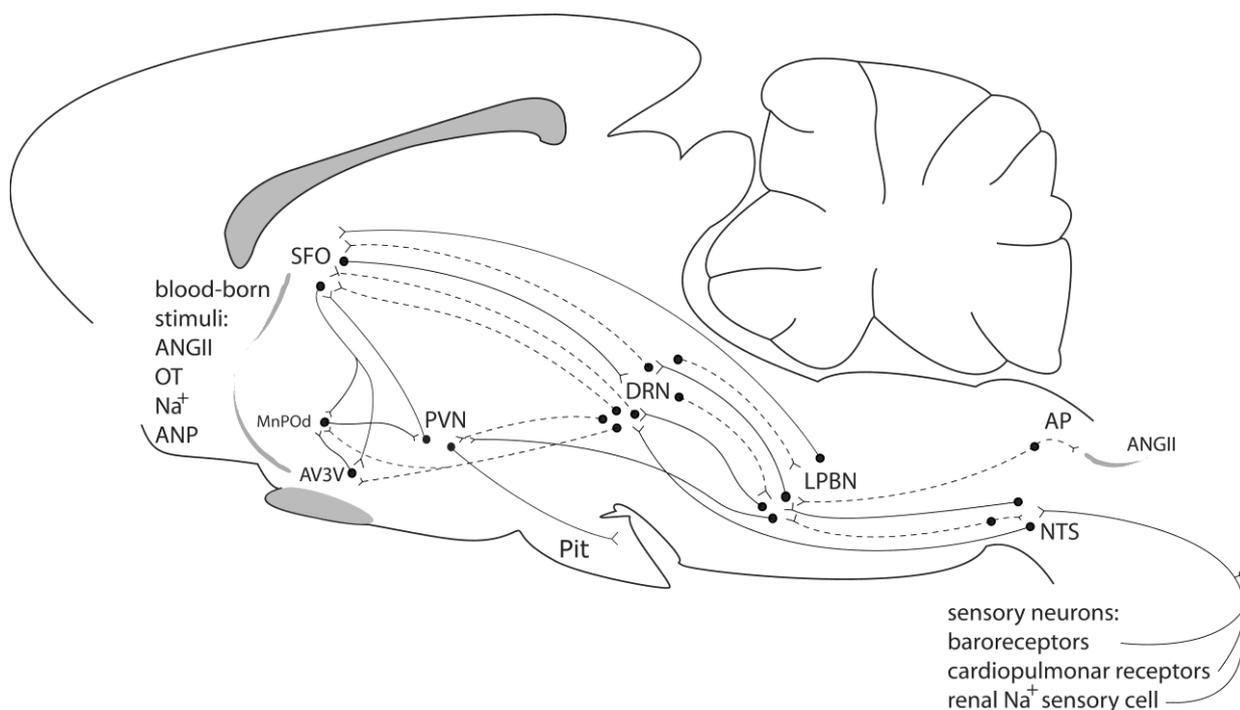


Figura 2- Representação esquemática de secção sagital do encéfalo mostrando conexões entre area postrema (AP), parede da região antero-ventral do 3º ventrículo (AV3V) núcleo dorsal da rafe mesencefálica (DRN), núcleo parabraquial lateral (LPBN), nucleus tractus solitarius (NTS), pituitária (Pit), núcleo paraventricular do hipotálamo(PVN), órgão subfornicial (SFO). As linhas contínuas representam neurônios serotonérgicos típicos originados no DRN e linhas interrompidas representam neurônios que contêm serotonina (mas não constituem os tipicamente serotonérgicos) a partir da AP e NTS. Observam-se as conexões bidirecionais entre SFO e DRN e entre DRN e LPBN presumivelmente implicadas com a modulação do apetite ao sódio. Elaboração e digitalização da figura de L.C. Reis, P.L. Cedraz-Merchez & R.H. Costa-e-Sousa (a partir de original publicado nos Anais da Academia Brasileira de Ciências por Reis, 2007).

2.OBJETIVO

Geral

Pretendemos examinar a hipótese da existência de mecanismos de controle da atividade serotoninérgica especificamente relacionada com a integração de sinais geradores da saciedade ao sal.

Específico

- 1- O efeito dos tratamentos agudos (intra-DRN) com o agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT no apetite ao sódio e mecanismo de interrupção de sede em condições basais e depletados.
- 2- O efeito do tratamento crônico (intra-DRN) com o agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT no apetite ao sódio e mecanismo de interrupção de sede em ratos em condição basal e depletados de sódio.
- 3- O efeito da administração sistêmica e intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 no apetite ao sal em ratos submetidos a diferentes paradigmas experimentais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Apreciação Bioética da Experimentação Animal

Esta dissertação faz parte de um projeto enquadrado na linha de pesquisa intitulada “**Influência do Sistema Serotoninérgico no Mecanismo de Saciedade ao Sal em Ratos**” tal linha considerada aprovada no Departamento de Ciências Fisiológicas foi previamente analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação em Biologia (CEPEB) do Instituto de Biologia da UFRRJ. Todas as manipulações experimentais serão executadas em consonância com o Guide for the Use of Laboratory Animals, publicado por USA National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revisado em 1996).

3.2- Animais utilizados

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar machos, sendo o número (N) variando de 5 a 11 para cada grupo experimental estudado e com peso variando de 300 a 320g. Os animais foram mantidos em gaiolas contendo alimento (ração peletizada padrão, Purina) e bebedouro contendo água *ad libitum*. As gaiolas eram colocadas no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRuralRJ. Nesta sala os animais são aclimatizados com um sistema de controle do ciclo claro/escuro (12 horas claro: 12 horas escuro) e temperatura ambiental (25 oC).

3.3- Procedimentos Cirúrgicos

Para estudo do envolvimento central dos receptores 5-HT_{1A} no mecanismo de saciedade ao sal, foram realizadas cirurgias de implantação estereotáxica de cânula no núcleo dorsal da rafe mesencefálica. Os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina cujo nome comercial é Dopalem (Vetbrands) na dose de 60 mg/Kg + xilazina cujo nome comercial é Rompun (Bayer) na dose de 7,5 mg/Kg, via intraperitoneal. Já num plano anestésico os animais foram fixados num aparelho estereotáxico (David Kopf). A calota craniana foi incisada e dissecada para exposição das suturas cranianas que são usadas como coordenadas para realização da implantação da cânula, todos os procedimentos foram realizados com as medidas usuais de assepsia. Uma vez localizados lambda e bregma, são tomadas as medidas estereotáxicas utilizando-se as coordenadas estereotáxica ântero-posterior = 7,6 a 7,8 mm posterior ao bregma; lateral = 0,0 mm; vertical = 6,4 a 6,6 mm a partir da calota craniana. Imediatamente após, o crânio é perfurado com auxílio de uma broca especial e uma cânula de aço inoxidável é implantada na estrutura estudada. Dois orifícios adicionais são feitos no crânio para a colocação de pequenos parafusos e, finalmente, acrílico autopolimerizável (meta-acrilato) é vertido sobre a superfície óssea objetivando a modelagem de um capacete. Foram implantadas cânulas de aço inox (12 mm, 0,6 mm de diâmetro externo) dirigido à porção dorso-medial do DRN. As coordenadas estereotáxicas foram utilizadas de acordo com o Atlas de Paxinos & Watson (1986) e Reis (1993). Após a cirurgia os animais foram tratados com dose profilática de Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge Saúde Animal), via intramuscular e mantida em gaiolas metabólicas ou coletivas por 5-7 dias para recuperação cirúrgica. Os ratos foram diariamente manipulados e treinados com as mesmas manobras que seriam utilizadas durante o experimento.



Figura 3- Fotografia do animal submetido a Cirurgia de estereotaxia.

3.4- Injeção intra-DRN dos fármacos.

Para administração dos fármacos no dia do experimento foi utilizado uma seringa Hamilton de 1µl conectado ao um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha gengival utilizada para fazer a injeção intra-DRN, tal agulha tinha 3 mm de diâmetro e 0,6 mm mais longa que cânula implantada. O volume injetado intra-DRN foi de 0,2 µl.

3.5-Histologia

Ao final dos procedimentos experimentais os ratos receberam injeção azul de Evans na dose de 2mg/0,2µl no DRN. Imediatamente os animais foram eutanasiados com guilhotina e a seguir os cérebros foram retirado e fixado em formalina 10% por alguns dias. Com auxílio de um criostato foram realizados cortes transversais com 50 µm de espessura nos sítios de injeção. Os cortes histológicos foram montados em lâminas e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina. A análise dos cortes foi feita com o auxílio do Atlas Paxinos e Watson (1986).

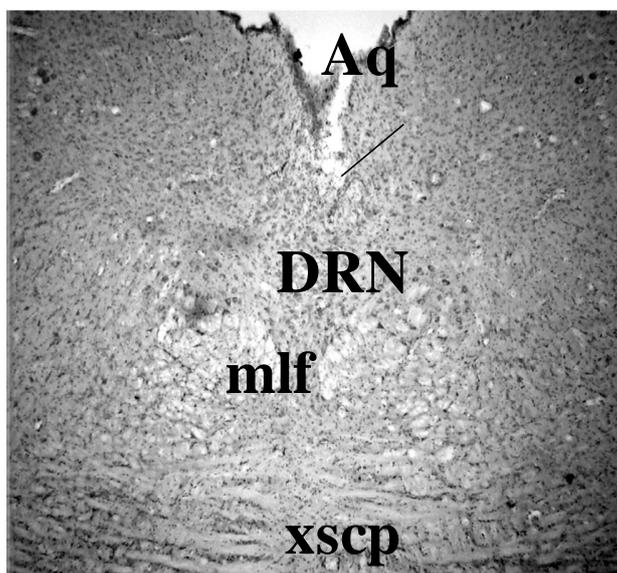


Figura 4- Fotomicrografia de corte histológico com localização da cânula na região dorso-medial do DRN. Aq: Arqueduto; mlf : xscp:.

3.6- Fármacos utilizados

3.6.1 Avaliação da atividade serotoninérgica

O 8-hidroxi-2-(di - n - propilamino) tetralina (8-OH DPAT) é um agonista de receptor 5-HT1A (adquirido da Sigma-Aldrich) foi dissolvido em salina isotônica 0,9% (veículo). 8-OH DPAT foi administrado intra-DRN na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. O WAY100135 é um antagonista altamente seletivo de ambos receptores 5-HT1A, somatodendríticos e pós-sinápticos (adquirido do Sigma-Aldrich). Dissolvido em também em salina isotônica foi administrado por via subcutânea na dose de 5mg/kg e intra-DRN na dose de 2nmol/0,2µl/animal.

3.6.2- Desafios experimentais

Furosemida, um inibidor do co-transporte 1Na⁺, 1K⁺, 2Cl⁻ no ramo ascendente espesso da alça de Henle, foi administrada na dose de 20mg/kg. Captopril, um inibidor de ECA usado na dose de 5mg/kg também foi injetado por via subcutânea. DL-isoproterenol agonista de receptor β-adrenérgico, liberador de renina e potente dipsógeno foi administrado na dose de 100 µg/kg por via subcutânea.

3.7 -Aferição da ingestão de água e sódio

A aferição da ingestão de água e sódio (após oferta de NaCl, 1,8%) foi realizada em gaiolas metabólicas dotadas de bebedouros volumétricos. A salina hipertônica é normalmente aversiva ao paladar de ratos bem como para os seres humanos. A ingestão de salina por ratos apenas ocorre quando se manifesta um déficit na concentração de Na⁺ e no volume dos líquidos corporais. A ingestão de fluidos é expressa em ml/animal por períodos variáveis, de acordo com o protocolo experimental (60, 120, 180, 240, 300, 330).

3.8-Desafios Experimentais

3.8.1- Depleção de sódio.

1-Protocolo da Furosemida: A depleção de sódio foi realizada através da administração de furosemida na dose de 20mg/kg, mais associação de e dieta pobre sem sódio (fubá) 24 horas antes do experimento (avaliação da resposta ingestiva). Devido ao seu potente efeito natriurético/diurético, a furosemida é amplamente empregada (por administração sc) como modelo clássico de indução de hiponatremia e hipovolemia em ratos, objetivando induzir a avidez por sal, ou seja, o apetite ao sódio (Fitzsimons, 1998; Badauê-Passos et al. 2003; 2007; Olivares et al. 2003; Cavalcante-Lima et al. 2005a; 2005b; Reis, 2007).

2-Protocolo Furocap: neste protocolo observamos uma depleção de sódio aguda (Mecawi et al. 2008) tendo em vista que os animais são previamente tratados com furosemida na dose de 10mg/kg + captopril na dose de 5 mg/kg, 60 minutos antes da oferta de fluidos. Dessa forma, tal protocolo como descritos por muitos pesquisadores configura uma resposta natriorexigênica elucidada pela geração de ANG II central devido ao aumento de ANG I sistêmica e diminuição de ANG II endógena, (Schiffirin et al. 1982; Fitts & Masson, 1989; Fitzsimons, 1998) esta ANG I por sua vez é convertida em ANGIO central pela ECA central em estruturas desprovidas de barreira hematocefálica como, por exemplo, SFO. A geração de ANG II por sua vez atua em receptores AT1 localizados nos SFO e OVLT induzindo sede e ingestão de sódio (Thunhorst et al. 1989; Oldfield & Mckinley, 1995; Thunhorst et al. 1994 Fitzsimons, 1998; Mckinley et al. 2001).

3-Protocolo Furocap Modificado: Este protocolo é uma modificação do protocolo descrito acima. Nesta condição, será feita a associação de furosemida (10 mg/kg, sc) + captopril (5 mg/kg, sc) em ratos previamente tratados com dieta pobre em sódio (fubá de milho) por 5 dias (Mecawi et al em preparação). Os animais foram mantidos sem acesso à água por 60 minutos e, em seguida, foram realizadas as manipulações experimentais centrais. A medida ingestão de fluidos será realizada por período de 30-330 minutos e diariamente de acordo com o protocolo experimental.

3.8.2- Indução de sede.

1- Protocolo de estimulação β -adrenérgico: Este protocolo é considerado um potente indutor de sede uma vez que aumenta a liberação de renina. Seu efeito dipsogênico deve-se a administração de isoproterenol na dose de 100 μ g/kg, 60 minutos antes da oferta dos fluidos. O isoproterenol tem uma ação direta por estimulação de receptores β_1 nas células justaglomerular e indireta provendo ativação do simpático. Neste protocolo foi observado um aumento de ANG II potente indutor de sede. (Lehr et al. 1967 ; Rettig et al. 1981).

2- Protocolo de estimulação β -adrenérgica Modificado: Este protocolo assim como o Furocap modificado é também uma combinação de um protocolo já descrito acima (Lehr et al. 1963) associado a um tratamento prévio com dieta pobre em sódio por uma 5 dias. (Mecawi et al, em preparação). O que notamos neste paradigma experimental é uma intensificação da resposta tendo em vista que a dieta pobre em sódio estimula o SRAA.

3.9-Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por intermédio da análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste de Bonferroni como teste *post hoc*. O teste “t” de Student não pareado foi utilizado quando pretendíamos analisar as diferenças entre as médias entre dois grupos

experimentais com uma única variável em avaliação. Em todos os casos as diferenças entre médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3.10- Grupos Experimentais

Os animais constituirão os seguintes grupos experimentais:

3.10.1-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT:

3.10.1.1- Grupos de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado)

Os animais em condição basais foram tratados com salina isotônica (grupo controle) ou 8-OH-DPAT, nas doses de 7,5 nmol/0,2µl/rato, intra-DRN. Após a administração do fármaco os animais receberam os bebedouros graduados contendo NaCl 1,8% e água para aferição da ingestão por um período de 300 minutos.

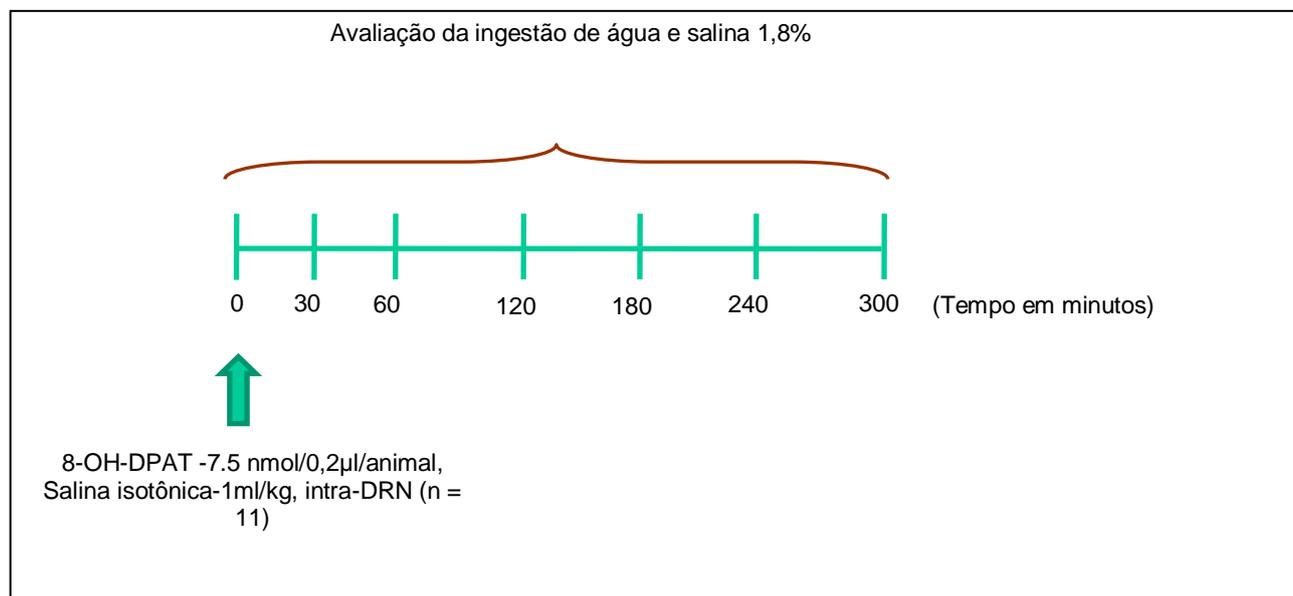


Figura 5: Escala Temporal do grupo de ratos repletos tratado agudamente com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.1.2-Grupos de ratos submetidos à estimulação β-adrenérgica pelo Protocolo ISOPROTERENOL.

Animais submetidos ao protocolo dipsogênico via administração de isoproterenol na dose de 100µg/kg. Após 30 minutos os ratos receberam administração intra-DRN de 8-OH-DPAT na concentração de 7,5 nmol/0,2µl/rato e grupo controle receberam 0.2 µl de salina isotônica. Imediatamente após os animais foram devolvidos as gaiolas metabólicas com bebedouros graduados para mensuração da ingestão de água e NaCl 1,8% até 300 minutos.

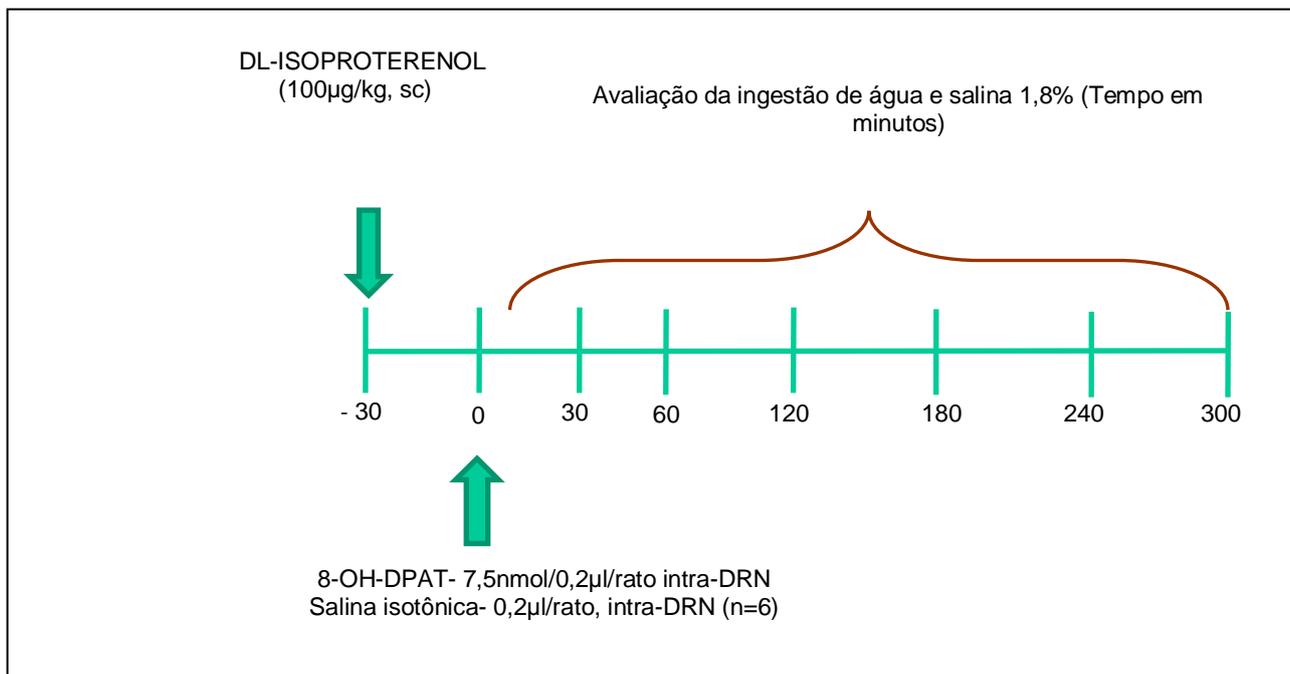


Figura 6: Escala Temporal do grupo de ratos submetidos estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL e tratado agudamente com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.2-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT

3.10.2.1- Grupos de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado)

Animais tratados por repetidas doses de 8-OH-DPAT (7,5 nmol/0,2µl/animal) e salina isotônica no grupo controle, microinjetado intra-DRN, durante um período de 6 dias, a administração era sempre realizada na mesma hora no período da manhã. No sétimo dia não realizamos a administração do agonista, e neste mesmo dia foi realizada a mensuração da ingestão de fluidos por um período de 300 minutos.

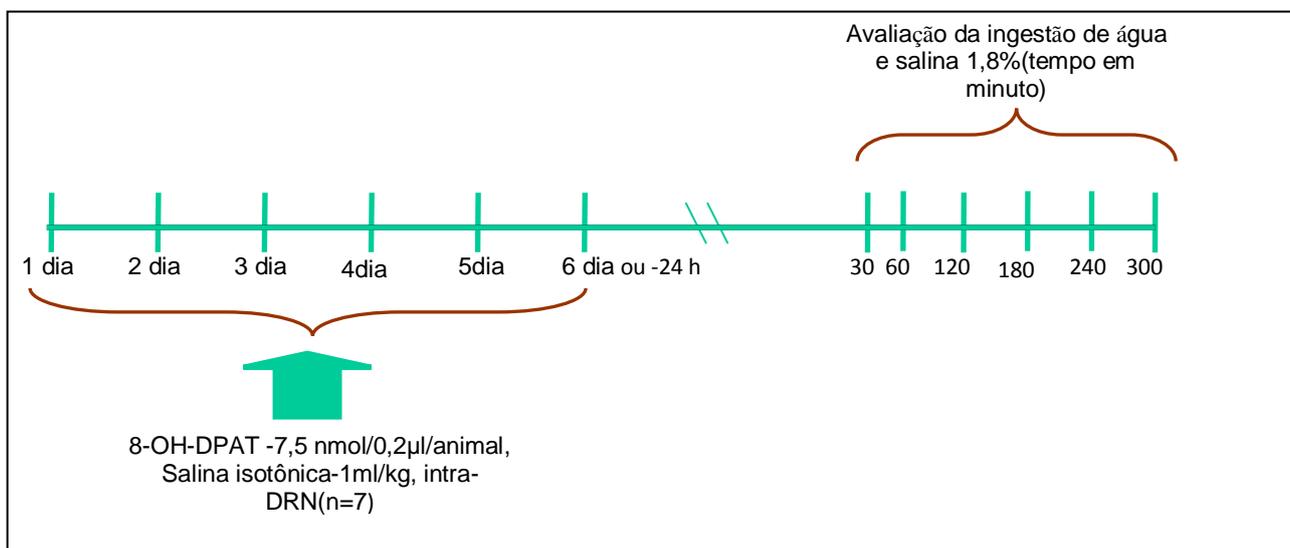


Figura 7: Escala Temporal do grupo de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado) tratado cronicamente durante 6 dias com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. O Experimento foi realizado 24 horas após o ultimo dia de administração. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.2.2-Grupos depletados de sódio pelo Protocolo de Furosemida.

Animais tratados por repetidas doses de 8-OH-DPAT (7.5 nmol/0.2µl/animal) e salina isotônica no grupo controle, (N=7 para cada grupo) microinjetado intra-DRN, durante um período de 6 dias. No sexto dia os animais foram submetidos á depleção de sódio pelo protocolo de furosemida e no sétimo dia foi realizada a mensuração da ingestão de fluidos por um período de 300 minutos.

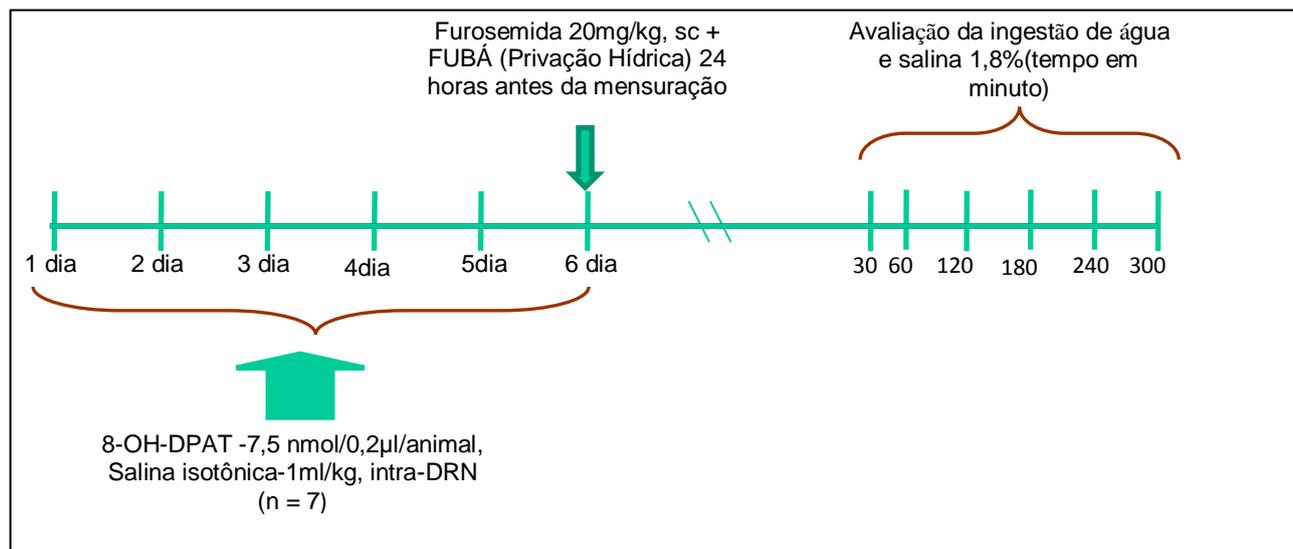


Figura 8: Escala Temporal do grupo de ratos submetidos ao Protocolo de Furosemida tratado cronicamente durante 6 dias com 8-OH-DPAT, intra-DRN, na dose de 7,5nmol/0,2µl/animal. O Experimento foi realizado 24 horas após o tratamento com furosemida. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.3-Efeito da administração sistêmica aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135:

Para a administração sistêmica os animais foram separados nos seguintes paradigmas experimentais:

3.9.3.1- Grupos de ratos depletados pelo Protocolo Furosemida com água *ad libitum*:

Os animais depletados de sódio pelo protocolo Furosemida foram deixados com bebedouros contendo água e no dia do experimento foram tratados agudamente com salina isotônica (1ml/kg) e WAY100135 na dose de 5mg/kg, ambos intraperitoneal. Imediatamente após a administração os animais foram devolvidos as gaiolas metabólicas e ofertou-se dois bebedouros volumétricos contendo água e NaCl 1,8%. A mensuração foi realizada até 330 minutos.

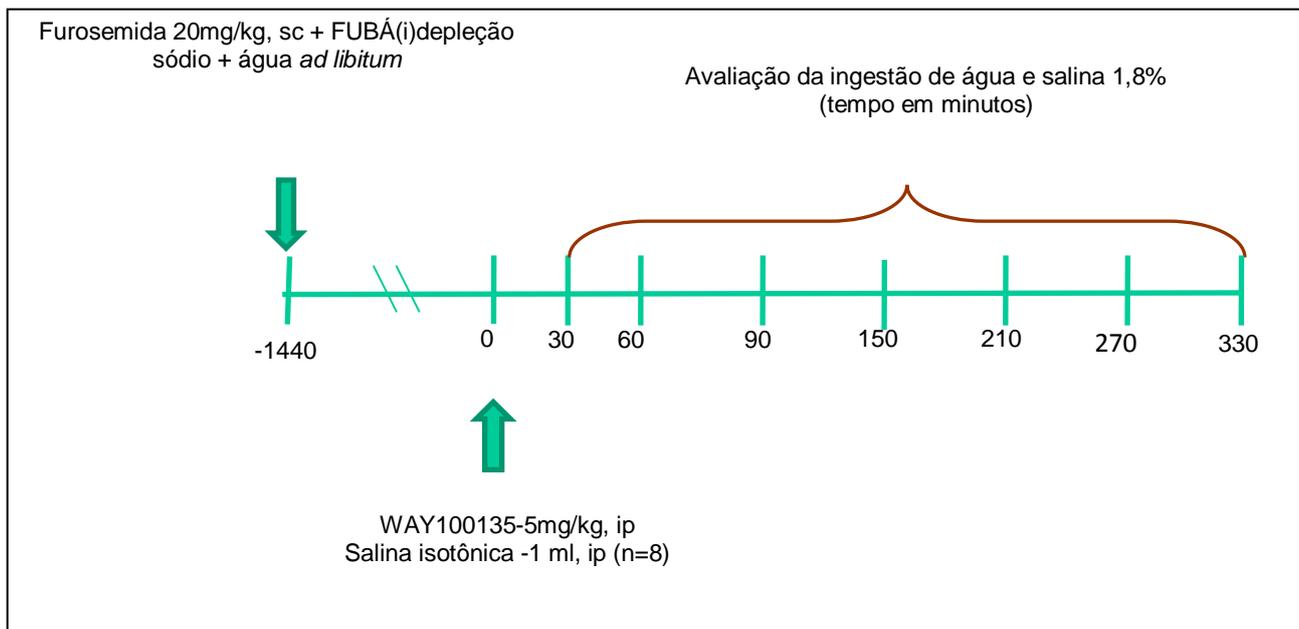


Figura 9: Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida) que receberam água *ad libitum* durante a depleção. Administração sistêmica de WAY100135 na dose de 5mg/kg intraperitoneal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.3.2-Grupos de ratos pelo Protocolo Furosemida sem acesso a água.

Neste grupo experimental os procedimentos foram basicamente os mesmos do anterior, exceto que após a administração de furosemida, os animais foram privados de água 24 horas antes do experimento. No dia do experimento os animais receberam tratamento com WAY100135 na dose de 5mg/kg e grupo controle recebeu salina isotônica por via intraperitoneal. Os animais foram colocados as gaiolas metabólicas e receberam bebedouros graduados contendo água e salina hipertônica 1,8% para mensuração da ingestão por um período de até 330 minutos.

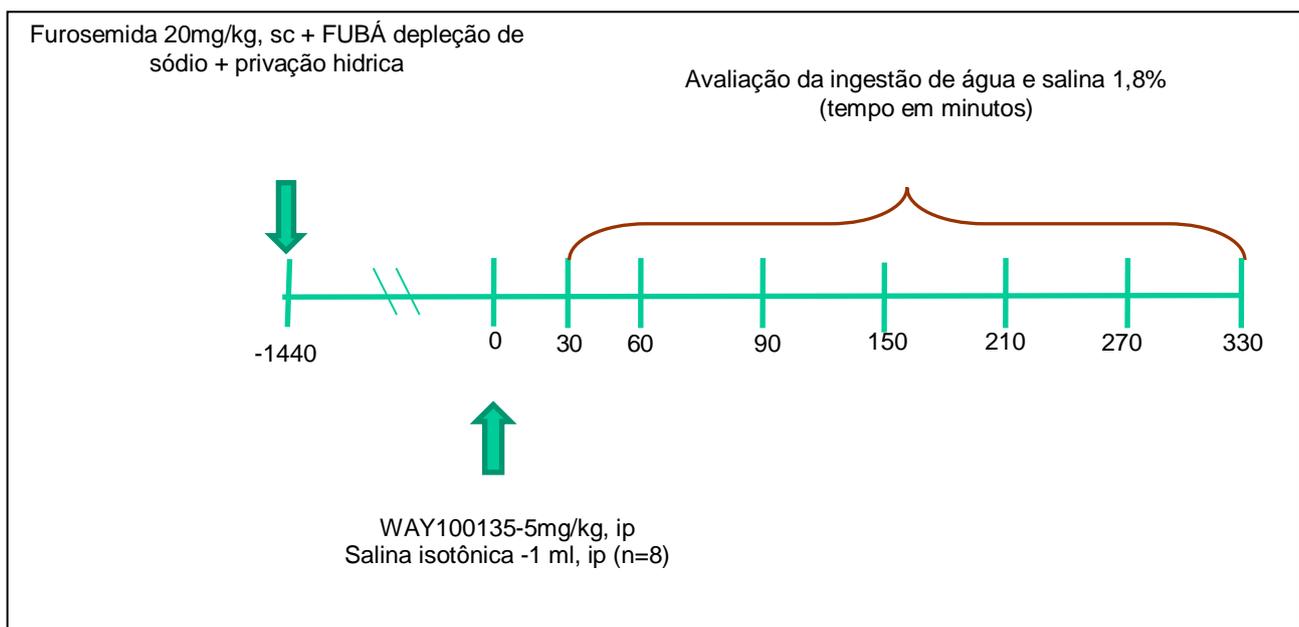


Figura 10: Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida), privação hídrica, administração de WAY100135 na dose de 5mg/kg intraperitoneal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.4-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135.

Para administração intra-DRN os animais foram separados nos seguintes paradigmas experimentais

3.10.4.1- Grupos de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado).

Animais em condições basais tratados agudamente e intra-DRN com salina isotônica (0,2 µl) no grupo controle e o WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. Após a administração os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas e foram colocados bebedouros graduados contendo água e NaCl 1,8% foram ofertados para mensuração dos fluidos até 240 minutos.

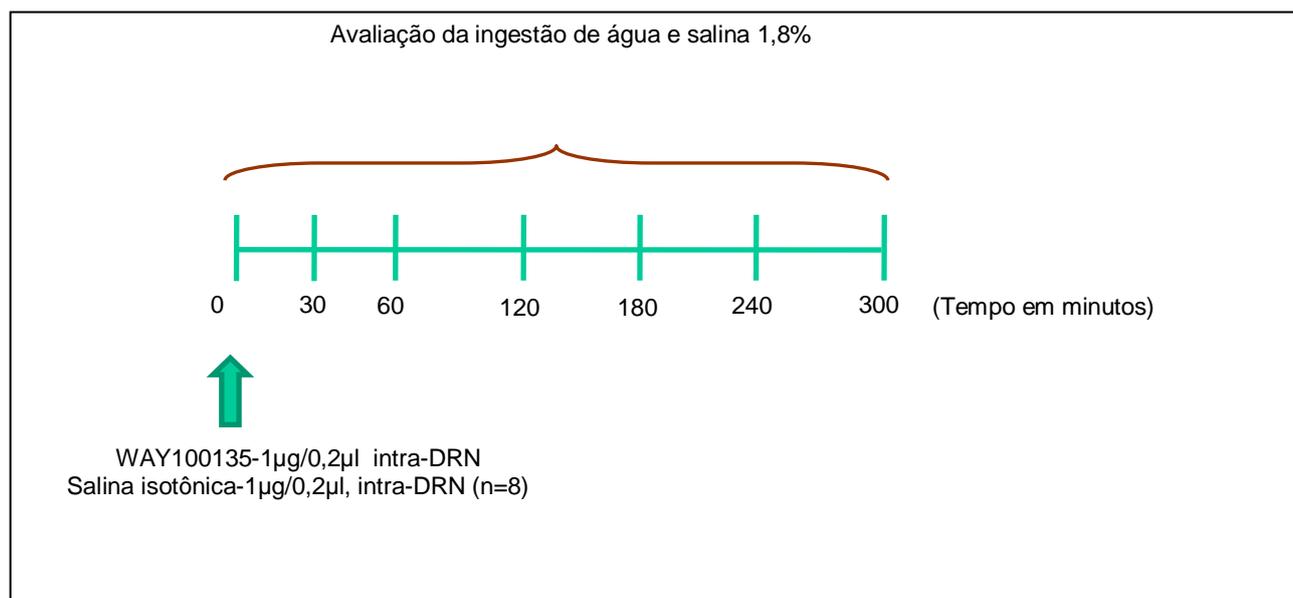


Figura 11: Linha Temporal do grupo de ratos em condição basal, microinjetado intra-DRN, na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.4.2- Grupos de ratos depletados de sódio pelo Protocolo Furosemida com acesso a água ad libitum

Animais submetidos à depleção pelo protocolo de Furosemida e com acesso a água. Ao final de 24h um dos grupos recebeu administração intra-DRN de salina isotônica (0,2 µl) e o WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato e foram devolvidas as gaiolas metabólicas e somente após 30 minutos da administração que foi realizada a mensuração da ingestão de fluidos.

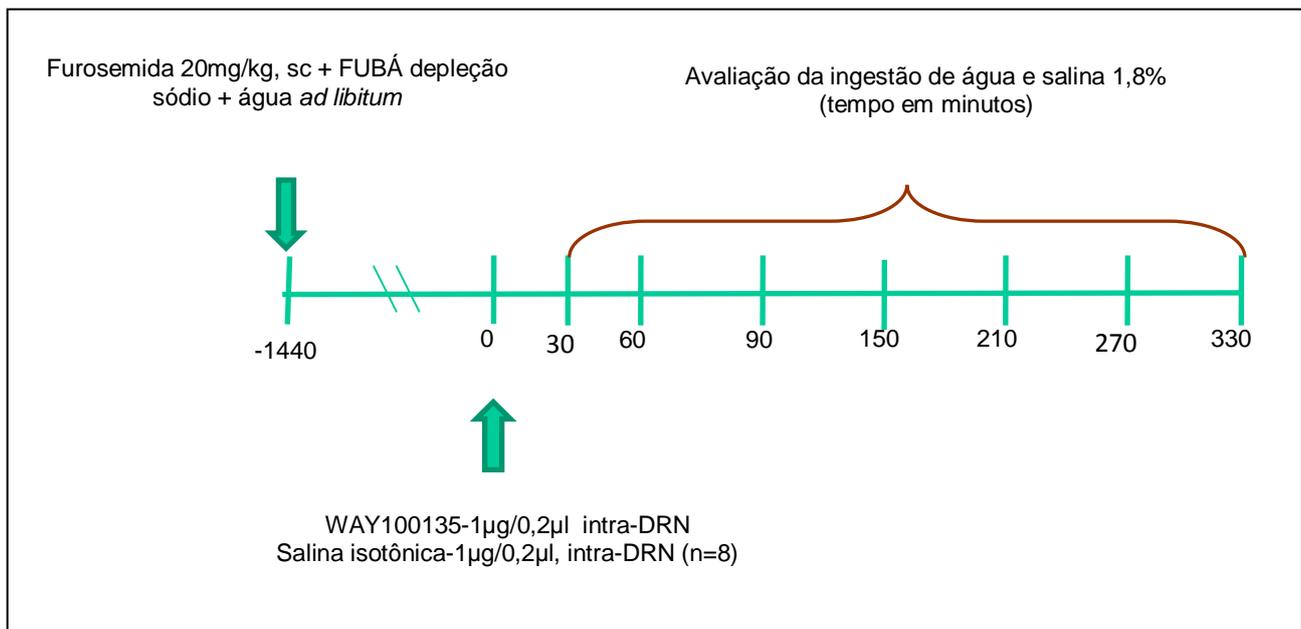


Figura 12: Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida), com água *ad libitum*, microinjeção aguda intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.4.3- Grupos de ratos depletados de sódio pelo Protocolo Furosemida sem acesso a água.

Animais que foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém que após a administração de furosemida 24 horas antes do experimento os ratos foram privados de água. Após a administração intra-DRN de WAY100135 30 minutos após ofertou-se os fluidos para mensuração até 330 minutos.

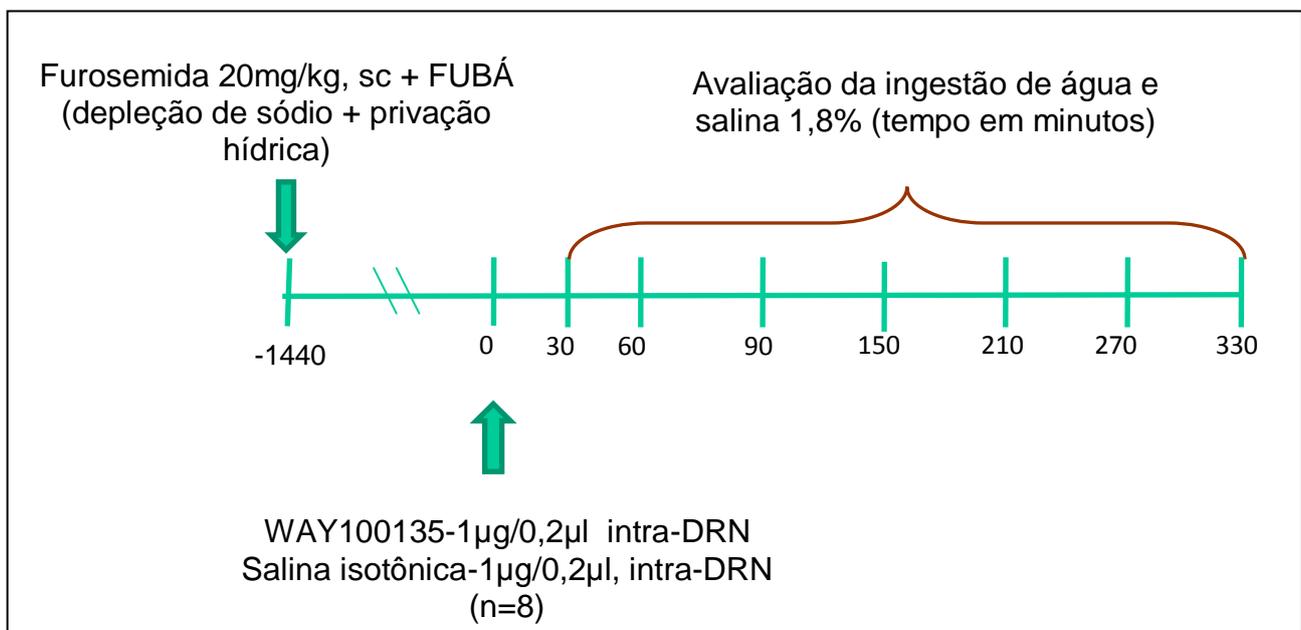


Figura 13: Linha Temporal do grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio (Furosemida), privação hídrica, microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

2.10.4.4-Grupos de ratos submetidos à depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP.

Animais submetidos ao protocolo FUROCAP 60 minutos antes da administração intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato e grupo controle receberam 0.2 µl de salina isotônica. Após a administração intra-DRN os animais foram colocados a gaiolas metabólicas e em seguida ofertaram-se bebedouros graduados com água e salina 1,8% para mensuração dos fluidos.

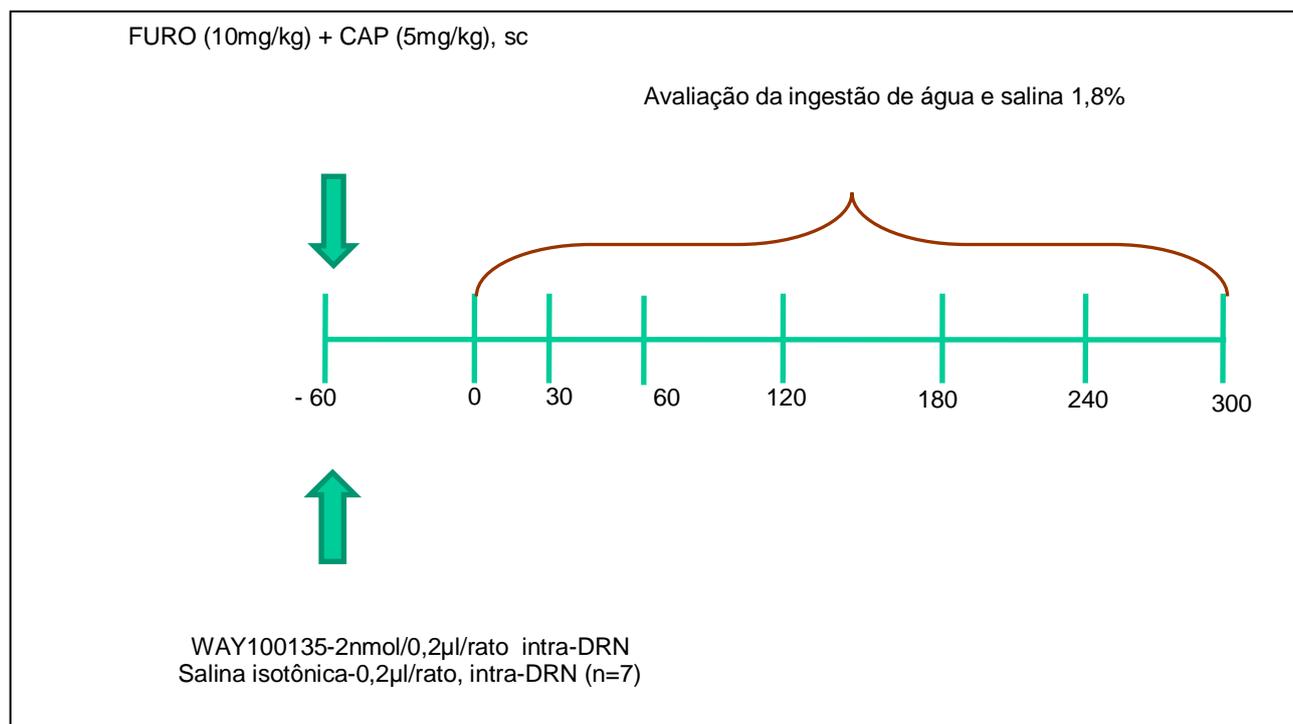


Figura 14: Linha Temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção aguda de sódio (FUROCAP), microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.4.5-Grupos de ratos submetidos à depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP MODIFICADO.

Animais submetidos ao protocolo de FUROCAP MODIFICADO onde os animais receberam dieta pobre em sódio 4 dias anterior ao experimento. No dia do experimento os ratos submetidos ao protocolo de FUROCAP e após 60 minutos foi administrado via intra-DRN o antagonista WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato e grupo controle receberam 0.2 µl de salina isotônica. Imediatamente após a administração intra-DRN os animais foram devolvidos as gaiolas metabólicas e colocados os bebedouros graduados para avaliação da ingestão de água e salina hipertônica 1,8% por até 300 minutos.

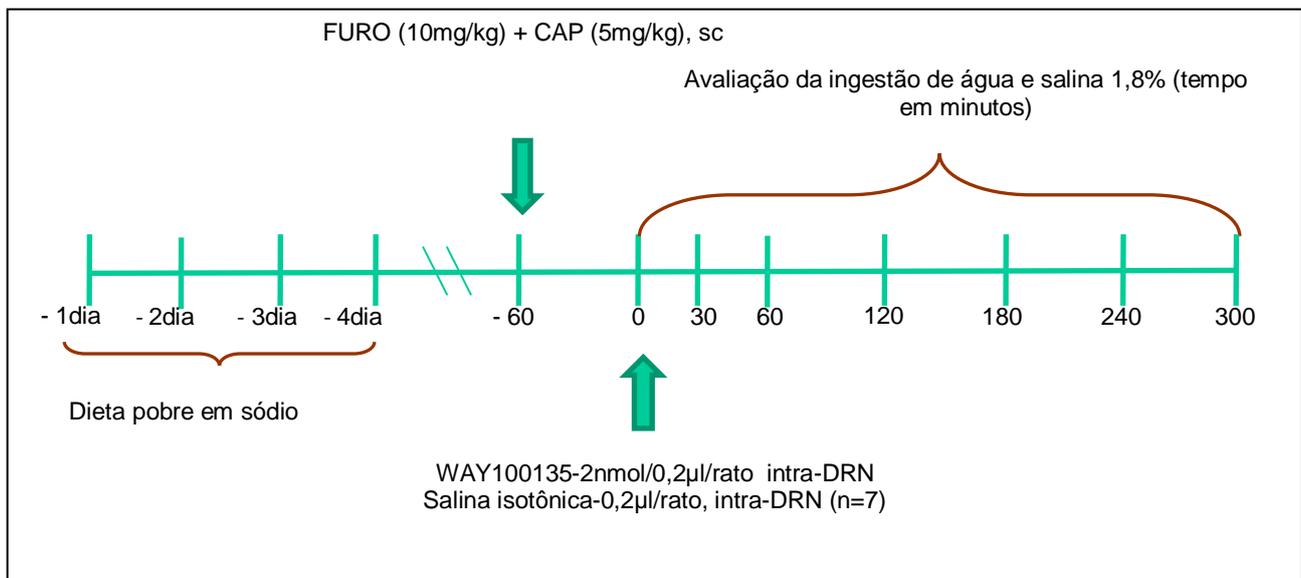


Figura 15: Linha temporal de grupo de ratos submetidos ao protocolo de depleção aguda de sódio (FUROCAP MODIFICADO), microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e NaCl 1,8%.

3.10.4.6-Grupos de ratos submetidos à estimulação β-adrenérgica pelo Protocolo ISOPROTERENOL.

Animais submetidos ao protocolo dipsogênico via administração de isoproterenol na dose de 100µl/kg. Após 30 minutos os ratos receberam administração intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato e grupo controle receberam 0.2 µl de salina isotônica. Imediatamente após os animais foram devolvidos as gaiolas metabólicas com bebedouros graduados para mensuração da ingestão de água e NaCl 1,8%.por até 300 minutos

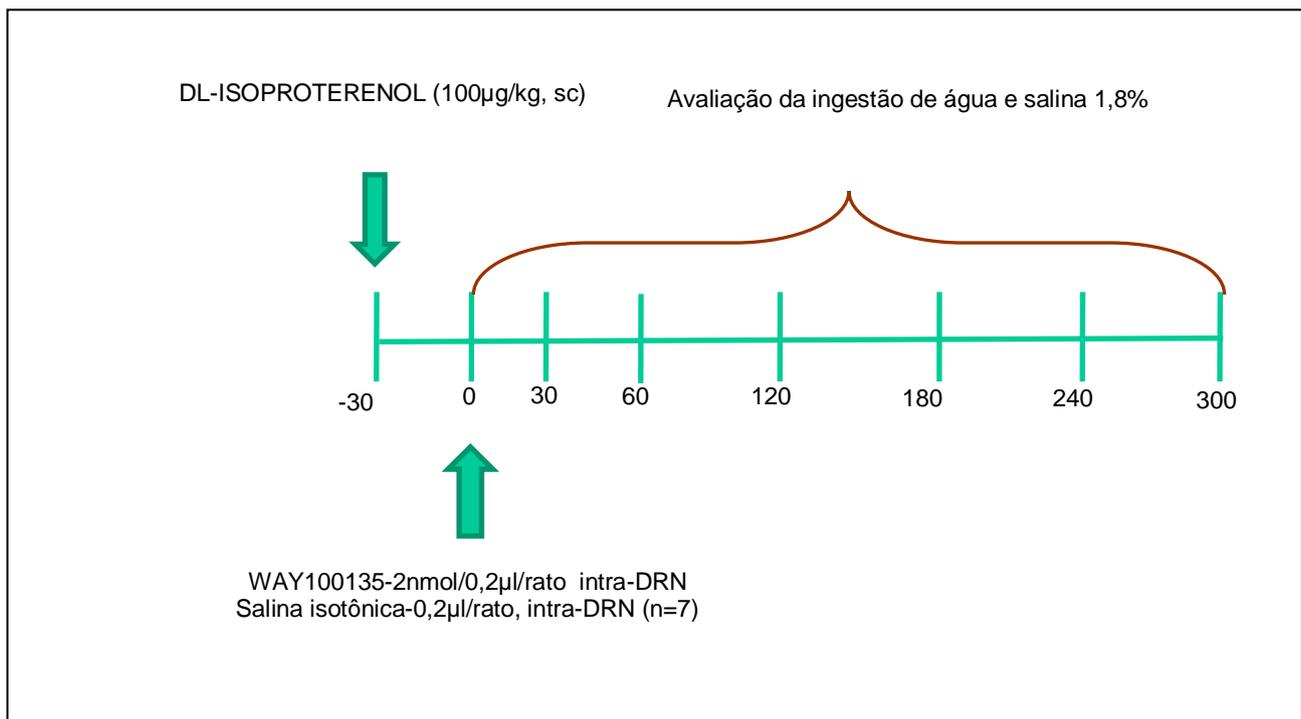


Figura 16: Linha temporal de grupo de ratos, estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo (ISOPROTERENOL). Microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2 μ l/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.

3.10.4.7-Grupos de ratos submetidos à estimulação β -adrenérgica pelo Protocolo ISOPROTERENOL MODIFICADO.

Animais submetidos á estimulação dipsogênica pelo protocolo isoproterenol modificado. Neste paradigma experimental os ratos receberam os mesmos procedimentos do grupo anterior, porém 4 dias antes do experimento os animais foram colocados com ração pobre em sódio. Dessa forma, os animais também receberam administração intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2 μ l/rato e grupo controle receberam 0.2 μ l de salina isotônica. Em seguida os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais e bebedouros volumétricos contendo água e NaCl 1,8%. A avaliação da ingestão ocorreu até 300 minutos.

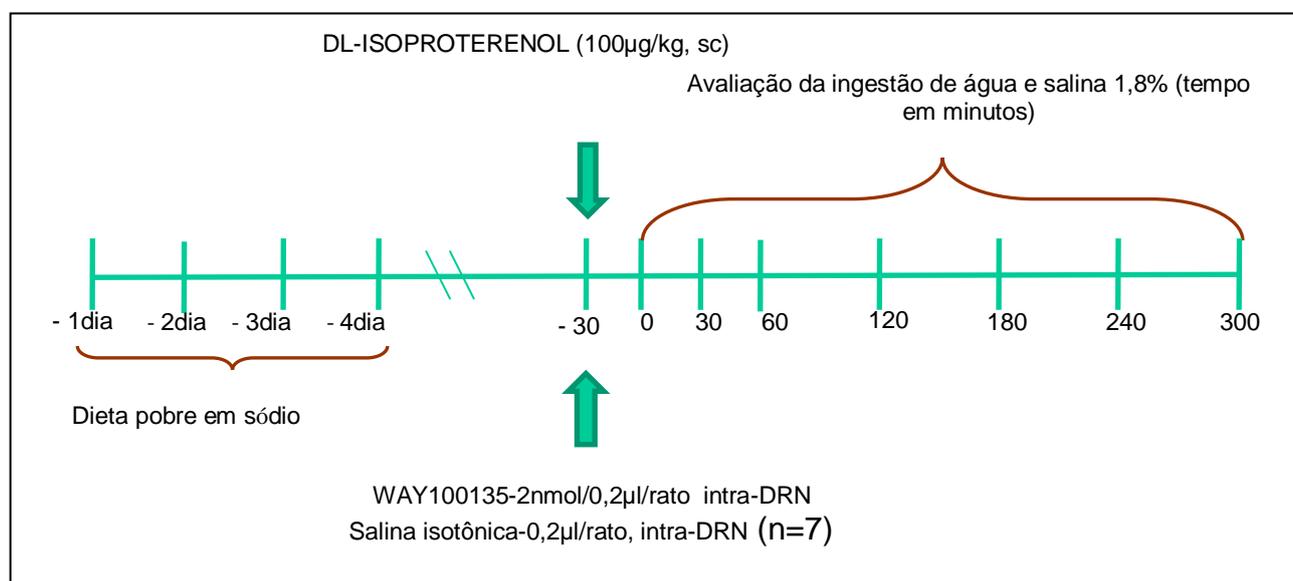
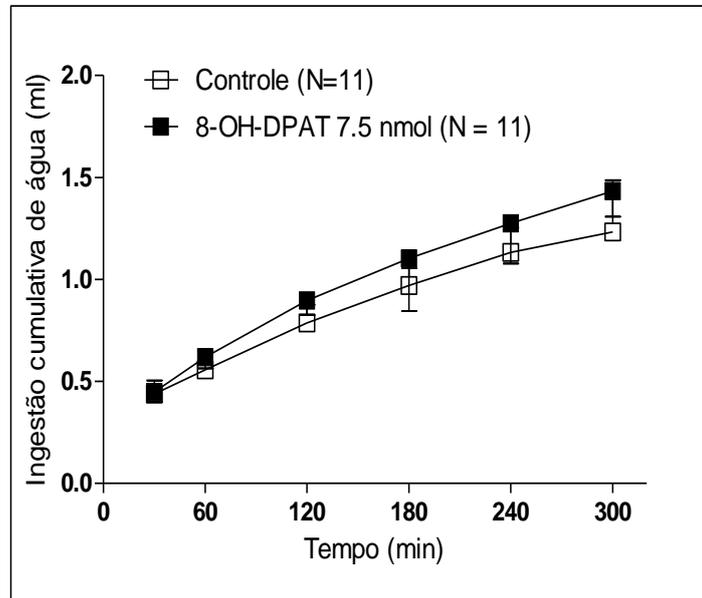


Figura 17: Linha temporal de grupo de ratos, estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo (ISOPROTERENOL MODIFICADO). Microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2 μ l/animal. Tempo em minutos corresponde ao período de avaliação da ingestão de água e Nacl 1,8%.

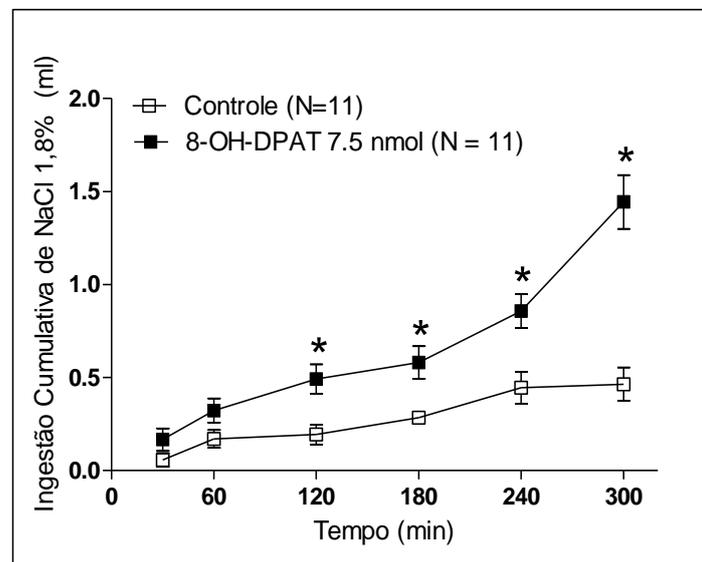
4. RESULTADOS

4.1-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT em grupos de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado)

A



B



C

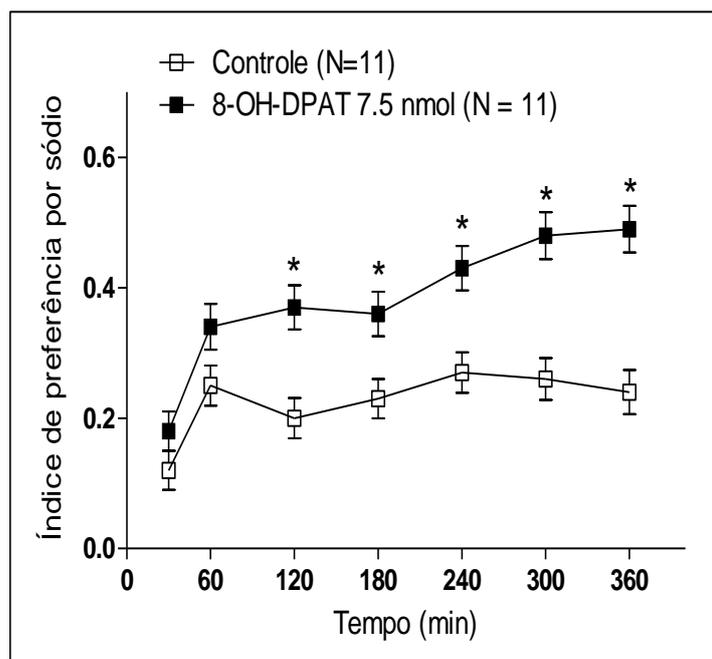
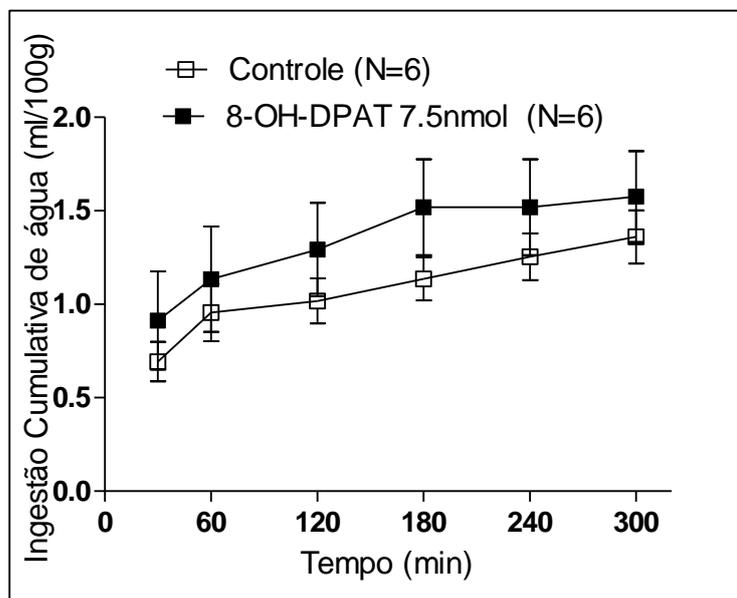


Figura 18- Ingestão cumulativa de água (gráfica A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) animais em condições basais, tratados agudamente por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato . *P<0,05 quando comparado ao controle

De acordo com os gráficos apresentados acima podemos observar que o tratamento com 8-OH-DPAT na concentração de 7,5 nmol/rato, intra-DRN em ratos em condições basais, numa única administração não alterou a resposta de ingestão de água nos intervalos estudados (Figura 18 A). Em contrapartida ao observarmos a figura 18 B que representação o gráfico de avaliação da ingestão de salina hipertônica nota-se que ocorreu um aumento significativo da ingestão de NaCl 1,8% nos ratos tratados com 8-OH-DPAT em relação ao seu respectivo grupo controle. Esse aumento foi observado na avaliação decorrente do intervalo de 120 minutos ($0,59 \pm 0,16$ vs $1,5 \pm 0,24$, $P < 0,05$) estendendo até o intervalo de 360 minutos ($1,45 \pm 0,30$ vs $4,30 \pm 0,48$, $P < 0,05$). Concomitantemente em relação ao índice de preferência por sódio (Figura 18 C) também foi observado um aumento significativo do índice nos animais tratados com 8-OH-DPAT em relação ao respectivo grupo controle. Comparativamente ao gráfico da ingestão de salina hipertônica os intervalos de tempos onde foi observada diferença significativa, foram os mesmos sendo o intervalo de 120 minutos ($0,20 \pm 0,031$ vs $0,37 \pm 0,034$, $P < 0,05$) estendendo até o intervalo de 360 minutos ($0,24 \pm 0,034$ vs $0,49 \pm 0,036$, $P < 0,05$).

4.2-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT em grupos de ratos submetidos ao Protocolo Isoproterenol.

A



B

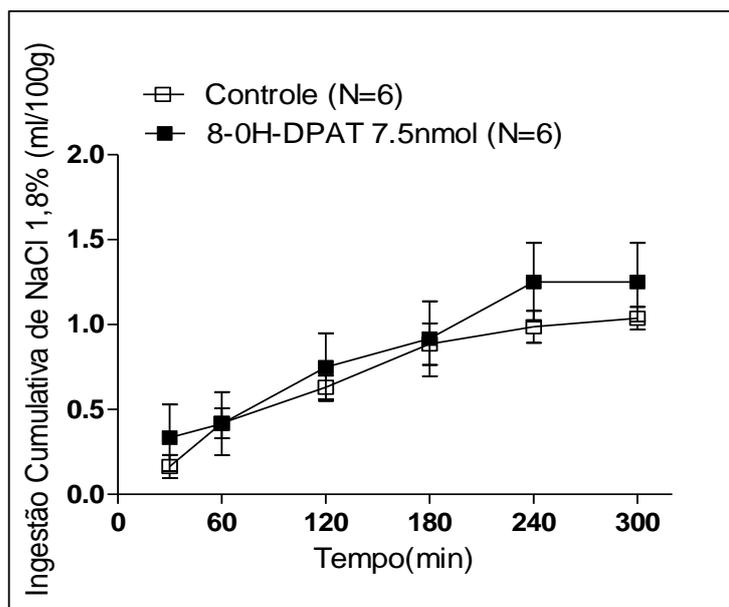
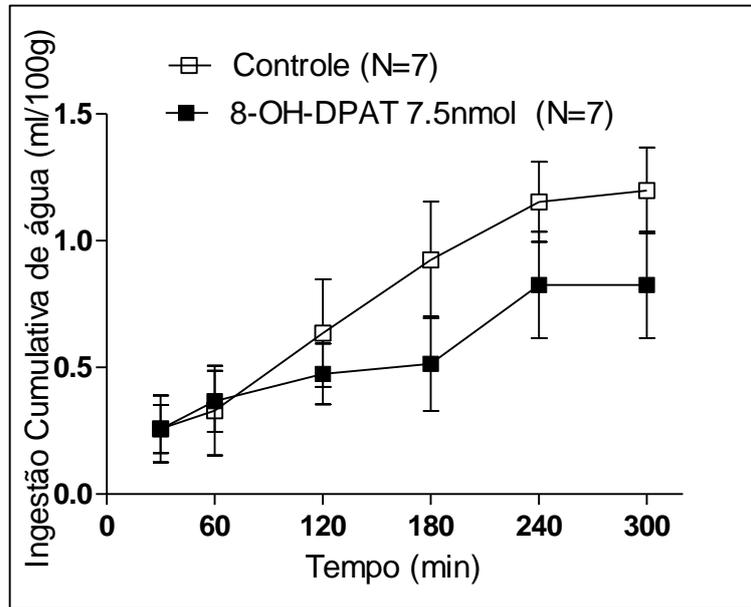


Figura 19- Ingestão cumulativa de água (gráfica A) e NaCl 1,8% (gráfica B) animais submetidos à estimulação estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL, tratados agudamente por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2 μ l/rato

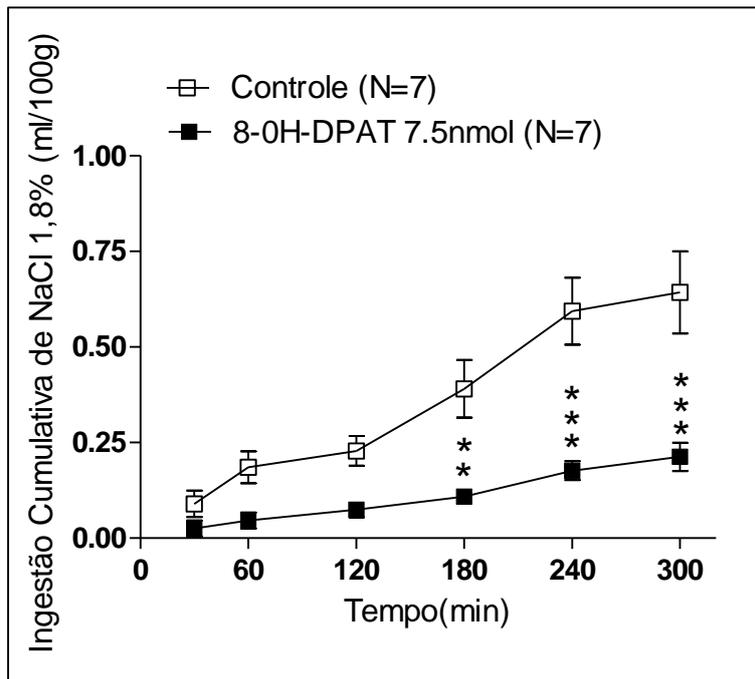
Neste paradigma experimental não identificamos nenhuma alteração estatística nos comportamentos estudados. Nota-se na figura 19 A que a avaliação de ingestão de água em nenhum tempo avaliado obteve alterações significativas. Isso também ocorreu na mensuração do apetite por sal pela avaliação de ingestão de salina hipertônica. (Figura 19 B)

4.3-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos em condição basal (normovolêmicos e normohidratado).

A



B



C

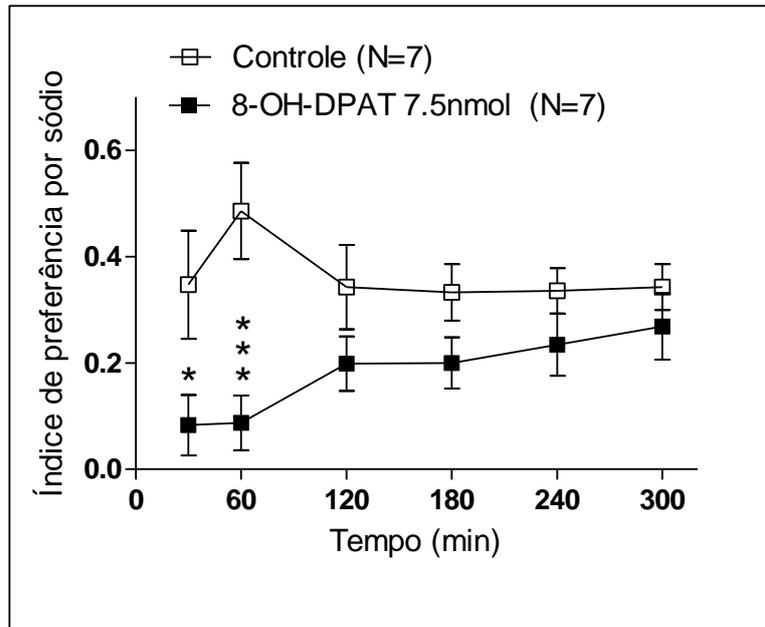
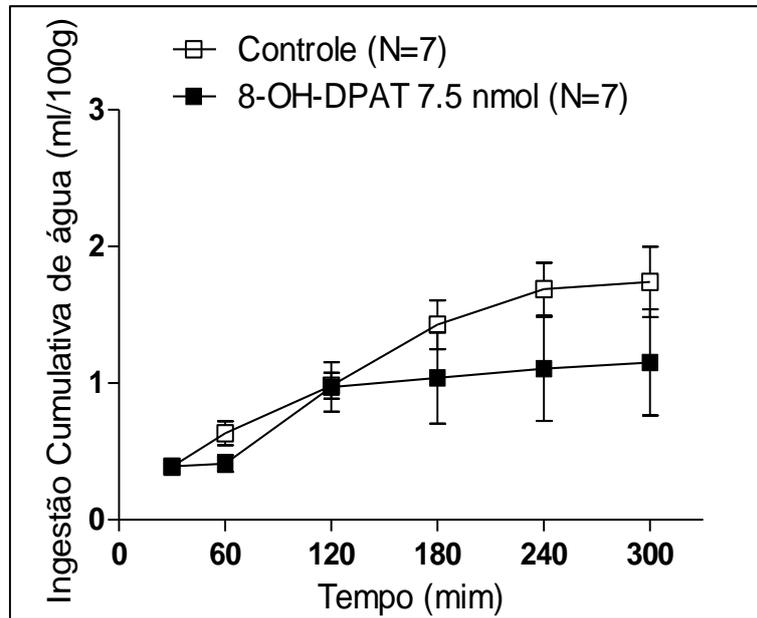


Figura 20- Ingestão cumulativa de água (gráfica A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) em animais em condições basais, tratados cronicamente por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao controle

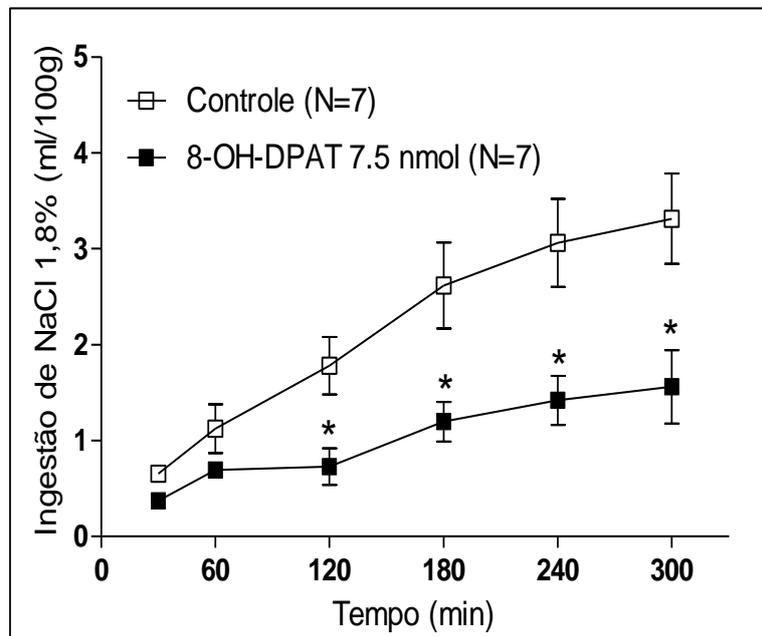
Na análise da figura podemos observar que mais uma vez nenhuma alteração relacionada á ingestão de água (Figura 20A). Mas em relação à ingestão de salina hipertônica podemos observar na figura 20B que a administração crônica de 8-OH-DPAT no DRN evocou uma redução significativa da ingestão, porém mais tardia nos intervalos de tempo correspondente a 180 minutos ($0,39 \pm 0,075$ vs $0,10 \pm 0,01$ ml/100g, $P < 0,01$), 240 minutos ($0,59 \pm 0,89$ vs $0,17 \pm 0,024$ ml/100g, $P < 0,001$) e até 300 minutos ($0,64 \pm 0,10$ vs $0,21 \pm 0,034$ ml/100g, $P < 0,001$). Ainda neste mesmo experimentos, a figura 20C avaliou o índice de preferência ao sódio e com isso, podemos notar que o efeito desse tratamento nesse índice teve resultados estatísticos logo nos primeiros minutos avaliados, diferentemente da ingestão de NaCl que foi mais tardia. Em relação a preferência por sódio esse tratamento induziu uma diminuição significativa no intervalo de tempo de 30 minutos ($0,34 \pm 0,10$ vs $0,082 \pm 0,05$, $P < 0,05$) e 60 minutos ($0,48 \pm 0,09$ vs $0,087 \pm 0,051$, $P < 0,001$).

4.4-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT em grupos de ratos depletados de sódio pelo Protocolo de Furosemida.

A



B



C

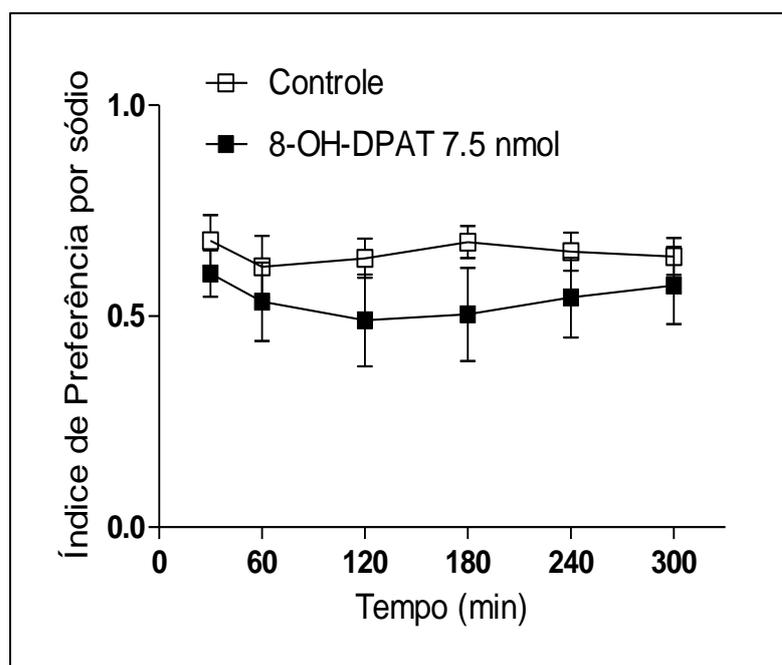


Figura 21- Ingestão cumulativa de água (gráfica A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) em animais submetidos a depleção de volume, tratados cronicamente (6 dias) por via intra-DRN com 8-OH-DPAT 7,5nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 quando comparado ao controle

Ao submetermos os animais ao tratamento crônico com 8-OH-DPAT na concentração de 7,5nmol, intra-DRN em ratos depletados de volume pelo protocolo furosemida observamos novamente que em relação à ingestão de água não obtivemos nenhuma diferença significativa (Figura 21 A). Já na avaliação da ingestão de salina hipertônica representado pela figura 21 B ocorreu uma redução da ingestão de NaCl no grupo tratado cronicamente com 8-OH-DPAT 7,5nmol, intra-DRN em relação ao grupo controle. Essa redução foi observada no intervalo de tempo de 120 minutos, ($1,78 \pm 0,3$ vs $0,729 \pm 0,19$ ml/100g, $P<0,05$) 180 minutos, ($2,61 \pm 0,44$ vs $1,19 \pm 0,20$ ml/100g, $P<0,05$) 240 minutos ($3,06 \pm 0,45$ vs $1,41 \pm 0,25$ ml/100 g, $P<0,05$) e por ultimo 300 minutos ($3,3125 \pm 0,471250$ vs $1,56 \pm 0,38$ ml/100g, $P<0,05$). Na figura 21 C nota-se que esse tratamento crônico não alterou o índice de preferência por sódio em nenhum intervalo de tempo, diferentemente do observado no tratamento agudo (Figura 18C).

4.5-Efeito da administração sistêmica aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos depletados pelo Protocolo Furosemida com água ad libitum.

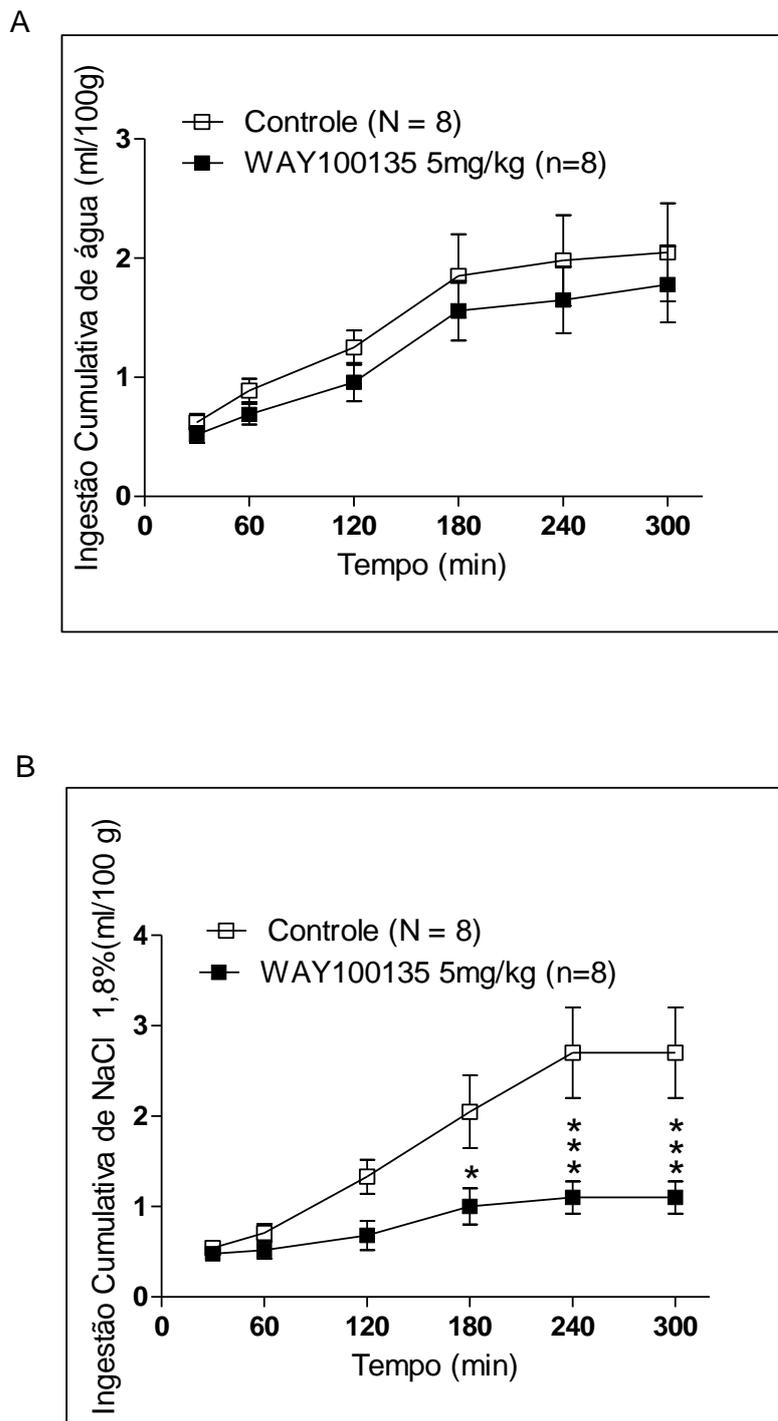


Figura 22- Ingestão cumulativa de água (gráfico A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) em animais submetidos a depleção de volume pelo protocolo furosemida tratado sistemicamente com WAY100135 na dose de 5mg/kg, numa única administração, via intraperitoneal. **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle

A figura 22 A representa ingestão cumulativa de água dos animais submetidos á depleção de volume pelo protocolo de furosemida com acesso a água ad libitum e injetado por via intraperitoneal o antagonista de receptor 5-HT1A, nota-se nesse gráfico que esse paradigma experimental não alterou essa resposta de forma significativa. Por outro lado, a figura 22 B que representa a resposta natriorexigênica evidenciamos uma redução significativa nos tempos de 60 minutos, ($1,33 \pm 0,19$ vs $0,68 \pm 0,16$ ml/100g, $P<0,05$) 120 minutos ($2,05 \pm 0,40$ vs $1,00 \pm 0,20$ ml/100g, $P<0,05$) e 180 minutos ($2,70 \pm 0,50$ vs $1,10 \pm 0,18$ ml/100g, $P<0,001$).

4.6-Efeito da administração sistêmica aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos depletados pelo Protocolo Furosemida sem acesso a água.

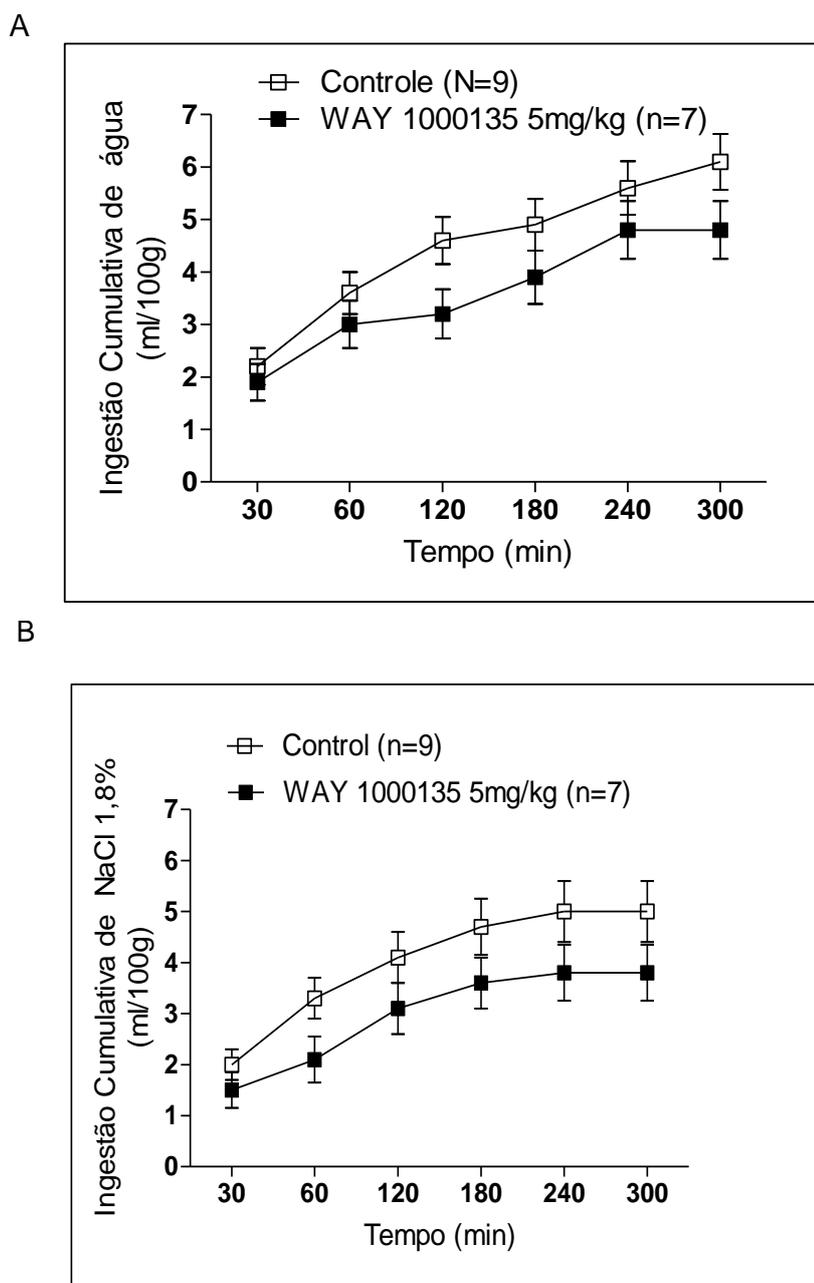
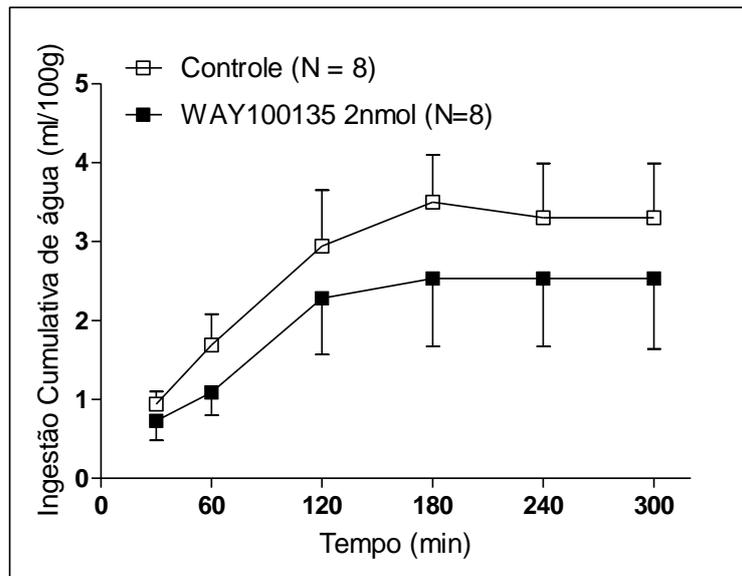


Figura 23- Ingestão cumulativa de água (gráfico A), NaCl 1,8% (gráfico B) em animais submetidos a depleção de volume pelo protocolo furosemida com privação hídrica tratado sistemicamente com WAY100135 na dose de 5mg/kg, numa única administração, via intraperitoneal.

A administração sistêmica de WAY100135 na dose de 5mg/kg via intraperitoneal, neste desafio experimental onde os animais foram submetidos ao protocolo de depleção por 24 horas (furosemda) mais privados de água por esse mesmo período, não alterou de forma significativa às respostas de ingestão de água (Figura 23 A) bem como o comportamento de ingestão de salina hipertônica (Figura 23 B).

4.7-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado).

A



B

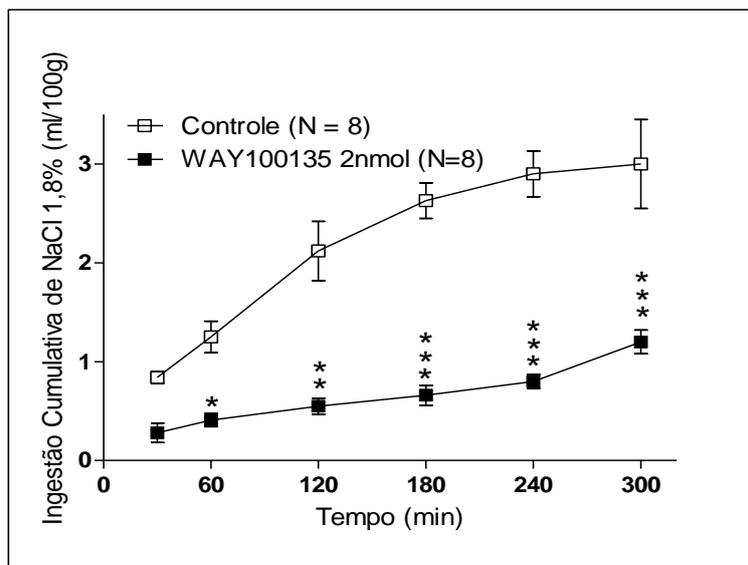


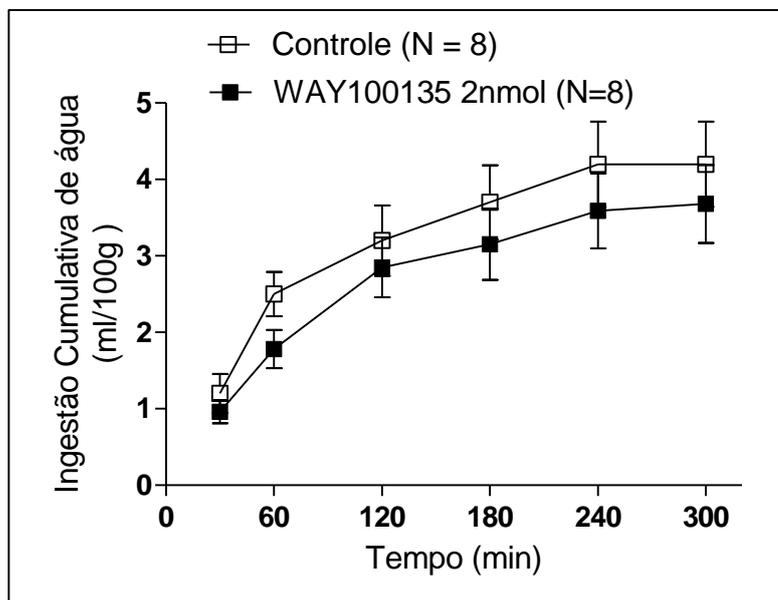
Figura 24- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais em condição basal tratado intra-DRN com uma única administração de WAY100135 na concentração

*de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle*

A resposta ingestiva da administração intra-DRN de WAY100135 em ratos sob condição basal está representada na figura 24. Como podemos observar, novamente em relação à avaliação do comportamento de ingestão de água não obtivemos nenhuma alteração significativa entre os grupos tratados e controle (Figura 24 A). Por sua vez, na mensuração da ingestão de NaCl 1,8%, (Figura 24 B) esse paradigma experimental induziu uma diminuição significativa da ingestão de salina hipertônica imediatamente nos primeiros intervalos de tempo, prolongando-se e intensificando a redução da resposta até o último intervalo avaliado. (Nota-se redução no intervalo de 30 minutos ($0,84 \pm 0,06$ vs $0,28 \pm 0,09$ ml, $P<0,05$) posteriormente no intervalo de 60 minutos ($1,25 \pm 0,16$ vs $0,41 \pm 0,06$ ml/100g, $P<0,05$) estendendo até 120 minutos, ($2,12 \pm 0,3$ vs $0,55 \pm 0,08$ ml/100g $P<0,02$) 180 minutos $2,630 \pm 0,18$ vs $0,66 \pm 0,10$ ml/100g, $P<0,01$) e 240 minutos ($2,9 \pm 0,23$ vs $0,80 \pm 0,07$ ml/100g, $P<0,01$). O índice de preferência ao sódio por outro lado não obtivemos nenhuma diferença significativa.

4.8-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos depletados de sódio pelo Protocolo Furosemida com acesso a água ad libitum.

A



B

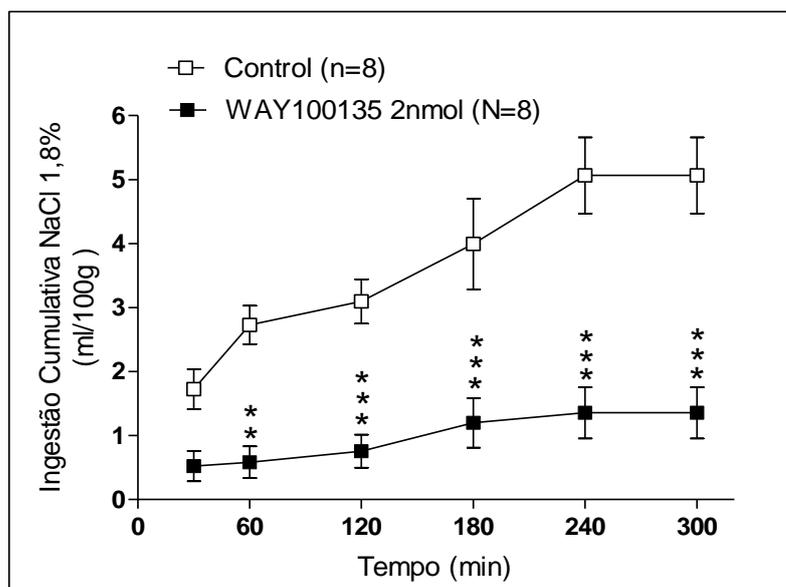


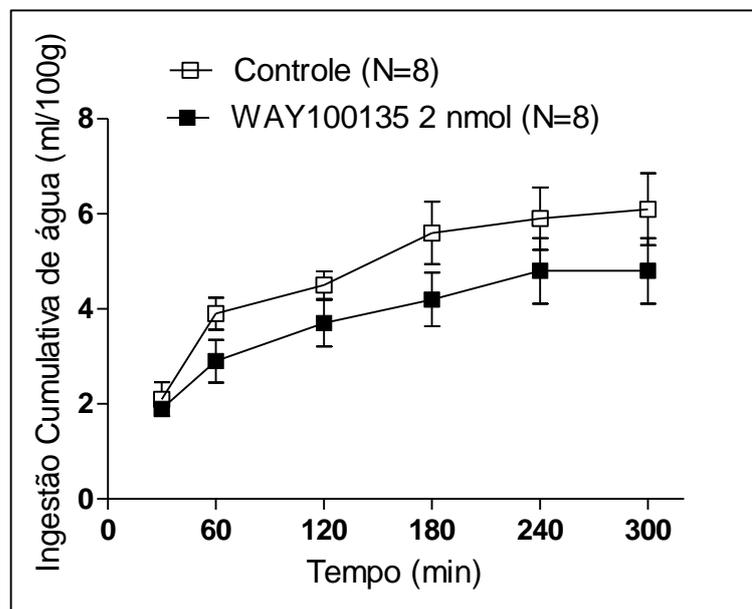
Figura 25- Ingestão cumulativa de água (gráfico A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) em animais submetidos a depleção de volume pelo protocolo furosemida tratado agudamente com microinjeção intra-DRN de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. **P<0,02 e ***P<0,01 quando comparado ao controle

A figura 25 A demonstra que o tratamento agudo e intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato não alterou a ingestão de água nos intervalos de tempo avaliados. Por outro lado, o tratamento induziu uma diminuição significativa na ingestão de salina hipertônica no grupo tratado

em relação ao grupo controle (figura 24 B). Neste tratamento a redução da ingestão foi observada mais precocemente no intervalo de tempo de 60 minutos, ($2,7 \pm 0,3$ vs $0,5838 \pm 0,2482$ ml/100g, $P < 0,02$) 120 minutos, ($3,0 \pm 0,34$ vs $0,75 \pm 0,25$ ml/100g, $P < 0,01$) 180 minutos ($3,9 \pm 0,7$ vs $1,19 \pm 0,38$ ml/100g, $P < 0,01$) e 240 minutos ($5,0 \pm 0,59$ vs $1,3 \pm 0,39$ ml/100g, $P < 0,01$).

4.9-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos depletados de sódio pelo Protocolo Furosemida com privação hídrica.

A



B

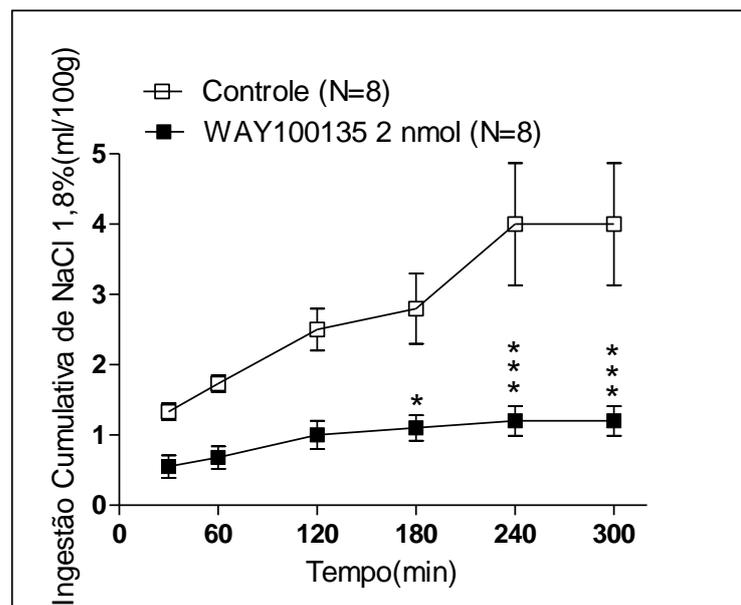
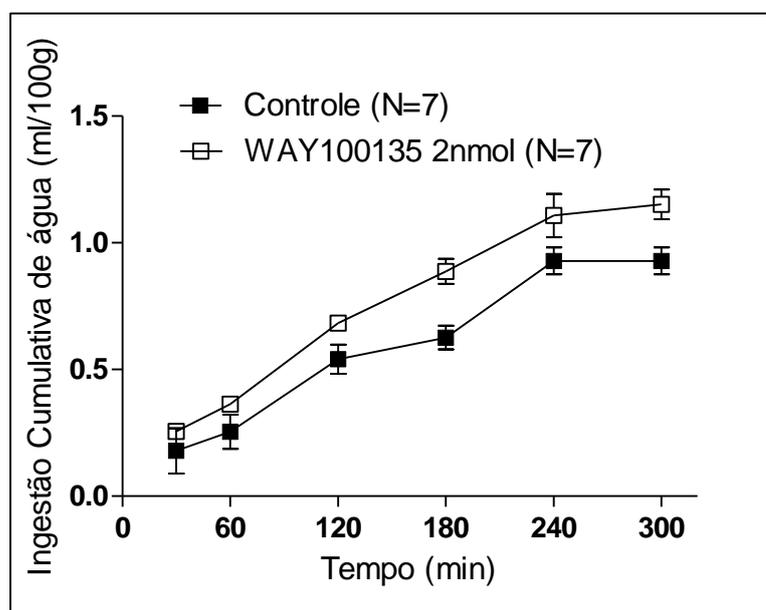


Figura 26- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos ao protocolo de furosemida com privação hídrica e microinjeção aguda intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.

Como podemos observar na figura 26 A, que mais uma vez o tratamento agudo com WAY100135 intra-DRN em ratos submetidos ao protocolo de furosemida e privação hídrica não causou diferenças significativas na ingestão de água. Agora em relação à ingestão salina hipertônica (Figura 26 B) esse experimento induziu uma intensa e mantida diminuição a partir do intervalo de tempo correspondente a 120 minutos ($2,50 \pm 0,3$ vs $1,0 \pm 0,20$ ml/100g, $P < 0,05$) e essa redução mantém-se até 180 minutos ($2,8 \pm 0,5$ vs $1,1 \pm 0,18$ ml/100g, $P < 0,01$) e 240 minutos ($4,00 \pm 0,87$ vs $1,20 \pm 0,21$ ml/100g).

4.10-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos á depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP.

A



B

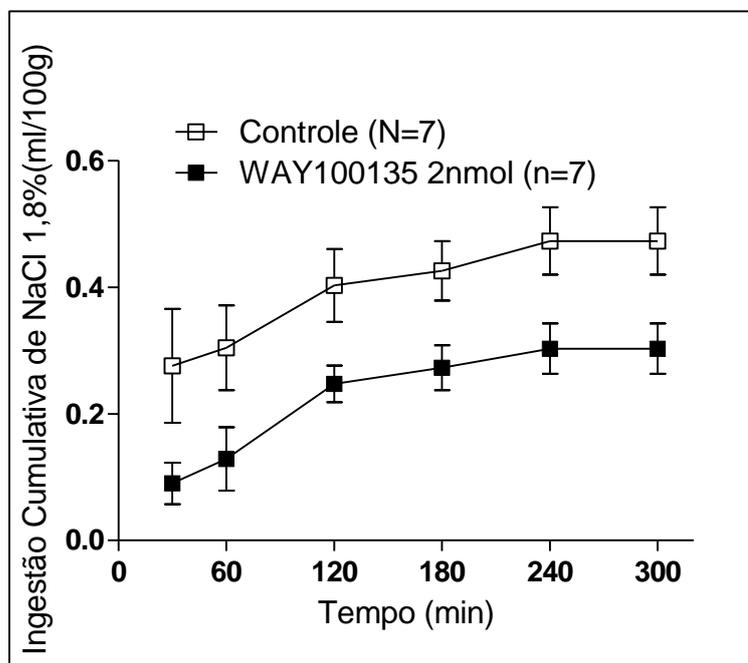
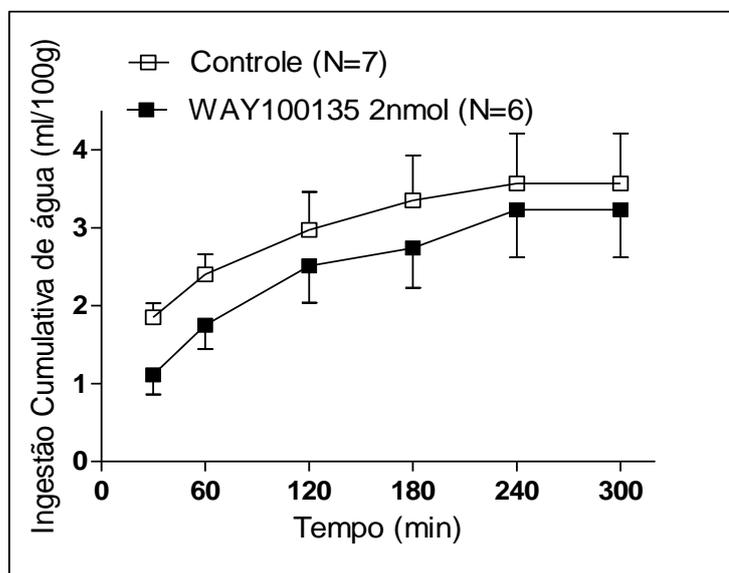


Figura 27- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos ao protocolo FUROCAP e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato.

A microinjeção aguda de WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato no DRN nos animais submetidos ao protocolo de depleção aguda (FUROCAP) não modificaram a ingestão de água (Figura 27 A). Em contrapartida em relação à ingestão de NaCl 1,8% apesar de uma tendência a diminuição da ingestão não foram verificados diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 27B). Um dado curioso nesse experimento foi os baixos valores de ingestão de salina hipertônica nos ratos submetidos ao protocolo de FUROCAP que recebeu microinjeção intra-DRN de salina isotônica (Figura 22 B)

4.11-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos submetidos á depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP modificado.

A



B

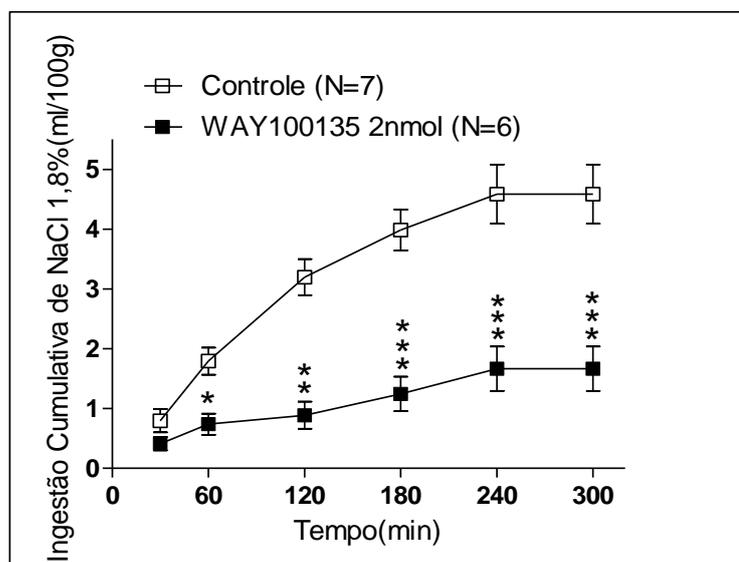
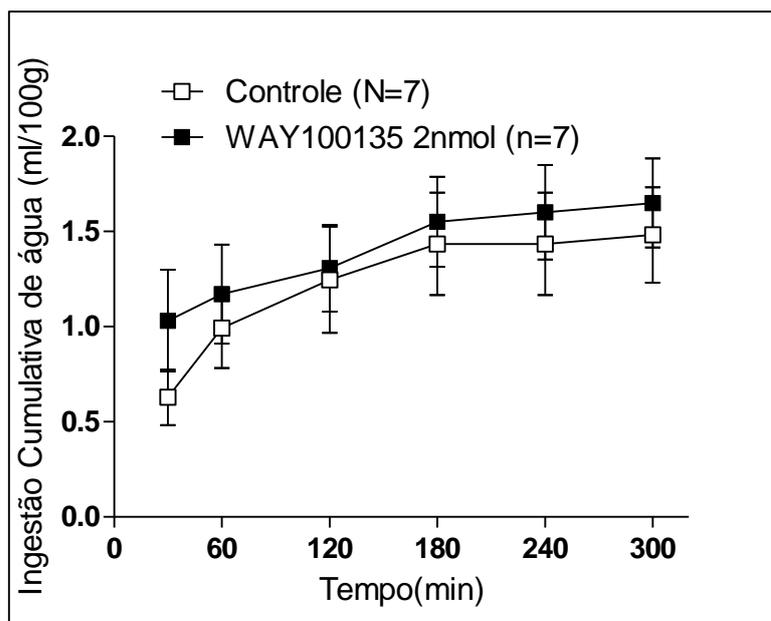


Figura 28- Ingestão cumulativa de água (gráfico A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) de animais submetidos ao protocolo FUROCAP Modificado e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2µl/rato. *P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparado ao controle.

O efeito da microinjeção aguda e intra-DRN de WAY100135 no desafio experimental de depleção de sódio pelo protocolo de FUROCAP Modificado no comportamento de ingestão de água não induziu nenhuma alteração significativa entre os grupos (Figura 28 A). Em contrapartida tal efeito, diferentemente do protocolo FUROCAP sem dieta pobre em sódio, induziu uma redução resposta natriorexigênica intensa e prolongada nos animais tratados com WAY100135, intra-DRN como observado na figura 28 B. Podemos notar que a resposta aconteceu já no intervalo de tempo correspondente a 60 minutos ($1,79 \pm 0,22$ vs $0,73 \pm 0,17$ ml/100g, $P<0,05$) e essa resposta prolongou-se por todos os intervalos de tempo como 120 minutos, ($3,19 \pm 0,30$ vs $0,88 \pm 0,22$ ml/100g, $P<0,01$) 180 minutos ($3,98 \pm 0,34$ vs $1,24 \pm 0,29$ ml/100g, $P<0,001$) e 240 minutos ($4,58 \pm 0,49$ vs $1,66 \pm 0,36$ ml/100g, $P<0,001$).

4.12-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos submetidos á estimulação β-adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL.

A



B

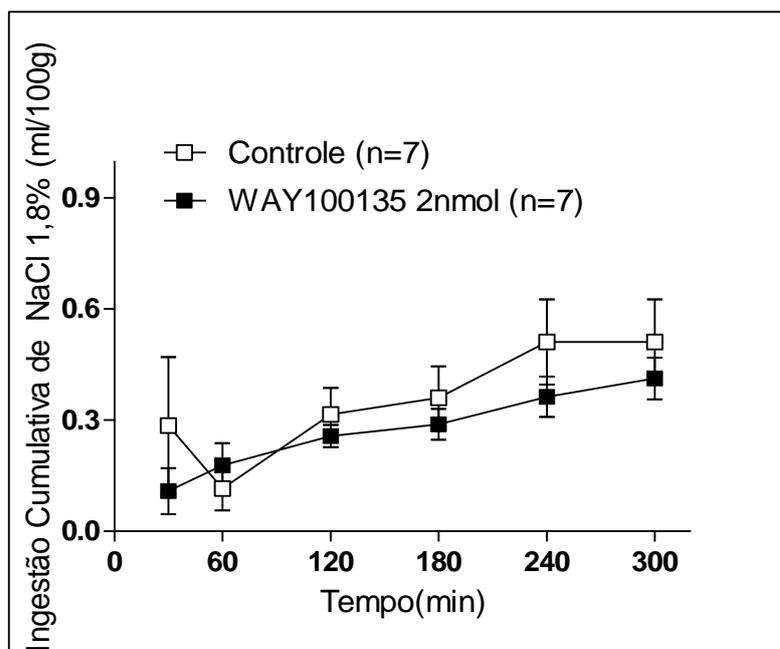
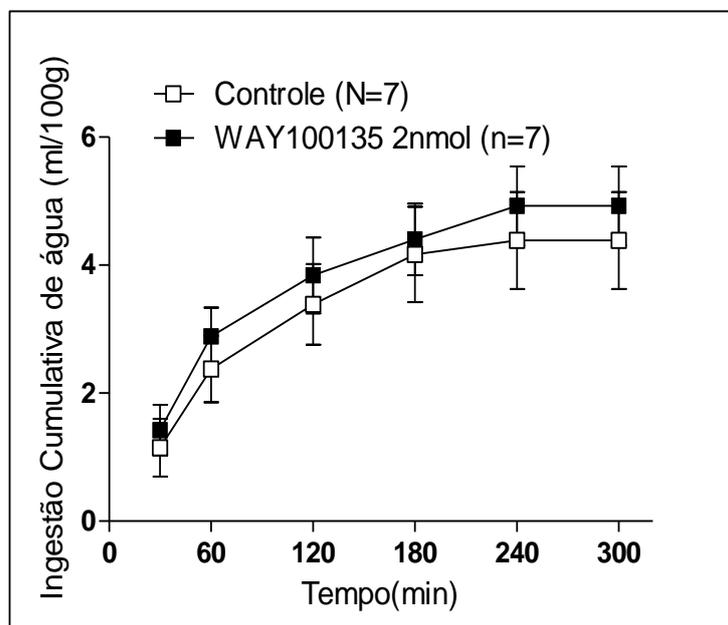


Figura 29- Ingestão cumulativa de água (gráfico A) e NaCl 1,8% (gráfico B) de animais submetidos à estimulação estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2 μ l/rato..

Da mesma forma que ocorreu no tratamento agudo com o agonista 8-OH-DPAT, intra-DRN, neste paradigma a administração aguda e intra-DRN do antagonista WAY100135 não promoveu nenhuma alteração estatísticas em relação ao comportamento de ingestão de água (Figura 29 A) e NaCl 1,8% (Figura 29 B) neste protocolo de estimulação β -adrenérgico.

4.13-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos submetidos à estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL Modificado.

A



B

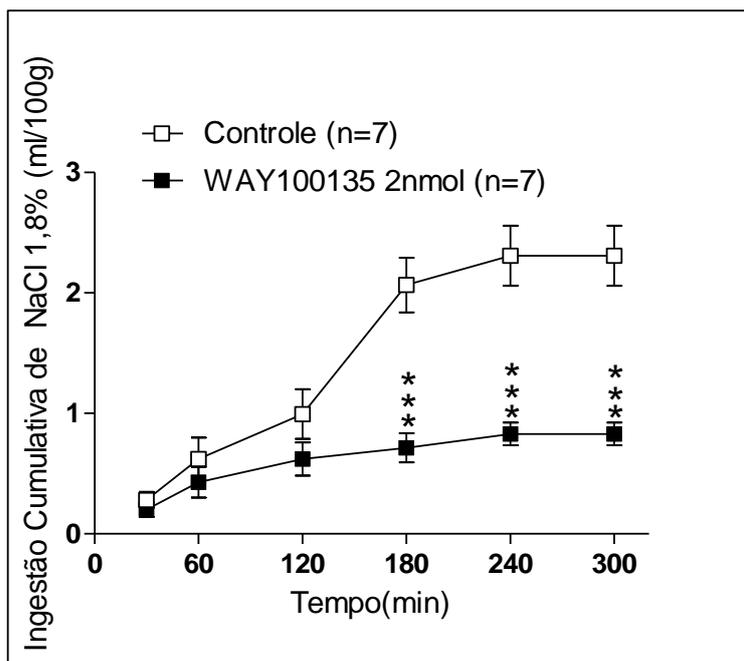


Figura 30- Ingestão cumulativa de água (gráfico A), NaCl 1,8% (gráfico B) e índice de preferência por sódio (gráfico C) de animais submetidos à estimulação estimulação β -adrenérgico pelo Protocolo ISOPROTERENOL Modificado e microinjetados agudamente, intra-DRN com WAY100135 na concentração de 2nmol/0,2 μ l/rato. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao controle.

Microinjeção de antagonista de receptor 5-HT_{1A} agudamente em ratos submetidos a á estimulação β -adrenérgico pelo protocolo ISOPROTERENOL Modificado ao contrário do esperado não alterou a ingestão de água em todos os intervalos de tempo mensurado, tanto o grupo tratado como o grupo controle tiveram uma resposta dipsogênica igual (Figura 30 A). Já em relação à resposta de ingestão de salina hipertônica podemos observar na figura 30 B que os animais microinjetados agudamente como WAY100135, intra-DRN tiveram uma redução da ingestão de NaCl 1,8% que tornou-se evidente mais tardiamente no tempo equivalente aos 180 minutos ($0,7 \pm 0,12$ vs $2,0 \pm 0,22$ ml/100g, $P < 0,001$) e aos 240 minutos ($0,83 \pm 0,09$ vs $2,3 \pm 0,25$ ml/100g, $P < 0,001$).

5-DISSCUSSÃO

5.1-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos repletos (normovolêmicos e normohidratado)

De acordo com os resultados apresentados acima, neste paradigma experimental não foi observada nenhuma alteração significativa em relação à ingestão de água. Estudos realizados por De Gobbi et al. (2005) elucidaram um possível mecanismo neural através do qual a sinalização 5-HT poderia aumentar a sede, neste trabalho eles sugeriram que a infusão de 8-OH-DPAT no LBNP induz o aumento da ingestão de água.

Dados cromatográficos demonstram que níveis globais de 5-HT estavam aumentados no NPBL quando ratos privados de água e sódio têm novamente acesso aos bebedouros contendo água e salina hipertônica (Tanaka et al. 2004). Estudos realizados pelo nosso laboratório demonstraram que administração sistêmica de 8-OH-DPAT nas maiores dose (760nmol e 1,52 μ mol) aumentava a ingestão de água no intervalo de tempo correspondente a 2 horas após a administração (Fonseca et al. 2009) tal achado não foi evidenciado na administração intra-DRN. Ainda em relação à administração sistêmica de 8-OH-DPAT Caras et al. (2008) também notificaram que quando os animais eram ofertados com bebedouros contendo somente água ocorria aumento significativo da ingestão de água.

Note que em relação à mensuração de salina hipertônica este tratamento induziu uma resposta natriorexigênica aos 120 minutos que se prolongou até o ultimo intervalo avaliado, isso ainda foi evidenciado na avaliação do índice de preferência por sódio. Essa ação local do agonista em condições basais pode sugerir uma especificidade desse mecanismo em atuar no mecanismo de inibição do apetite por sódio. Estudos realizados por Cooper et al.) mostraram que a administração sistêmica e aguda de agonistas de receptor 5-HT1A (8-OH-DPAT e gepirona) ambos em doses crescentes, aumentou a ingestão de duas soluções salinas hipertônicas de maneira dose-dependente, mas produziu pouco ou nenhum aumento no consumo de água e solução salina isotônica.

Estudos desenvolvidos por Caras et al. (2008) demonstraram que administrações sistêmica por via subcutânea de 8-OH-DPAT induzia o aumento de ingestão de NaCl 1,8% dose-dependente uma vez que á medida que aumentava a dose do agonista ocorria um aumento simultâneo da ingestão de salina hipertônica ao contrário do que realizamos neste trabalho eles utilizaram apenas um bebedouro graduado contendo salina hipertônica. Ainda neste estudo outros dados contradizem do realizado neste trabalho, usando, porém teste de dois bebedouros, igual ao nosso estudo, os animais tratados com 8-OH-DPAT na dose 30mg/kg evocou uma diminuição da preferência por soluções salinas (Caras et al. 2008). Essa resposta poderia está vinculada à dose administrada que é considerada relativamente alta e com isso poderia induzir uma resposta parecida com a administração crônica. Porém eles não discutem dessa forma e consideram tal achado ser devido ao aumento do consumo de água sem interferir na palatabilidade de NaCl. Nossos achados nos conduzem a especular que a estimulação do receptor 5-HT1A em condições basais é o oposto do que realmente ocorre quando os níveis corporais de sódio estão saturados. Assim, durante todo o processo de restauração do equilíbrio homeostático do íon sódio, um “*cluster*” exclusivo de neurônios serotoninérgicos teria uma ação tônica funcionando como um importante mecanismo fisiológico de determinação do estado de saciedade ao sal.

Experimentos executados por Villa et al. (2007) mostraram que a realização de microinjeção bilateral de 8-OH-DPAT nas doses de (1, 2,5 e 5 μ g) no PVN evocou diminuição da resposta natriorexigênica nas maiores doses, sendo na dose de 5 μ g a diminuição foi significativa em todos os intervalos de tempo. Tal achado mesmo sendo numa região encefálica diferente do estudado neste trabalho elucidada uma participação dos receptores 5-HT1A no mecanismo serotoninérgico ascendente de expressão de saciedade ao sal.

5.2-Efeito da administração intra-DRN aguda do agonista 5-HT1A, 8-OH-DPAT em grupos de ratos submetidos ao Protocolo Isoproterenol.

A estimulação de receptor β -adrenérgico pelo protocolo de administração subcutânea de agonista deste receptor como o isoproterenol induz a liberação de renina por ativação direta de receptores β -adrenérgicos localizados na células justaglomerulares e por atuação indireta através da

ativação simpática que desencadeia queda na pressão sanguínea. Esses dois estímulos são potentes geradores de ANGII, que por sua vez, induz sede (Lehr et al. 1967; Rettig et al. 1981), através da ativação de receptor AT1 localizado na lamina terminal mais precisamente no SFO (Fitts, 1994).

A intensidade do consumo de água mediada pela ANG II periférica é influenciada pela sua ação na pressão arterial já que atua sobre a musculatura vascular (Stocker et al. 2001). A estimulação do SRAA sugere que isso desencadeia uma desinibição direta da ação da angiotensina II sobre o nível de renina em células justaglomerulares. (Wagner et al. 1997). Em contraste, Kim et al. (2007) mostraram que a manutenção dos níveis normais de síntese de renina e liberação tônica requer ativação de receptores β -adrenérgicos.

Como podemos observar através dos resultados, que este protocolo de estimulação β -adrenérgica considerado um protocolo dipsogênico (Lehr et al. 1967; Rettig et al. 1981) não alterou a resposta de ingestão de água e NaCl 1,8%. Evidências experimentais realizadas em nosso laboratório demonstraram que animais submetidos à lesão eletrolítica no DRN que receberam administração subcutânea de isoproterenol na dose 300 μ g/kg tiveram um aumento significativo da ingestão de água em relação aos animais que não receberam o Isoproterenol. Em contrapartida em relação à ingestão de salina hipertônica nenhuma alteração foi observada. (Olivares et al. 2003). Numa mesma linha de raciocínio a lesão eletrolítica nesta região pode afetar outros subnúcleos de neurônios serotoninérgicos diferentes do estudado neste trabalho e com isso interferir no comportamento dipsogênico.

Tal comportamento, já descrito por Reis et al. (1990) foi observado em ratos previamente submetidos a injeção ICV com ANGII e carbacol. Após a administração ICV de MK212 (um agonista de receptor 5-HT_{2C}) os animais apresentaram uma diminuição do comportamento dipsogênico mesmo sob um estímulo de indução de sede pela administração central de ANG II, bem como pela estimulação do sistema parassimpático com administração central de carbacol que promove sede osmótica induzida. Posteriormente, outro trabalho realizado por este mesmo grupo demonstrou que administração de MKC212 em animais submetidos à administração sistêmica de Isoproterenol reverteu o comportamento dipsogênico reduzindo a ingestão de água (Reis et al. 1991).

Dessa forma, já é bem descrito que o sistema serotoninérgico central desempenha um papel na modulação do comportamento de ingestão de água. Mas em relação ao sistema estudado neste trabalho, nós sugerimos que tal sistema não interfira no comportamento de beber água. Por outro lado não notamos nenhuma alteração da ingestão de salina hipertônica, possivelmente devido a essa dose de isoproterenol está mais restrita a geração de sede. Porém, estudo ainda em preparação no nosso laboratório demonstram que este protocolo dipsogênico também pode interferir no comportamento de ingestão de salina hipertônica possivelmente através do aumento da ingestão de água já que, imediatamente após essa ingestão é notado o comportamento natriorexigênico. (Mecawi et al. em preparação). O tratamento agudo com 8-OH-DPAT por sua vez não alterou o apetite ao sódio neste protocolo dipsogênico.

5.3-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT em grupos de ratos em condição basal (normovolêmicos e normohidratado).

Neste grupo experimental novamente não foi observada nenhuma diferença estatística em relação à ingestão de água. Estudos realizados por Magalhães-Nunes et al. (2007) demonstraram que o limiar para sede foi reduzido em animais tratados cronicamente com sertralina após desafios osmóticos, hipovolêmicos e por estimulação β -adrenérgica. Neste contexto, diferentemente dos nossos achados onde não observamos nenhuma alteração em relação ao comportamento de sede, o tratamento com sertralina altera todo sistema serotoninérgico.

Com isso, mais uma vez reforçamos a hipótese que tal mecanismo fisiológico envolvido neste tratamento não modula tonicamente a ingestão de água. Por outro lado a ingestão de NaCl foi reduzida nos intervalos de tempo e prolongado até a última avaliação, dessa forma este resultado corrobora a hipótese de estar ocorrendo dessensibilização causada pela estimulação repetida dos autorreceptores 5-HT_{1A}. Essa dessensibilização pode ser observada num período de 2 a 3 semanas

de tratamento com agonista (Riad et al., 2001).

Dessa forma, observamos um aumento da atividade serotoninérgica em regiões prosencefálicas modulando o apetite ao sódio. Atrelado a isso sugerimos que a redução do comportamento natriorexigênico mais tardiamente em condições basais é devido à fase inicial de ingestão, onde o controle tônico desenvolvido pelo sistema serotoninérgico foi mais expressivo após o contato prévio com a solução. O fato de o animal ingerir a solução hipertônica parece estimular essas vias que integram essa saciedade ao sal.

Ainda em relação à redução da ingestão de salina hipertônica neste protocolo experimental torna-se relevante sugerir o mecanismo de dessensibilização do receptor estudado uma vez que vários estudos relacionando o tratamento crônico e sistêmico de agonista de receptor 5-HT_{1A} correlacionam este efeito a esta resposta celular. (Albert et al. 1996; Blier et al. 1998; Riad et al. 2001; Albert & Lemonde, 2004; Assié et al. 2006). Nota-se com relação à preferência por sódio que a resposta foi contrária à ingestão salina, apresentando redução significativa nos animais tratados cronicamente, nos intervalos de tempo iniciais. Essa resposta parece está vinculada aos baixos níveis de ingestão da salina hipertônica nos tempos iniciais mesmo não sendo significativa a diferença e ingerindo os mesmos valores de ingestão de água, o animal tratado acaba realizando possivelmente uma reposição eletrolítica. Com isso podemos sugerir que o fato de não termos observado diferenças significativas nos intervalos de tempo iniciais remete-nos a interpretar que essa reposição não induziria o mecanismo de saciedade ao sódio.

Evidências experimentais demonstraram que alteração na transcrição do receptor 5-HT_{1A} pode evocar mudanças no sistema serotoninérgico que emite projeções mesencefálicas para as áreas límbicas e corticais, levando à predisposição para a depressão (Nestler et al., 2002). O aumento da neurotransmissão serotoninérgica em tratamento para depressão não tem efeito imediato, tal sistema requer plasticidade adaptativa pós-sináptica, tais como a alteração na expressão de fator neurotrópico de derivação cerebral, remodelação sináptica e neurogênese (Nestler et al. 2002; Duman, 2004).

Sendo a depressão uma condição que pode cursar com déficit do sistema serotoninérgico, esse mecanismo de regulação possivelmente afeta o sistema de regulação hidroeletrolítica acarretando distúrbios hemodinâmicos bem como hiponatremia em indivíduo com depressão. Neste trabalho fomos os primeiros a realizar um tratamento crônico e intra-DRN, porém nosso estudo não realizou abordagem eletrofisiológica de campo; nossa avaliação foi apenas comportamental.

5.4-Efeito da administração intra-DRN crônica do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT em grupos depletados de sódio pelo Protocolo de Furosemida.

Novamente neste grupo experimental nenhuma alteração de sinalização de ingestão de água foi observada. Estes dados corroboram aos resultados obtidos em Magalhães-Nunes (2009) onde a autora observou que o tratamento sistêmico crônico com 8-OH-DPAT não induziu nenhuma alteração no comportamento dipsogênico em animais depletados de sódio.

Em relação à ingestão de salina hipertônica esse tratamento induziu uma resposta oposta ao tratamento agudo como mencionado anteriormente, neste tratamento foi observado uma redução da ingestão de NaCl 1,8% no intervalo de 120 a 300 minutos.

Curiosamente, apesar da diminuição do apetite por sódio nenhuma alteração significativa foi detectada na avaliação do índice de preferência por sódio. Neste contexto a não alteração desse índice poderia estar vinculado ao alto valor de erro em relação à água já que o índice de preferência é uma medida que relaciona ingestão de NaCl 1,8% e o valor total de ingestão de água e salina hipertônica.

Uma hipótese que vem sendo defendida por inúmeros pesquisadores é a dessensibilização seletiva de autorreceptores 5-HT_{1A} um fator importante no mecanismo de mudanças adaptativas que permite uma ação mais apurada dos antidepressivos. Estudos eletrofisiológicos e neuroquímicos evidenciaram que o tratamento com agonistas que atuam de forma direta e indireta no receptor 5-HT_{1A} parecem induzir dessensibilização após o tratamento crônico (Blier & Montigny, 1987; Schechter et al. 1990;.Blier & Montigny, 1994).

A descoberta desse mecanismo fisiológico foi de grande importância para o avanço dos medicamentos antidepressivos, tendo em vista que a ação crônica de agonistas de receptor 5-HT_{1A} aumenta a concentração extracelular de 5-HT em algumas áreas do prosencéfalo (Artigas et al. 1996). Achados de Kreiss & Lucki (1997) mostraram que o pré-tratamento subcutâneo com 8-OH-DPAT na dose de 1mg/kg/dia no primeiro dia não alterou a liberação de serotonina no estriado e hipocampo ventral. Em contraste, o tratamento crônico com 8-OH-DPAT a partir do sétimo e décimo quarto dia evocou diminuição na liberação de serotonina no estriado ventral e apenas no décimo quarto dia no hipocampo ventral. Dessa forma esse tratamento crônico estaria induzindo dessensibilização do receptor 5-HT_{1A} no DRN. Esta dose utilizada, porém parece inadequada para testar o estado funcional dos receptores 5-HT_{1A} como questionado por Casanovas et al. (1999). Estudo realizado por Casanovas et al. (1997) relataram que a ED₅₀ de 8-OH-DPAT para reduzir a liberação 5-HT no cérebro do rato é 0,017 mg/kg, s.c. A dessensibilização do receptor 5-HT_{1A} no DRN observado no trabalho de Casanova et al. (1999) foi induzida pelo tratamento crônico com o agonista alnespirona e não foi observado o mesmo efeito como o 8-OH-DPAT.

Em nosso estudo a realização de uma administração local, intra-DRN tornou mais específica à resposta. Depois de 2 a 3 semanas no tratamento com inibidores da recaptação de serotonina, há supostamente uma diminuição da expressão de 5-HT_{1A} pré-sináptico sendo observada sua internalização (Hervas et al. 2001; Riad et al. 2001), enquanto que os receptores pós-sinápticos permaneceram inalterados. Com base nestes achados, reforçamos a nossa hipótese de aumento da sinalização serotoninérgica ascendente do DRN por estimulação crônica dos autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} localizados em neurônios pós-sinápticos interferindo na modulação da saciedade ao sal.

5.5-Efeito da administração sistêmica e intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos depletados pelo Protocolo Furosemida sem acesso à água.

Neste protocolo, em relação à administração sistêmica foi observado que os comportamentos de ingestão de água e salina hipertônica não apresentaram nenhuma alteração estatística. Neste sentido sugerimos atribuir essa resposta ao fato de ter restringido esses animais a água combinado ao protocolo de depleção por administração de furosemida.

A hipovolemia e hiperosmolalidade ativam diversas respostas comportamentais e neuroendócrinas, que podem ser induzidas pelo modelo animal de privação hídrica. Neste sentido só a restrição por um período de 24 horas pode evocar respostas de apetite ao sódio devido à deficiência de sódio (Weisinger et al. 1985). Dessa forma uma condição de depleção de sódio induzida pela administração de furosemida acarreta uma intensa diurese e natriurese onde o animal fica em condição de hiponatremia. Esperava-se que tal tratamento induzisse uma diminuição do apetite por sódio, visto que a administração sistêmica de WAY100135 atuando como antagonista de receptores 5-HT_{1A} evocaria um aumento da atividade serotoninérgica (Hartley & Fletcher, 2004). O que parece ter acontecido é que a administração sistêmica desse antagonista neste protocolo não evocou respostas integrativas centrais específicas induzidas pela depleção.

Desta forma, em outro experimento realizamos este mesmo protocolo de depleção, porém a administração foi realizada diretamente no DRN objetivando tornar a resposta mais específica. Como esperado por nós, este paradigma experimental induziu uma redução da resposta natriorexigênica sem interferir no comportamento dipsogênico como já notificados pelos resultados com administração do agonista.

Anteriormente Badauê-Passos (2006) realizou administração intra-DRN com WAY100635 um antagonista de receptor 5-HT_{1A} mais potente que o utilizado neste trabalho. Neste experimento os ratos também eram submetidos à condição de depleção de sódio pelo protocolo furosemida mais privação de água, portanto não foi evidenciado nenhuma diferença significativa na ingestão de NaCl 1,8% no intervalo de tempo avaliado por ele. Neste contexto é importante destacar que a redução da ingestão de salina hipertônica observada neste trabalho foi considerada tardia iniciando no tempo relativo a 180 minutos e prolongando-se até 300 minutos e a mensuração da ingestão realizada no trabalho de Badauê-Passos (2006) foi apenas no intervalo de tempo de 120 minutos.

Outros trabalhos por sua vez, demonstraram que administração de antagonistas 5-HT_{1A} (pMPPF) em ratos depletados (furosemida 20mg/kg) diretamente no PVN não alterava a ingestão de NaCl induzida pela privação de sódio. Tal trabalho por sua vez, sugeriu que não havia inibição tônica evocada por esses receptores serotoninérgicos sobre o consumo de sódio e que este receptor no PVN exerce sua atividade apenas quando estimulado (Villa et al. 2007). Sendo o PVN um núcleo hipotalâmico importante na regulação homeostática da concentração de sódio no LEC e que administrações neste mesmo local de agonista de receptor 5-HT_{1A} evocam respostas diferentes do encontrado neste trabalho podemos sugerir atuações diferentes desses receptores localizados no PVN em relação à modulação do equilíbrio de eletrólitos. Dessa forma tais receptores localizados no DRN parecem conduzir respostas fisiológicas mais finas nesse comportamento natriorexigênico. Ainda neste panorama, tais respostas são processadas por estruturas procensefálicas, como o próprio PVN configurando um ajuste integrado no comportamento ingestivo.

5.6-Efeito da administração sistêmica e intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos depletados pelo Protocolo Furosemida com acesso a água.

Administração sistêmica e a microinjeção intra-DRN aguda de WAY100135 promoveu uma diminuição da ingestão de salina hipertônica sem interferir na ingestão de água. No tratamento sistêmico tal diminuição foi significativa a partir do intervalo de tempo de 180 minutos e a administração intra-DRN esta redução foi significativa já nos 60 minutos de mensuração. Esta diferença no tempo da resposta entre o tratamento sistêmico e intra-DRN possivelmente está vinculada a própria via de administração, tendo em vista que o tratamento realizado diretamente no DRN evoca respostas mais rápidas e específicas. Neste protocolo os animais depletados tiveram acesso à água, desta forma a diurese provocada pela furosemida era repostada, porém os animais ficavam numa condição de hiponatremia sem alteração do fluxo. Fato parecido ocorre em atletas que estão correndo, perde água e eletrólitos através do suor e acabam ingerindo muita água não repondo os eletrólitos, induzindo uma hiponatremia intensa.

Diferentemente do paradigma de depleção de sódio descrito anteriormente este protocolo induziu uma diminuição tardia da ingestão de NaCl 1,8% no tratamento sistêmico, tal achado parece está atrelado a necessidade de repor tal íons e com isso tal repostada evocaria sinalizações da circuitaria serotoninérgica objetivando modular essa ingestão induzida. Estudo realizado por Rouah-Rosilio et al. (1994) consideram a existência de dois substratos morfológico e fisiológico que integra a regulação da ingestão de sódio espontânea e induzida.

Ainda neste contexto o efeito provocado pela administração intra-DRN de WAY100135 neste paradigma foi diferente do anterior, mesmo acontecendo uma redução na ingestão de salina hipertônica nos dois protocolos, a resposta deste foi iniciada mais precocemente. Tais achados estão de acordo com dados da literatura onde estudos usando técnica de determinação neuronal de proteína c-Fos evidenciaram que ratos submetidos ao protocolo de depleção de sódio desencadeiam ativação de neurônios serotoninérgicos do DRN durante a sinalização ascendente para a resposta de saciedade ao consumo de sal. (Franchini et al. 2002). Ainda nesta abordagem imunohistoquímica Badauê-Passos et al. (2007) elucidou que o DRN é um importante centro de integração de informações que modula a ingestão de salina hipertônica em animais submetidos a depleção de sódio.

Nos experimentos realizados por Tanaka et al. (1998) demonstraram que circuitos neurais que integram o SFO e regiões da rafe evocariam respostas intrínsecas para regulação dos fluidos corporais. Dessa forma, o papel desse sistema serotoninérgico modulada pela sinalização de autorreceptores somatodendríticos localizados na região dorsal-ventral do DRN parece ser crítica na modulação induzida por esse protocolo de depleção de sódio. Com isso tal achado sugere um envolvimento central desse sistema no comportamento motivado de apetite ao sódio sem interrupção de sinalização de sede.

Com essa metodologia podemos atribuir que uma sinalização mais específica a regulação do íon sódio parece está constantemente sendo modulada por essa região do DRN já que a ativação desses receptores parece está reunida em núcleos menores que compõem este maior.

5.7-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos repletos (normovolêmicos e normohidratados).

Um efeito similar ao encontrado no protocolo anterior foi observado neste paradigma. O tratamento agudo com WAY100135 via intra-DRN nesta condição também não alterou a ingestão de água confirmando mais uma vez um não envolvimento desse sistema estudado neste trabalho em relação ao mecanismo de regulação de sede.

Em relação à ingestão de salina hipertônica observamos uma redução significativa no intervalo de tempo de 60 minutos prolongando até 300 minutos. Essa condição basal objetivou avaliar se esse bloqueio dos receptores e conseqüente aumento da frequência de disparo dos neurônios serotoninérgicos também iriam interferir em animais repletos.

Estes resultados já tinham sido evidenciados com a administração do agonista como mencionado no início dessa discussão. Confirmamos desta forma que a atuação de antagonista ao contrário do agonista inibiu a ingestão de sódio em animais normohidratados e normovolêmicos. Estes resultados corroboram a hipótese do mecanismo elucidado aqui que evoca uma inibição tônica da ingestão espontânea. Em contraste, nos resultados com a utilização imunohistoquímicas com microinjeção de Flurogold (FG) no DRN, Badauê-Passos et al. (2007) registrou um aumento do número de células duplamente marcada para Fos-FG nos neurônios dos núcleos da lamina terminal em ratos depletados em relação a animais em condição basal, todos submetidos ao teste de ingestão de água e NaCl 1,8%.

Em condição basal, parece existir mecanismo de sinalização que integra conexões neurais que possivelmente são diferentes da estimulação induzida, mas ambos parecem promover sinalização de saciedade ao sal. Entretanto, os mecanismos fisiológicos que estariam implicados nesta conexão não são bem elucidados.

5.8- Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos á depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP.

A utilização desse protocolo na administração aguda de WAY100135, intra-DRN objetivou elucidar se numa depleção aguda o mecanismo de sinalização serotoninérgica responsável pela saciedade ao sódio reverteria esse quadro de indução do comportamento natriorexigênico. O protocolo furocap como já bem descrito e utilizado por diversos autores que estudam homeostase hidroeletrolítica (Mecawi et al. 2008; Fitts & Masson, 1989; Badauê-Passos et al. 2003; Olivares et al. 2003; Pereira et al. 2009) induz a sede bem como o aumento da ingestão de salina hipertônica que parece depender de ANG II, sintetizado no cérebro.

Rápida indução do apetite por sódio e água está relacionada a uma hipotensão leve como demonstrada por Thunhorst & Johnson (1994) associada com diminuição de ANG II circulante (Schiffirin et al 1982; Fitts & Masson, 1989; Fitzsimons, 1998). Estudos realizados por Thunhorst et al. (1998) mostraram que este tratamento induz a expressão de c-fos na lâmina terminal, núcleos hipotalâmicos relacionados ao equilíbrio hidromineral. Este protocolo sensibiliza a ingestão de sódio, possivelmente através da ativação de receptores AT1. A ativação desses receptores AT1 no SFO e OVLTL por ANGIO é o principal insumo para a geração de sede e de apetite de sódio (Thunhorst et al. 1989; Oldfield & McKinley, 1995; Thunhorst et al. 1994 Fitzsimons, 1998; Mckinley et al. 2001).

Neste contexto, Pereira et al. (2009) demonstraram uma redução da ingestão de sal induzida por estímulos natriorexigênica no protocolo FUROCAP quando administrado losartan (um potente antagonista de ANGIO em receptores AT1).

Conduto, não foi observamos nenhuma alteração significativa em relação aos dois comportamentos ingestivos aqui estudados. Nota-se que em relação à ingestão de salina hipertônica ocorreu uma tendência à diminuição que não foi estatisticamente comprovada. Curiosamente, outra questão importante a comentar é que diferentemente de outros estudos nossos animais em questão bebeu muito pouco água e NaCl 1,8% no protocolo Furocap, isso talvez poderia ser atribuídos a nossa linhagem wistar.

Em relação a esta metodologia buscamos averiguar se o sistema serotoninérgico modulado por receptores 5-HT_{1A} no DRN seria capaz de bloquear essa resposta mediada por ANGII central ou até mesmo a especular se a própria ANGII central talvez poderia atuar em receptores angiotensinérgicos no DRN. Apesar da ausência de dados na literatura a respeito da presença de receptores para ANGII no DRN acreditamos que essa seria uma importante via de contrabalanço da resposta natriorexigênica e assim induzir saciedade.

Em relação à atuação da ANG II central Nahmod et al. (1978) demonstraram que a administração de ANG II no terceiro ventrículo pode induzir a liberação de serotonina a partir de terminações neuronais do hipotálamo e tronco cerebral, bem como acelerar sua síntese no corpo celular. Ainda neste mesmo trabalho eles sugeriram que ANGII poderia ativar a triptofano hidroxilase. Mas eles observaram que essa ativação é dependente da degradação de ANGII.

Olivares et al. (2003) demonstraram que animais que tiveram o DRN lesionado (eletrolítica) e que foram submetidos ao protocolo de Furocap apresentaram um aumento significativo da ingestão de água e salina hipertônica. Esses achados sustentaram a hipótese de que esta lesão possivelmente tenha suprimido as vias serotoninérgicas que iriam desencadear saciedade e com isso sustenta essa hipótese da existência de uma retroalimentação angiotensinérgica que promova um mecanismo de ajuste mais fino desse comportamento natriorexigênico.

Adicionalmente, mecanismos glutamatérgicos têm sido implicados no controle da ingestão de líquidos. A administração aguda de agonistas de receptores não-NMDA no NPBL exerce uma influência inibitória sobre a ingestão de sódio em animais submetidos a protocolo de depleção de volume pelo protocolo de FUROCAP. Tal trabalho demonstrou uma possível interação de vias serotoninérgicas com vias glutamatérgicas no NPBL (De Gobbi et al. 2009).

5.9- Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos submetidos à depleção aguda de sódio pelo Protocolo FUROCAP Modificado.

A elaboração desse protocolo onde modificamos o clássico Furocap se restringiu em tornar a indução do apetite ao sódio mais intenso e prolongado. Dessa forma associamos esse protocolo a uma dieta pobre em sódio durante quatro dias.

Considerando que a dieta pobre em sódio é um protocolo de depleção de sódio não-invasiva e que fisiologicamente pode acontecer na natureza, a associação com o protocolo descrito anteriormente, parece intensificar a resposta dipsogênica e natriorexigênica. Estudos realizados por Pimenta et al. (2009) mostraram que a aplicação de uma dieta pobre em sódio pode promover uma redução global em indivíduos que sofrem de hipertensão resistente. A restrição dietética de sal na dieta pode induzir uma vasodilatação endotélio-dependente em indivíduos normotensos, estes resultados sugerem efeitos cardioprotetores adicionais além da redução da pressão arterial (Dickinson et al. 2009).

Dieta hipossódica pode induzir alterações periféricas como diminuição do mRNA de subtipo de receptor AT_{1a} no fígado, rim e pulmão (Schmid et al. 1997). A exposição crônica de dieta pobre em sódio promove ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Sacks et al. 2001) e bem como induz expressão de c-Fos em áreas do prosencéfalo, como a SFO, OVLT, PVN, SON e os níveis de ANGI, ANGII e aldosterona também aumentou no plasma e no prosencéfalo (Lu et al. 2009). Neste mesmo trabalho Lu et al verificou através da técnica PCR que o mRNA para AT₁ e ECA no PVN, SON e OVLT diminuiu significativamente, enquanto expressão de mRNA do receptor AT₂ não foi observada diferença estatística nas áreas examinadas.

Estudos realizados no nosso laboratório encontraram uma pequena redução no ganho de peso do grupo tratado com dieta pobre em sódio. Desta forma este achado foi atribuído à diminuição do volume sanguíneo, que por sua vez, induz a uma queda pequena, mas significativa na pressão arterial média. Parece por sua vez que esta resposta adaptativa possivelmente mantém a concentração plasmática de sódio, mostrando que, nesta condição, a manutenção dos níveis de sódio foi priorizada em detrimento do volume sanguíneo e pressão. (Mecawi et al. em preparação).

Neste contexto, o protocolo Furocap modificado induziu uma ingestão de salina hipertônica e água de forma bastante intensa e prolongada (Mecawi et al. em preparação). E com isso torna-se

um protocolo mais acurado para estudar tais comportamentos ingestivos.

Como observado neste trabalho em que realizamos microinjeções intra-DRN de WAY 100135 em ratos submetidos ao protocolo Furocap modificado verificamos uma intensa redução do apetite por sódio logo a partir do intervalo de tempo correspondente aos 60 minutos e tal redução foi ainda maior a partir desse intervalo de tempo e se perpetuando até o ultimo tempo avaliado.

Mais uma vez em relação à ingestão de água não foi verificado nenhum resultado significativo. A realização desse protocolo por sua vez, foi necessária para identificarmos algum envolvimento da ANGII, bem como de outros peptídeos envolvidos nesta regulação, mesmo não termos achado nenhum resultado significativo no Furocap normal.

Acreditamos que o sistema angiotensinérgico central retroage ao DRN possibilitando um reforço a saciedade. Dados ainda não publicados mostraram que no Furocap modificado acontece uma redução de ANP, OT e ANGII plasmática em relação ao Furocap sem alterar na concentração plasmática de vasopressina (Mecawi et al. em preparação). Com isso notamos que a redução de ANP e OT eliciam respostas relacionadas ao aumento do comportamento natriorexigênico.

Administração bilateral no LPBN de metisergida, antagonista de receptor 5-HT_{2C} em ratos submetidos à expansão de volume diminui as concentrações plasmáticas de ANP e OT. Assim, pode-se supor que 5-HT na NPBL facilita a liberação de ANP e OT que agem nos rins, aumentando excreção de água e eletrólitos, mas esse mecanismo parece depender de um estímulo que neste caso foi à expansão de volume (Margatho et al. 2007). Ainda neste panorama, Margato et al. (2008) em estudo imunohistoquímico com administração de flurogold no LPBN em animais submetidos à expansão de volume descreveram determinadas áreas do cérebro, que integra LPBN, NTS medial, LC, e neurônios serotoninérgicos do DRN que possivelmente formam uma rede neural que recebe e integra sinais relacionados à homeostase dos fluidos corporais.

Desta forma parece existir um mecanismo de saciedade ao sal que integra DRN e PVN promovendo a atuação inibitória em neurônios ocitocinérgicos (Franchini et al. 2002; Godino et al. 2005; Godino et al. 2007 e Margatho et al. 2008). Estas evidências parecem indicar a existência de um circuito neuroendócrino que integra sinais periféricos e centrais implicados com o controle serotoninérgico a partir do DRN.

5.10-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135 em ratos submetidos a estimulação β -adrenérgica pelo Protocolo ISOPROTERENOL.

Como foi descrito anteriormente com a administração do agonista β -adrenérgico, objetivamos mais uma vez avaliar se tal paradigma dipsogênico poderia interferir em alguma via desta autorregulação a partir do DRN induzindo alguma sinalização para interrupção de sede. Mas o que foi verificado no presente trabalho é que nenhuma alteração significativa com relação à ingestão de água.

Dessa forma, tal achado nos faz postular que esse mecanismo de autorregulação dependente dos receptores 5-HT_{1A} localizadas no DRN parece não modular o mecanismo de regulação de sede. Estudos realizados em nosso laboratório através de lesão excitotóxica com ácido ibotênico (Cavalcante-Lima et al. 2005b) simularam uma lesão mais específica em relação à lesão realizada por Olivares et al. (2003), esta lesão excitotóxica objetivou lesionar apenas os corpos dos neurônios localizados na região ventro dorsal do DRN e com isso estudar mais precisamente a região que acreditamos exercer essa autorregulação que também é estudada no presente trabalho.

Neste trabalho realizado por Cavalcanti-Lima et al. (2005b) os animais lesionados foram submetidos ao protocolo de estimulação β -adrenérgica da mesma forma que realizamos nesta dissertação. Eles por sua vez, não evidenciaram nenhuma alteração significativa em relação ao comportamento dipsogênico. Em contrapartida eles evidenciaram um aumento significativo da ingestão de salina NaCl 1,8%, resposta que não aconteceu neste trabalho em relação a ingestão de salina hipertônica.

Como foi observado por nós nesse mesmo protocolo com administração de isoproterenol e microinjeção de 8-OH-DPAT, nenhuma alteração tanto em relação a água como ingestão de salina hipertônica não foi detectada. Neste sentido parece que esse protocolo não seria eficaz para estudar

esse mecanismo específico de autorregulação dos receptores 5HT1A.

4.11-Efeito da administração intra-DRN aguda do antagonista 5-HT1A, WAY100135 em ratos submetidos a estimulação β -adrenérgica pelo Protocolo ISOPROTERENOL Modificado.

A modificação do protocolo já descrito anteriormente foi da mesma forma que nós realizamos com o furocap modificado em que os animais foram previamente submetidos à dieta pobre em sódio durante quatro dias.

Estudos posteriores mais ainda não publicados demonstraram que esse protocolo Isoproterenol modificado induz uma hipotensão imediatamente após a administração do fármaco. Neste trabalho Mecawi et al. (em preparação) também notou que em relação ao comportamento de ingestão de fluidos foi observado aumento significativo da ingestão de água e sal bem como nos níveis plasmáticos de ANG II e AVP no grupo que recebeu dieta pobre em sódio tratado com Isoproterenol em relação aos que não foram previamente tratados com dieta pobre em sódio.

Neste trabalho podemos sugerir que o tratamento com isoproterenol juntamente com o déficit da oferta de NaCl, geram respostas neuroendócrinas e comportamentais desencadeadas por hipotensão. Descrito esses achados observamos que a administração de WAY100135 intra-DRN não alterou o comportamento dipsogênico. Tendo em vista que nenhum protocolo descrito neste trabalho, associado à manipulação farmacológica tanto com agonista como antagonista de receptor 5-HT1A não evocaram alteração significativa da ingestão de água, podemos postular que esse mecanismo fisiológico estudado possivelmente não evoca interrupção de sinais de sede.

Tal comportamento parece depender de outros subnúcleos do DRN ou mesmo de integrações centrais diferentes da elucidada aqui. Nota-se que a região em questão parece ser realmente específica no controle da ingestão de sódio. Ainda neste sentido nós observamos que em relação à ingestão de salina hipertônica a microinjeção intra-DRN induziu uma redução significativa do comportamento natriorexigênico de maneira intensa e prolongada.

Completando essa discussão, um fato importante a comentar neste trabalho foi em relação à mortalidade dos animais no final do experimento tratados com o WAY100135 e submetidos a esse protocolo. Em média dois animais vieram a óbito ao final de cada experimento e os que sobreviviam encontravam-se de forma bastante debilitada haja vista uma possível condição hiponatrêmica. Já os animais controle ao ingerir salina hipertônica retornavam a condição fisiológica inicial. Não podemos atribuir esse óbito a algum problema de manipulação, tendo em vista que esses animais beberam água em intensidade igual ao grupo controle demonstrando uma atividade exploratória normal.

Desta forma, a hipotensão observada neste protocolo parece não inibir este potente mecanismo fisiológico que interfere de forma específica no controle da ingestão de sódio. Ainda neste contexto, o aumento de ANGII e AVP também provocado pela hipotensão parece não ter sido capaz de induzir o apetite ao sódio nos animais tratados com WAY100135. Como o sistema serotoninérgico localizado no DRN modifica a expressão de mecanismo de sinalização de saciedade ao sal ainda não foi completamente abordado, postulamos a hipótese da existência de uma modulação acurada e refinada que integra regiões prosencefálicas importantes na homeostase hidroeletrolítica. Adicionalmente, suspeitamos que alterações como mudanças no sensor de sódio bem como regulação na liberação de ANG II ou expressão de algum componente desse sistema seja também alterado. Ou mesmo o próprio sistema angiotensinérgico podendo interferir nesse sistema dado a detecção de uma conexão bidirecional de neurônios angiotensinérgicos inervando o DRN (Lind, 1986).

Como já mencionado atualmente fala-se de uma projeção bidirecional entre rafe mesencefálica e SFO. Observações imunohistoquímicas têm revelado projeções do SFO imunoreativas à ANG II para a rafe mesencefálica (Tanaka et al. 1998; Lind, 1986) e projeções da rafe mesencefálica imunoreativas à serotonina para o SFO (Lind, 1986). Ademais podemos postular uma possível integração com entre este sistema e o PVN estimulando a liberação de ocitocina ou até mesmo a síntese e ainda interferir na modulação da síntese e liberação de ANP. Como descrito por

Antunes-Rodrigues et al. (2004) tais hormônios são importantes inibidores do apetite ao sal.

6. CONCLUSÃO

Mediante aos resultados descritos acima podemos concluir que:

- 1- Todos os procedimentos experimentais executados neste trabalho não interferiram no comportamento dipsogênico, tal achado sugere que essa sinalização dependente dos receptores 5-HT1A localizados no DRN não altera os mecanismos de interrupção de sede;
- 2- Os dados obtidos sugerem que o tratamento agudo 8-OH-DPAT em condições basais e depletados diminui a transmissão de sinais saciedade ao sódio;
- 3- Por outro lado, a administração crônica, possivelmente por uma dessensibilização dos ARSD 5-HT1A, promoveu a saciedade ao sódio em animais em condições basais e sódio-depletados;
- 4- A administração aguda de antagonistas 5-HT1A, diminuiu significativamente a ingestão de NaCl 1,8%. Esta administração de WAY100135 antecipou e tornou mais intensa a saciedade ao sódio durante a fase ingestiva;

De forma geral, podemos concluir no presente estudo, que parece existir um envolvimento direto de autoreceptores somatodendrítico 5-HT1A localizados no DRN na modulação do apetite ao sódio. Tal envolvimento parece depender de grupamento exclusivo de neurônios serotoninérgicos que modulam o comportamento de ingestão de sal. Tal grupamento parece formar sub-núcleos que devido a distintas funções estão sendo considerado por alguns autores como verdadeiros núcleos dentro do já bem descrito DRN. Dessa forma, todas as evidências mencionadas acima ensejam a hipótese da existência de um grupamento de neurônios serotoninérgicos que ascendem a estruturas prosencefálicas para modular o apetite ao sódio.

7. REFERÊNCIAS

- AGHAJANIAN, G. K.; SPROUSE, J. S. & RASMUSSEN, K. Physiology of the midbrain serotonin system. In: **Psychopharmacology: The Third Generation of Progress**, New York, Raven Press, p. 141-149, 1987.
- ALBERT, P. R. & LEMONDE, S. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. **Neuroscientist**, 6:575-93, 2004.
- ALBERT, P. R.; LEMBO, P.; STORRING, J. M.; CHAREST, A & SAUCIER, C. The 5-HT_{1A} receptor: signaling, desensitization, and gene transcription. **Neuropsychopharmacology**, 1:19-25, 1996
- ALBERT, P. R.; ZHOU, Q. Y.; VANTOLI, H. H. M., BUNZOW, J. R.; CIVELLI, O. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. **J. Biol. Chem.** 265:5825–5832, 1990.
- ANTUNES-RODRIGUES, J., DE CASTRO, M., ELIAS, L. L. K., VALENÇA, M. M & McCANN, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol. Rev.** 84: 169-208, 2004.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M. SAMSON, W. K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. **Endocrinology**, 118:1726-1728, 1986.
- ANTUNES-RODRIGUES, J & COVIAN, M. R. Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. **Acta Physiol Lat AM** 13:94-100, 1963.
- ARMSTRONG, W. E. Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. In: **The Rat Nervous System**, New York: Academic, cap. 18: 377-390, 1995.
- ARTIGAS, F.; ROMERO, L.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. **Trends Neurosci** 19:378–383, 1996.
- ASSIÉ, M. B.; LOMENECH, H.; RAVAILHE V.; FAUCILLON, V. & NEWMAN-TANCREDI A. Rapid desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} receptors by chronic administration of the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist, F13714: a microdialysis study in the rat. **Brit J Pharmacol** 149: 170-178, 2006
- AZMITIA, E. C.; GANNON, P. J.; KHECK, N. M. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. **Neuropsychopharmacology** 14: 35–46, 1996.
- AZMITIA EC. 1987. The CNS serotonergic system: Progression toward a collaborative organization. In: **Psychopharmacology: The Third Generation of Progress**, New York, Raven Press, p. 61-73, 1987.
- AZMITIA, E. C & SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 179: 641-668.1978.
- BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; VENTURA, R. R.; SILVA L. F. S.; OLIVARES, E. L. & REIS, L. C. Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite of euthyroid and hypothyroid rats. **Exp Physiol**, 88: 251-260, 2003.

- BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; GODINO, A.; JOHNSON, A. K.; VIVAS, L. & ANTUNES-RODRIGUES J. 2007. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by sodium depletion-induced ingestion. **Exp Neurol** 206: 86-94, 2007.
- BERESFORD, M. J. & FITZSIMONS, J. T. Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT1 receptor antagonist, Losartan (DuP 753), but not by the AT2 antagonist, CGP 42112B. **Exp Physiol**, 77:761-764, 1992.
- BISLEY, J. W.; REES, S. M.; Mc KINLEY, M. J.; HARDS, D. K. & OLDFIELD, B. J. Identification of osmosensitive neurons in the forebrain of the rat: a Fos study at the ultrastructural level. **Brain Res**, 720: 25–34, 1996.
- BLIER, P.; PIÑEYROi, G.; EL MANSARI, M.; BERGERON, R.; DE MONTIGNY, C. Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. **Annals New York Academy of Sciences**, 861: 204–216, 1998.
- BLIER, P. & DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends Pharmacol. Sci.** 15: 220–226, 1994.
- BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. & CHAPUT, Y. A role for the serotonin system in the mechanism of action of antidepressant treatments: preclinical evidence. **J. Clin. Psychiatry** 51:14–20, 1990.
- BLIER, P. & DE MONTIGNY, C. Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT1A agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. **Synapse** 1: 470–480, 1987.
- BURNET, P. W. J.; EASTWOOD, S. L.; LACEY, K. The distribution of 5HT1A and 5-HT2A receptor mRNA in human brain. **Brain Res**, 676: 157–168, 1995.
- BOOTH, R. E.; JOHNSON, J. P. & STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Adv Physiol Educ**, 4: 8-20. 2002.
- BOSLEY & DESCARRIES, J. Monoamine innervation of the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT): a high resolution radioautographic study in the rat. **Comp Neurol**, 272:545-561, 1988.
- BRESLIN, P. A.; SPECTOR, A. C. & GRILL, H. J. Chorda tympani section decreases the cation specificity of depletion-induced sodium appetite in rats. **Am J Physiol**, 264:319-323. 1993.
- BUONINCONTI, R. The juxtaglomerular apparatus: physiopathology and clinical aspects of renin-angiotensin system. **Recenti Prog Med**, 41:81-165, 1966.
- CALLERA, J. C.; OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S.; DE LUCA, L. A. JR & MENANI, J. V. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, 134:725-735, 2005.
- CARAS, M. L.; MAKENZIE, K.; RODWIN, B.; KATZ, D. B. Investigating the motivational mechanism of altered saline consumption following 5-HT(1A) manipulation. **Behav. Neurosci**, 122:4007–4015, 2008.

CASANOVAS, M. J.; M. T. VILARO, M. T.; MENGOD, G & ARTIGAS, F. Differential regulation of somatodendritic serotonin 5-HT_{1A} receptors by 2-Week Treatments with the selective agonists alnespirone (S-20499) and 8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino)tetralin: microdialysis and autoradiographic studies in rat brain. **J Neurochem**, 72:262-272, 1999.

CASANOVAS, J. M.; LÉSOUD, M. & ARTIGAS, F. The effect of the selective 5-HT_{1A} agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. **Br J Pharmacol**, 122:733-41, 1997.

CAVALCANTE-LIMA, H. R.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; DE-LUCCA, J. R. W.; LIMA, H. R. C.; COSTA-e-SOUSA, R. H.; OLIVARES, E. L.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; REIS, R. O .; MEDEIROS, M. A.; CÔRTEZ, W. S. & REIS, L. C. Chronic excitotoxic lesion of dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Braz J Med Biol Res**, 38: 1669-1675. 2005^a.

CAVALCANTE-LIMA, H. R.; LIMA, H. R. C.; COSTA-e-SOUSA, R. H.; OLIVARES, E. L.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; REIS, R. O.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; DE-LUCCA, J. R. W.; MEDEIROS, M. A.; CÔRTEZ, W. S. & REIS, L. C. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neurosci Lett**, 374: 5-10, 2005b.

CLIFFE, I. A.; BRIGHTWELL, C. I.; FLETCHER, A.; FORSTER, E. A.; MANSELL, H. L.; REILLY, Y.; ROUTLEDGE, C. & WHITE, A. C. (S)-N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide [(S)-WAY-100135]: a selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. **J. Med. Chem**, 36:1509–1510, 1993.

COLOMBARI, D. S.; MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K.; Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am J Physiol**, 271:1470-6, 1996.

COOPER, S. J.; FRYER, M. J. & NEILL, J. C. Specific effect of putative 5-HT_{1A}, agonists, 8-OH-DPAT and gepirone, to increase hypertonic saline consumption in the rat. Evidence against a general hyperdipsic action. **Physiol Behav**, 43: 533-537, 1988.

COOPER, S. J. & CICCOCIO PPO R. Effect of selective 5-HT₁ agonists in water deprived rats on salt intake in two-choice tests. **Pharmacol Biochem Behav**, 45: 513-518, 1993.

DAVERN, P. J. & MCKINLEY, M. J. Forebrain regions affected by lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms that influence sodium appetite. **Brain Research**, 1339: 41 – 48, 2010.

DAVIS, J. O. & FREEMAN, R. H. Mechanisms regulating renin release. **Physiol Rev**, 56:1-56. 1976.

DE BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B.; VERESS, A.T. & SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats. **Life Science**, 28: 89–94, 1981.

DE GOBBI, J. I.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA, L. A. JR.; 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 GOBBI, J. I.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, R. F.; MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L. & JOHNSON A. K. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Res**, 1301:44-51. 2009.

- DICKINSON, K. M.; KEOGH, J. B. & CLIFTON, P. M. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. **Am J Clin Nutr**, 89:485-490, 2009.
- DUMAN, R. S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromol Med**, 5:11–26. 2004.
- FARGIN, A.; RAYMOND, J. R.; LOHSE, M. J.; KOBILKA, B. K.; CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. The genomic clone G-21 which resembles a β -adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. **Nature** 335:358–360, 1988.
- FERREIRA, D. M. & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of dorsal raphe nucleus 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs. *Brain Research* 1285: 69 – 76, 2009.
- FITTS, D. A. Angiotensin II receptors in SFO but not in OVLT mediate isoproterenol-induced thirst. *Am. J. Physiol*, 267: 7–15, 1994.
- FITTS, D. A.; Tjepkes, D. S.; BRIGHT, R. O. Salt appetite and lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. **Behav. Neurosci**, 104: 818–827, 1990.
- FITTS, D. A. & MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav Neurosci**, 103:865-872, 1989.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, 78: 583-686, 1998.
- FITZSIMONS, J. T. Physiology and Pathology of thirst and sodium appetite. In: SELDIN DW; GIEBISCH G (Eds). **The kidney: physiology and pathophysiology**. New York: Raven Press, P 885-901,1985.
- FLETCHER, A.; BILL, D. J.; BILL, S. J.; CLIFFE, I. A.; DOVER, G. M.; FORSTER, E. A.; HASKINS, J. T.; JONES, D.; MANSELL, H. L. & REILLY, Y. WAY100135: a novel, selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. **Eur J Pharmacol**, 24: 283-291, 1993.
- FRANK, M. J.; CONTRERAS, R. J. & HEITTINGER, T. P. Nerves fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. **J Neurophysiol**, 50: 941-960, 1983.
- FRANCHINI, L. H.; JOHNSON, A. K. & VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **American Journal of Physiology**, 282: 235-243, 2002.
- FRANCHINI, L.F. & VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am. J. Physiol**, 276: 1180–1187, 1999.
- FONSECA, F.V.; MECAWI, A.S.; ARAUJO, I. G.; ALMEIDA-PEREIRA, G.; MAGALHÃES-NUNES, A. P.; BADAUÊ-PASSOS, D Jr. & REIS LC. 2009. Role of the 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptor in the dorsal raphe nucleus on salt satiety signaling in rats. **Exp. Neurology**, 217: 353-360, 2009.
- FULWILER, C. E. & SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res**, 319:229-59, 1984.

- GARTSIDE, S. E.; UMBERS, V.; HAJOS, M. & SHARP, T. Interaction between a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist and a SSRI in vivo: Effects on 5-HT cell firing and extracellular 5-HT. **Br J Pharmacol**, 115:1064–1070, 1995.
- GANTEN, D. & STOCK, G. Humoral and neurohormonal aspects of blood pressure regulation: focus on angiotensin. **Klin Wochenschr**, 1:31-41. Review. 1978.
- GEERLIN, J. C. & LOEWY, A. D. Central regulation of sodium appetite. **Exp Physiol**, 93:178–209. 2008.
- GINGRICH, J. A. & AND HEN, R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. **Psychopharmacology**, 155:1–10. 2001.
- GOLDIN, A. L.; BARCHI, R. L.; CALDWELL, J. H.; HOFMANN, F.; HOWE, J. R.; HUNTER, J. C. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, 28: 365–368, 2000.
- GODINO, A.; MARGATHO, L. O; CAEIRO, X. E.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & VIVAS, L. Activation of lateral parabrachial afferent pathways and endocrine responses during sodium appetite regulation. **Exp Neurol**, 221:275-284, 2009.
- GODINO, A.; DE LUCA, LA, JR.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & VIVAS, L. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 293:1027-1036, 2007.
- GOGOS, A.; KUSLJIC, S. & VAN DEN BUUSE, M. 8-OH-DPAT-induced effects on prepulse inhibition: pre- vs. post-synaptic 5-HT_{1A} receptor activation. **Pharmacol Biochem Behav**. 81:664-72, 2005.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G. & DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, 54:129-141, 1996.
- GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacol Ther**, 65:319-395, 1995.
- GRIGNASCHI, G.; INVERNIZZI, R. W.; FANELLI, E.; FRACASSO, C.; CACCIA, S. & SAMANIN, R. Citalopram-induced hypophagia is enhanced by blockade of 5-HT_{1A} receptors: Role of 5-HT_{2C} receptors. **Br J Pharmacol**, 124:1781–1787, 1998.
- HAMILTON, R. B. & NORGRÉN, R. Central projections of gustatory nerves in the rat. **J Comp Neurol**, 222:560-577, 1984.
- HARIKUMAR, K. G.; JOHN, P. T. & CHATTOPADHYAY, A. Role of disulfides and sulfhydryl groups in agonist and antagonist binding in serotonin_{1A} receptors from bovine hippocampus. **Cell Mol Neurobiol**, :665-681, 2000
- HARIKUMAR, K. G. & CHATTOPADHYAY, A. Modulation of agonist and antagonist interactions in serotonin 1A receptors by alcohols. **FEBS Lett**, 438: 96-100, 1998.
- HARTLEY, J. E. & FLETCHER, A. The effects of WAY-100135 and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin on feeding in the rat. **Eur J Pharmacol**, 252: 329-332, 2004.

- HASHIMOTO, S.; INOUE, T. & KOYAMA, T. Effects of the coadministration of 5-HT_{1A} receptor antagonists with a SSRI in conditioned fear stress- induced freezing behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, 58:471–475, 1997.
- HERBERT H, MOGA MM, SAPER CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, 293:540-80, 1990.
- HERVAS, I.; VILARO, M. T.; ROMERO, L.; SCORZA, M. C.; MENGOD, G. & ARTIGAS, F. Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY- 100635. **Neuropsychopharmacology**, 24:11–20., 2001.
- HJORTH, S.; BENGTSSON, H.J.; KULLBERG, A.; CARLZON, D.; PEILOT, H. & AUERBACH, S.B. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. **J. Psychopharmacol**, 14, 177–185, 2000.
- HOEBEL, B. G.; HERNANDEZ, L.; SCHAWARTZ, D. H.; MARK, G. P. & HUNTER, G. A. Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications. **Ann N Y Acad Sci**, 575:171–193. 1989.
- HUTSON, P.H.; SARNA, G.S.; O'CONNEL, M.T. & CURZON, G. Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OHDPAT into the nucleus raphe dorsalis. **Neurosci. Lett**, 100, 276–280, 1989.
- INVERNIZZI, R.; CARLI, M.; DI CLEMENTE, A. & SAMANIN, R., 1991. Administration of 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino) tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: differences in potency and regional sensitivity. **J. Neurochem**, 56, 243–247, 1991.
- JACOBS, B. L. & AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev**, Jan;72:165-229, 1992.
- JOHNSON, A. K. & THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, 18:292-353, 1997.
- JOHNSON, A. K. & GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEB J** 7, 678–686. 1993.
- LANÇA, A. J. & VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, 14:1117-26, 1985.
- LEHR, D.; MALLOW, J. & KRUKOWSKI, M. J. Copious drinking and simultaneous inhibition of urine flow elicited by beta-adrenergic stimulation and contrary effect of alpha-adrenergic stimulation. **Pharmacol Exp Ther**, 158:150-163, 1967
- LESHEMA, M.; KAVUSHANSKYA, A.; DEVYSB, J. M. & THORNTONB, C. S. Enhancement revisited: the effects of multiple depletions on sodium intake in rats vary with strain, substrain, and gender. **Physiology & Behavior** 82) 571– 580. 2004.
- LIND, R. W. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. **Brain Res**, 384:250-261, 1986.

- LU, B.; YANG, X. J.; CHEN, K.; YANG, D. J. & YAN, J. Q. Dietary sodium deprivation evokes activation of brain regional neurons and down-regulation of angiotensin II type 1 receptor and angiotensin-conversion enzyme mRNA expression. **Neuroscience**, 164: 1303-1311, 2009.
- KALIPATNAPU, S.; PUCADYIL, T. J.; HARIKUMAR, K. G. & CHATTOPADHYAY, A. Ligand binding characteristics of the human serotonin1A receptor heterologously expressed in CHO cells. **Biosci Rep**, 24:101-115, 2004.
- KATER, C. E.; BIGLIERI, E. G.; BRUST, N.; CHANG, B. & HIRAI, J. Regulation of the mineralocorticoid hormones in adrenocortical disorders with adrenocorticotropin excess. **Clin Exp Hypertens A**. 10:1749-58. 1982.
- KELLEY, A. E. Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors. **Ann NY Acad Sci**, 877:71–90, 1999.
- KIA, H. K.; BRISORGUEIL, M. J. & HAMON, M. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine1A receptors in rat brain. **J. Neurosci. Res**. 46: 697–708. 1996.
- KIM, S. M.; CHEN, L.; FAULHABER-WALTER, R.; OPPERMANN, M.; HUANG, Y.; MIZEL, D.; BRIGGS, P. J. & SCHNERMANN, J. Regulation of Renin Secretion and Expression in Mice Deficient in β 1- and β 1-Adrenergic Receptors. **Hypertension**, 50:103-109, 2007.
- KLUSSMANN, E.; MARIC, K. & ROSENTHAL, W. The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 141:33-95. 2000.
- KREISS, D. S. & LUCKI I. Chronic administration of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT differentially desensitizes 5-HT1A autoreceptors of the dorsal and median raphe nucleus. **Synapse**, 25:107–116. 1997.
- KOBILKA, B. K.; FRIELLE, T.; COLLINS, S.; YANG-FENG, T.; KOBILKA, T. S.; FRANCKE, U.; LEFKOWITZ, R. J. & CARON, M. G. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **Nature**, 329:75–79. 1987.
- LESHEM, M.; KAVUSHANSKY, A.; DEVYS, J. M. & THORNTON, S. Enhancement revisited: the effects of multiple depletions on sodium intake in rats vary with strain, substrain, and gender. **Physiol Behav**, 82:571-580, 2004.
- LEHR, D.; MALLOW, J. & KRUKOWSKI, M. J. Copious drinking and simultaneous inhibition of urine flow elicited by beta-adrenergic stimulation and contrary effect of alpha-adrenergic stimulation. **Pharmacol Exp Ther**, 158:150-163, 1967.
- LIND, R. W. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. **Brain Research**, 384: 250-261,1986.
- LU, B.; YANG, X. J.; CHEN, K.; YANG, D. J. & YAN, J. Q. Dietary sodium deprivation evokes activation of brain regional neurons and down-regulation of angiotensin II type 1 receptor and angiotensin-conversion enzyme mRNA expression. **Neuroscience**, 164: 1303-11. 2009.
- MAGALHÃES-NUNES, A. P.; BADAUÊ-PASSOS, Jr. D.; VENTURA, R. R.; GUEDES, Jr. D. S.; ARAÚJO, J. P.; GRANADEIRO, P. C.; MILANEZ-BARBOSA, H. K.; COSTA-e-SOUSA, R. H.; MEDEIROS, M. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & REIS, L. C. Sertraline, a selective

serotoninreuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. **Exp Physiol**, 92: 913-922, 2007.

MARGATHO, L. O.; GIUSTI-PAIVA, A.; MENANI, J. V.; ELIAS, L. L.; VIVAS, L. M. & ANTUNESRODRIGUES, J. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus in renal and hormonal responses to isotonic blood volume expansion. **Am J Physiol**, 297: 1190-1197. 2007.

MARGATHO, L. O.; GODINO, A.; OLIVEIRA, F. R.; VIVAS, L. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Lateral parabrachial afferent areas and serotonin mechanisms activated by volume expansion. 2008. **Journal of Neuroscience Research**, 86:3613–3621, 2008.

MCKINLEY, M. J.; ALLEN, A. M.; MAY, C. N.; MCALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; SLY, D. & MENDELSON, F. A. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 28 :990-992, 2001.

MCKINLEY, M. J.; DENTON, D. A.; LEVENTER, M.; MISELIS, R. R.; PARK, R. G.; TARJAN, E.; SIMPSON, J. B. & WEISINGER, R. S. The Physiology of Thirst and Sodium Appetite. **New York: Plenum**, p. 321, 1986.

MCKINLEY, M. J.; DENTON, D. A. & WEISINGER, R. S. Sensors for antidiuresis and thirst-osmoreceptors or CSF sodium detectors? **Brain Res**, 141: 89–103, 1978.

MENANI, J. V.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA, L. A. JR.; DE GOBBI, J. I. & JOHNSON, A. K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **Am J Physiol**, 282:837-841, 2002.

MENANI, J. V.; COLOMBARI, D. S.; BELTZ, T. G.; THUNHORST, R. L. & JOHNSON, A. K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res**, 801: 29-35, 1998a.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. JR. & JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am J Physiol**, 274: 555-560, 1998b.

MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L. & JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, 270: 162-168, 1996.

MENANI, J. V & JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am J Physiol**, 1044-1049, 1995.

MECAWI, A. S.; LEPLETIER, A.; ARAUJO, I.G. FONSECA, F.V. & REIS, L.C. Oestrogenic influence on brain AT1 receptor signalling on thirst and salt appetite in osmotic-stimulated and sodium-depleted rats. **Exp. Physiol**. 93, 1002–1010. 2008.

MONTES & JOHNSON (1990)

MORRIS, M.J.; NA, E.S. & JOHNSON, A.K. Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiol. Behav**, 94, 709–721, 2008.

- MITCHELL, P. J. & REDFERN, P. H. Potentiation of the time-dependent, antidepressant-induced changes in the agonistic behaviour of resident rats by the 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. **Behav Pharmacol**, 8: 585–606, 1997.
- NAHMOD, V. E.; FINKIELMAN, S.; BENARROCH, E. E. & PIROLA, C. J. Angiotensin regulates release and synthesis of serotonin in brain. **Am Ass Adv Scien**, 4372: 1091-1093, 1978.
- NESTLER, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. **Neuropharmacology**, 1:24-32, 2004.
- NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H.; BUNCAN, M.; DUMAN, R. S.; GRESHENFELD, H. K.; HEN, R.; KOESTER, S.; LEDERHENDLER, I.; MEANEY, M.; ROBBINS, T.; WINSKY, L. & ZALCMAN, S. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**, 52:503-528, 2002.
- NICHOLAS, M.; BARNES & TREVOR SHARP. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, 38:1083–1152, 1999.
- NICOLL, R. A.; MALENKA, R. C. & KAUER, J. A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. **Physiol Rev**, 70:513-565, 1990.
- NODA, M. Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. **Exp Physiol**, 92.3 pp 513–522, 2007.
- OHMAN, L. E. & JOHNSON, A. K. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and Isoproterenol. **AmJ. Physiol**, 256: 264-269, 1989.
- OLDFIELD, B. J. & MCKINLEY, M. J. Circunventricular organs. In Paxinos G. The rat Nervous System. San Diego: **Academic Press**, P 391-403. 1995.
- OLIVARES, E. L.; COSTA-E-SOUSA, R. H.; CAVALCANTE-LIMA, H. R.; LIMA, H. R.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L. & REIS, L.C. 2003. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36, 1709–1716. 2003.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press, London**. 1986.
- PEART, W. S. Renin 1978. **Johns Hopkins Med J**, 143:193-206, 1978.
- PEREIRA, D. T.; MENANI, J. V. & DE LUCA, LA. JR. FURO/CAP: a protocol for sodium intake sensitization **Physiol Behav**, 994:472-81, 2010.
- PIMENTA, E.; GADDAM, K. K.; ABAN, S. O. I.; DELL'ITALIA, S. H. L. J. & CALHOUN, D. A. Effects of Dietary Sodium Reduction on Blood Pressure in Subjects With Resistant **Hypertension**, 54:475-481, 2010.
- POULSEN, K. Radioimmunoassay of the components of the renin-angiotensin system. **Dan Med Bull**, 17:193-198, 1970.
- POW, D. V. Neuropeptide accretions in the endoplasmic reticulum of oxytocinergic neurons in cats, monkeys and rabbits: a widespread phenomenon. **J Anat**, 181:161-7, 1992.

- RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T. W.; GREWAL, J. S. & GARNOVSKAYA, M. N. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol Ther**, 92:179-212, 2001
- RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GETTYS, T. W. & GARNOVSKAYA, M. N. The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signaling pathways. **Br. J. Pharmacol**, 127:1751–1764, 1999.
- REIS, L. C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **An Acad Bras Cienc** 79: 261-283. 2007.
- REIS, L. C.; RAMALHO, M. J.; FAVARETTO, A. L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M. ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proc Nat Acad Sci USA** 91: 12022-12026. 1994.
- REIS, L. C.; RAMALHO, M. J. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Brain serotonergic stimulation reduces the water intake induced by systemic and central beta-adrenergic administration. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25: 529-536, 1992.
- REIS, L. C.; RAMALHO, M. J. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control. *Braz J M Biol Res*, 24: 633-641, 1991.
- REIS, L. C.; RAMALHO, M. J. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by angiotensin II and carbachol in normally hydrated rats. Effect of intracerebroventricular injection of MK-212. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23: 1339-1342, 1990.
- REIS, W. L.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A.; ELIAS, L. L. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Central nitrenergic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. **Behav Brain Funct**, 6:64. 2010.
- RETTIG, R.; GANTEN, D. & JOHNSON, A. K. Isoproterenol-induced thirst: renal and extrarenal mechanisms. **Am J Physiol**. 241:152-157. 1981.
- ROITMAN, M. F.; PATTERSON, T. A.; SAKAI, R. R.; BERNSTEIN, I. L. & FIGLEWICZ, D. P. Sodium depletion and aldosterone decrease dopamine transporter activity in nucleus accumbens but not striatum. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 276:1339–1345. 1999.
- RIAD, M.; WATKINS, K.C.; DOUCET, E.; HAMON, M. & DESCARRIES, L. Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). **Journal of Neuroscience**, 21: 8378–8386, 2001.
- RICARDO, J. A. & KOH, E. T. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*, 153:1–26, 1978.
- ROUAH-ROSILIO, M.; OROSCO, M. & NICOLAIDIS, S. Serotonergic modulation of sodium appetite in the rat. **Physiol Behav**, 55:811-816, 1994.
- SADOWSKA, H & KOCHANOWSKA, K. A review of the present knowledge of the renin-angiotensin-aldosterone system. **Endokrynol Pol**, 17:423-431, 1966.

- SAKAI, R.R.; Ma, L.Y.; ZHANG, D. M.; McEWEN, B. S. FLUHARTY, S.J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendocrinology**, 64:425-429. 1996.
- SACKS, F. M.; SVETKEY, L. P.; VOLLMER, W. M.; APPEL, L. J.; BRAY, G. A.; HARSHA, D.; OBARZANEK, E.; CONLIN, P. R.; MILLER, E. R 3RD.; SIMONS-MORTON, D. G.; KARANJA, N. & LIN, P. H. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. **N Engl J Med**, 344:3–10, 2001.
- SAKAI, R. R. & EPSTEIN, A. N. Dependence of adrenalectomy-induced sodium appetite on the action of angiotensin II in the brain of the rat. **Behav Neurosci**, 104:167-76, 1990.
- SAPER, C. B. & LOEWY, A. D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res**, 197:291–317, 1980.
- SAWCHENKO, P. E. SWANSON, L. W.; STEINBUSCH, H. W. & VERHOFSTAD, A. A. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Brain Res**, 277:355-60, 1983.
- SCHECHTER, L. E.; BOLANOS, F. J.; GOZLAN, H.; LANFUMEY, L.; HAJ-DAHMANE S.; LAPORTE, A. M.; FATTACCINI C. M. & HAMON, M. Alterations of central serotonergic and dopaminergic neurotransmission in rats chronically treated with ipsapirone: biochemical and electrophysiological studies. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 255: 1335–1347, 1990.
- SCHIFFRIN, E. L. & GENEST, J. Mechanism of captopril-induced drinking. **Am J Physiol**, 242:136–140. 1982.
- SCHMID, C.; CASTROP, H.; REITBAUER, J.; DELLA, B. R. & KURTZ, A. Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression. **Hypertension**, 29:923–929, 1997.
- SCHOEFFTER, P.; BOBIRNAC, I.; BODDEKE, E. & HOYER, D. Inhibition of cAMP accumulation via recombinant human serotonin 5-HT_{1A} receptors: considerations on receptor effector coupling across systems. **Neuropharmacology**, 36:429-437, 1997
- SHIMIZU, H.; WATANABE, E.; HIYAMA, T. Y.; NAGAKURA, A.; FUJIKAWA, A.; OKADO, H.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K. & NODA, M. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. **Neuron**, 54: 59-72, 2007.
- SMITH, D. W. & DAY, T. A. Hypovolaemic and osmotic stimuli show distinct patterns of c-Fos expression in the rat subfornical organ. **Brain Res**, 698: 232–236, 1995a.
- SMITH, A. M. Z. & JOHNSON, A. K. Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat. **Neurosci Lett**, 199: 215–219, 1995b.
- SOTELO, C.; CHOLLEY, B.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H. & HAMON, M. Direct Immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the brain raphe nuclei. **Eur. J. Neurosci**, 2: 1144–1154, 1990.

- SPROUSE, J.S. & AGHAJANIAN, G.K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. **Synapse**, 1: 3–9, 1987.
- STEIN, J. M.; LIND, R. W.; & JOHNSON, A. K.; Central serotonergic influences on renal electrolyte and water excretion. **Neuropharmacology**, 26: 1685-1692. 1987.
- STEINBUSCH, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, 6:557-618, 1981.
- STOCKER, S. D.; STRICKER, E. M. & SVED, A. F. Acute hypertension inhibits thirst stimulated by ANG II, hyperosmolality, or hypovolemia in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 280:214-224, 2001.
- SUNN, N.; MCKINLEY, M. J. & OLDFIELD, B. J. Circulating angiotensin II activates neurones in circumventricular organs of the lamina terminalis that project to the bed nucleus of the stria terminalis. **J Neuroendocrinol**, 15:725–731. 2003.
- SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E.; SOBOCIŃSKA, J & SADOWSKI, B. Central dipsogenic effect of vasopressin. **Am J Physiol**, 242:R372-379,1982.
- TANAKA J, USHIGOME A, HORI K. & NOMURA M. Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Research Bulletin**, 45: 315-318. 1998.
- TANAKA, J.; USHIGOME, A.; HORI, K. & NOMURA, M. Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Research Bulletin**, 45: 315-318, 1998.
- TURNOFF, D. & ROWNTREE, L. G. Specificity of renin. **Science**, 93:281. 1941.
- THUNHORST, R. L.; XU, Z.; CICHA, M. Z.; ZARDETTO-SMITH, A. M. & JOHNSON, A. K. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am J Physiol**, 1274 :1807-1814. 1998.
- THUNHORST, R. L.; MORRIS, M. JOHNSON, A. K.; Endocrine changes associated with a rapidly developing sodium appetite in rats. **Am J Physiol**, 267:1168-73. 1994.
- THUNHORST, R. L.; FITTS, D. A. & SIMPSON, J. B. Angiotensin-converting enzyme in subfornical organ mediates captopril-induced drinking. **Behav Neurosci**, 103:1302-1310. 1989.
- THUNHORST, R. L. & JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **Am J Physiol**, 266:458-465, 1994.
- TIGERSTEDT, R. & BERGMAN, P. Niere und kreislauf. **Arch. Physiol**, 8: 223–271, 1898.
- TRILLAT, A. C.; MALAGIÉ, I. MATHE-ALLAINMAT, M. ANMELLA, M. C.; JACQUOT, C.; LANGLOIS, M. & GARDIER, A. M. Synergistic neurochemical and behavioral effects of fluoxetine and 5-HT_{1A} receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, 357:179–184. 1998
- TWAROG, B. M. & PAGE, I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **Am. J. Physiol.** 175:157–161. 1953.

- VENTURA, R. R.; GIUSTI-PAIVA, A.; GOMES, D. A.; ELIAS, L. L. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. **Neurosci Lett**, 379:75-80, 2005.
- VERBALIS, J. G.; BLACKBURN, R. E.; HOFFMAN, G. E. & STRICKER, E. M. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. **Adv Exp Med Biol**, 395:209-225. 1995.
- VILLA, P. de S.; CAMARGO, G. M.; CAMARGO, L. A. & SAAD, W. A. Activation of paraventricular nucleus of hypothalamus 5-HT_{1A} receptor on sodium intake. **Regul Pept**, 140:142-7. 2007.
- WAGNER, C. KEES, F.; KRÄMER, B. K. & KURTZ, A. Role of sympathetic nerves for the stimulation of the renin system by angiotensin II receptor blockade. **J Hypertens**, 15:1463-1469, 1997.
- WALTHER, D. J.; PETER, J. U.; BASHAMMAKH, S.; HORTNAGL, H.; VOITS, M. & FINK, H. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, 299:76, 2003.
- WATANABE, E.; FUJIKAWA, A.; MATSUNAGA, H.; YASOSHIMA, Y.; SAKO, N.; YAMAMOTO, T.; SAEGUSA, C. & NODA M. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **J Neurosci**, 20: 7743–7751. 2000.
- WEISINGER, R. S.; DENTON, D. A.; MCKINLEY, M.J & NELSON, J. F. Dehydration-induced sodium appetite in rats. **Physiol Behav**, 34:45-50, 1985.
- WEISINGER, R. S.; DENTON, D. A.; DI NICOLANTONIO, R.; HARDS, D. K.; MCKINLEY, M. J.; OLDFIELD, B. & OSBORNE, P. G. Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. **Brain Res**, 526: 23-30, 1990.
- WEISS, M. L. & HATTON, G. I. Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. I. Afferents from the subfornical organ and the anteroventral third ventricle region. **Brain Res Bull** 24:231–238, 1990.
- ZARDETTO-SMITH, A. M. & WATSON, C. A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. **Neurosci.Lett**. 80:163–166; 1987.
- ZIFA, E. & FILLION, G. 5-Hydroxytryptamine receptors. **Pharmacol Rev**. 144:401-458. 1992.