



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INTERAÇÃO ENTRE VIAS GABAÉRGICAS E ANGIOTENSINÉRGICAS COM AS
VIAS OPIOIDÉRGICAS NO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO SOBRE O
CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO**

LUCINEZ SOUZA SILVA

SALVADOR – BAHIA

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**INTERAÇÃO ENTRE VIAS GABAÉRGICAS E ANGIOTENSINÉRGICAS COM AS
VIAS OPIOIDÉRGICAS NO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO SOBRE O
CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO**

Orientadora: Prof^a Dr.^a Josmara Bartolomei Fregoneze

LUCINEZ SOUZA SILVA

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia Humana
para obtenção do grau Mestre.

SALVADOR – BAHIA

2017

**"INTERAÇÃO ENTRE VIAS GABAÉRGICAS E ANGIOTENSINÉRGICAS COM VIAS AS
OPIOIDÉRGICAS NO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO SOBRE O CONTROLE DO APETITE POR
SÓDIO"**

LUCINEZ SOUZA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 29 de janeiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Rejane Conceição Santana
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Fernando Luis Queiroz Carvalho
Professor Titular
UNEB



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze
Professora Titular
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq

Aos meus amores, que não apenas sonham junto comigo, mas que fazem a diferença e assim vamos transformando sonhos em planos e planos em conquistas.

À Deus que sempre guiou o meu caminho, e me presenteia a cada dia com Sua presença, me fortalecendo e tornando possível a realização da caminhada;

Ao meus pais, Sebastião e Valdeci, eles que sempre quiseram o melhor para mim, me ensinaram e a todo tempo me incentivam a buscar novos conhecimentos;

À Deócia, Lúcia, Luzinete e Márcia, as melhores irmãs do mundo;

Aos sobrinhos Keylla Mara e Olavo, pelo encanto do existir e despertar em mim, mais uma forma de amor, amor de tia;

À Raimundo Manoel, meu companheiro pelo apoio incondicional, por sonhar e construir os meus sonhos comigo, por deixar a vida mais leve e divertida;

A todos os amigos e outros familiares, que não citarei os nomes não por serem menos importantes, mas para que não cometa a injustiça de esquecer algum;

À Ana Isabel minha “madrinha de mestrado”;

À minha querida professora Josmara Bartolomei Fregonese, por me acolher, pela paciência, orientação e incentivo. Agradeço seu exemplo de profissionalismo, força e paixão pela pesquisa e pela academia.

À Átila, Diana, Andrei e Daniele, meus amigos da pós-graduação, e como sou grata por poder chamá-los de amigos e não apenas de colegas;

A todos os professores, pós-graduandos e alunos de iniciação científica do Laboratório de Neurociências, àqueles que ainda permanecem e àqueles que já estão seguindo outros caminhos;

Ao bioterista José de Souza, pelo cuidado não só com os animais, mas com cada integrante do laboratório aos quais sempre cuidou com gentileza, carinho e disponibilidade;

Ao CPqGM e seus funcionários, em especial a Coordenação de Ensino da Pós Graduação em Patologia Humana e a Biblioteca.

A todos que fazem, participam ou fizeram parte de minha existência.

Muito Obrigada!

“As grandes ideias surgem da observação dos
pequenos detalhes.”

Augusto Cury

SILVA, Lucinez Souza. Interação entre vias GABAérgicas e angiotensinérgicas com as vias opioidérgicas no núcleo pré-óptico mediano sobre o controle do apetite por sódio. 60 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos têm mostrado a participação dos opióides em muitas funções fisiológicas, dentre elas, na modulação do apetite por sódio. Este comportamento é desencadeado por um desequilíbrio hidromineral e busca restaurar a homeostase dos líquidos corporais. Diversas áreas do sistema nervoso central estão envolvidas neste comportamento. O núcleo pré-óptico mediano é um núcleo integrativo envolvido no controle da ingestão de sódio. **OBJETIVO:** Investigar o papel dos receptores mu-opiíides no núcleo pré-óptico mediano no controle do apetite por sódio em ratos depletados desse íon. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratos Wistar, portando cânula guia no núcleo pré-óptico mediano, foram submetidos a depleção de sódio e após 24 horas receberam microinjeções de naloxona (3, 6 e 12 nmol) ou salina e a ingestão de salina hipertônica e água foram mensuradas. Para verificar a interação entre as vias GABAérgicas e opioidérgicas no controle do apetite por sódio foi realizado um segundo grupo experimental no qual os animais receberam microinjeções de bicuculina (2nmol) e 15 minutos depois naloxona (12 nmol). Para verificar a interação entre as vias angiotensinérgicas e opioidérgicas no controle do apetite por sódio, foi realizado o terceiro grupo experimental no qual os animais normonatremicos foram tratados com naloxona (12 nmol) e após 15 minutos receberam microinjeções de angiotensina II (10µg). Além disso, foram realizados os testes “de sobremesa” e “campo aberto” para verificar especificidade da inibição e atividade locomotora dos animais, respectivamente. **RESULTADOS:** A naloxona foi capaz de inibir a ingestão de sódio em animais depletados deste íon. O efeito antinatriorexigênico da naloxona foi reduzido pelo antagonista GABAérgico bicuculina. O bloqueio dos receptores mu-opiíides também inibiu a ingestão de sódio induzida pela angiotensina II. Estes efeitos não são devidos a um impedimento locomotor desde que no teste de campo aberto os animais tratados com naloxona tiveram atividade semelhante ao controle. A inibição da ingestão de sódio pode, ao menos em parte ser explicada pela redução da palatabilidade como foi observado no teste de sobremesa. **CONCLUSÃO:** Os receptores mu-opiíides presentes no núcleo pré-óptico mediano são importantes no controle do apetite por sódio e o possível mecanismo de ação parece envolver tanto vias GABAérgicas, quanto angiotensinérgicas.

Palavras-chaves: Apetite por sódio; Núcleo pré-óptico mediano; Depleção de sódio; Receptores Mu-Opiíides; Opiíides; Naloxona.

SILVA, Lucinez Souza. Interaction between GABAergic and angiotensinergic pathways with the opioidergic pathways in the pre-optic nucleus median on the control of sodium appetite. 60 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Studies have shown the participation of opioids in many physiological functions, among them, in the modulation of sodium. This behavior is triggered by a hydro mineral imbalance and seeks to restore the homeostasis of body fluids. Several areas of the central nervous system are involved in this behavior. The median pre-optic nucleus is an integrative nucleus involved in the control of sodium intake. **OBJECTIVE:** The main objective of this study was to investigate the role of mu-opioid receptors in median pre-optic nucleus on the control of sodium appetite in depleted mice of this ion. **MATERIALS AND METHODS:** Wistar rats, carrying guide cannula in median pre-optic nucleus, were submitted to sodium depletion and after 24 hours received microinjections of naloxone (3, 6 e 12 nmol) or saline and saline and water intake were measured. To verify the interaction between the gabaergic and opioidergic pathways in the control of sodium appetite, the second experimental group was carried in which the animals received microinjections of bicuculline (2nmol) and 15 minutes later naloxone (12nmol). To verify the interaction between the angiotensinergic and opioidergic pathways in the control of sodium appetite, the third experimental group was carried in which normonatremic animals were treated with naloxone (12 nmol) and after 15 minutes received microinjections of angiotensin II (10 µg). In addition, the "dessert" and "open field" tests were also carried to verify, respectively specificity of the inhibition and locomotor activity of the animals. **RESULTS:** The naloxone was able to inhibit sodium intake in animals depleted of this ion. The antinatriorexigenic effect of naloxone was reduced by the GABAergic antagonist bicuculline. Blockade of mu-opioid receptors also inhibited sodium intake induced by the angiotensin II. These effects are not due to a locomotor impairment since in the open field test animals treated with naloxone had activities similar to the control. Inhibition of sodium intake may, at least in part, be explained by the reduction in palatability as observed in the dessert test. **RESULTS:** It can be concluded that the mu-opioid receptors present in the median pre-optic nucleus are important in the control of sodium appetite and the possible mechanism of action involves both GABAergic and angiotensinergic pathways.

Keywords: Sodium appetite; median pre-optic nucleus; sodium depletion; mu-opioid receptors; opioids; naloxone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Mecanismo de sinalização das células da glia para os neurônios.....	17
Figura 02. Representação esquemática das estruturas precursoras de proteínas das três famílias dos opióides clássicos.....	21
Figura 03. Eventos intracelulares que ocorrem após a ligação de um agonista opióide a um receptor opióide acoplado a proteína G.....	23
Figura 04. Fotomicrografia típica e diagrama (Watson & Paxinos, 1998) mostrando local da microinjeção no MnPO.....	34
Figura 05. Efeito de microinjeções de naloxona no MnPO sobre a ingestão cumulativa de salina 1,5% e água em animais depletados de sódio.....	36
Figura 06. Efeito de microinjeções de naloxona associado com bicuculina no MnPO sobre a ingestão cumulativa de salina 1,5% e água em animais depletados de sódio.....	38
Figura 07. Efeito de microinjeções de Angiotensina II no MnPO sobre a ingestão cumulativa de salina 1,5% e água em animais normoanatrômico...	40
Figura 08. Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções de naloxona 12nmol ou salina 0,9% no MnPO...	41
Figura 09. Teste de campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de naloxona 12nmol ou salina 0,9% no MnPO....	42
Figura 10. Diagrama esquemático indicando possíveis interações entre as vias GABAérgicas Angiotensinérgicas e opioidérgicas na ingestão específica desódio.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AII	Angiotensina II
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AP	Área Postrema
AS	Área septal
ATP	Adenosina trifosfato
A3V3	Região anteroventral do terceiro ventrículo
CEA	Núcleo central da amígdala
DAMGO	([D-Ala(2), N-Me-Phe(4), Gly(5)-ol] - encefalina) Agonista μ -opióide
DOP	Receptor peptídico opióide delta
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
IP	Intraperitoneal
K+	Potássio
KOP	Receptor peptídico opióide kappa
LEC	Compartimento líquido extracelular
LIC	Compartimento líquido intracelular
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
ME	Eminência média
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
MOP	Receptor peptídico opióide mu
NA+	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NAx	Canais sensíveis à variação de sódio
NOP	Receptor peptídico FQ de nociceptinas orfanina
NTS	Núcleo do trato solitário
OCVs	Órgãos circunventriculares
OP1	Receptor delta-opióide
OP2	Receptor kappa-opióide
OP3	Receptor mu-opióide
OSF	Órgão subfornical
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
S.C	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
5HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
5HT _{2a/2c}	Receptor serotoninérgico do tipo 2a e 2c

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	HOMEOSTASIA HIDROSSALINA	13
2.2	MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DO APETITE POR SÓDIO .	15
2.3	OPIÓIDES E SISTEMAS EFETORES.....	21
2.4	OPIÓIDES E INGESTÃO DE SAL.....	24
3	HIPÓTESES	26
3.1	HIPÓTESE TESTE (H1):.....	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	ANIMAIS	28
5.2	CÁLCULO AMOSTRAL	28
5.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	28
5.4	DROGAS E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	29
5.5	HISTOLOGIA	29
5.6	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	30
5.6.1	<i>Depleção de Sódio</i>	30
5.6.2	<i>Protocolo do Teste de Sobremesa</i>	30
5.6.3	<i>Protocolo do Teste do Campo Aberto</i>	31
5.7	DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	31
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
7	RESULTADOS	35
8	DISCUSSÃO	44
9	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os mamíferos mantêm a homeostasia dos líquidos corporais, regulando a concentração de água e eletrólitos nos compartimentos intra e extracelular. Essa regulação é mantida basicamente através do controle da ingestão e da excreção de água e eletrólitos, especialmente do sódio, que é o principal determinante da osmolaridade plasmática. A osmorregulação é de extrema importância, pois alterações nos volumes celulares decorrentes de hipotonicidade ou hipertonicidade podem causar sérias complicações neurológicas e cardiovasculares (NODA; SAKUTA, 2013; HURLEY; JOHNSON, 2015).

Alterações na homeostasia são detectadas pelo sistema nervoso central através de receptores periféricos e centrais. Uma vez detectadas, as mudanças na concentração plasmática de sódio desencadearão um conjunto de respostas para restabelecer as condições fisiológicas normais (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004a; DOS SANTOS MOREIRA et al., 2017). Diversos estudos mostram o envolvimento das vias de neurotransmissão central angiotensinérgica, serotoninérgica, GABAérgica, histaminérgica, colinérgica e adrenérgica no controle da homeostasia hidrossalina (SAAD et al., 1994; LUZ et al., 2006; LUZ et al., 2007; HENRY et al., 2009; MAGRINI et al., 2006). Em relação às vias opioidérgicas, os estudos são voltados para investigação do papel destas vias no controle da ingestão alimentar (GLASS; BILLINGTON; LEVINE, 1999; ZHANG; KELLEY, 2002; HANLON et al., 2004; GOSNELL; LEVINE, 2009; NOGUEIRAS et al., 2012) e são poucos estudos que tem como foco o controle do apetite por sódio. Trabalhos anteriores do laboratório de neurociências mostram que bloqueio dos receptores kappa- e delta-opioides encefálicos promovem efeito antinatriorexigênico em ratos depletados de sódio (NASCIMENTO et al., 2012, 2014).

As áreas do sistema nervoso central que estão envolvidas no controle homeostático e que conseqüentemente regulam a ingestão de sal incluem: a região anteroventral do terceiro ventrículo, composta pelo órgão subfornical, órgão vasculoso da lamina terminal e núcleo pré-óptico mediano (MnPO), núcleos hipotalâmicos, especialmente o núcleo paraventricular (PVN), a área septal, o leito da estria terminal e o complexo amigdalóide (JOHNSON; THUNHORST, 1997; JOHNSON, 2007) Dentre estas, os órgãos circunventriculares (OCVs), e o MnPO têm papel importante na sinalização dos distúrbios hidrossalinos pois apresentam osmorreceptores e canais especializados na detecção de sódio (Na_x) (HIYAMA et al., 2002; NODA; SAKUTA, 2013). O MnPO é considerado um centro de integração, recebe conexões dos OCVs e possui eferências para áreas envolvidas no controle hidrossalino, como o núcleo paraventricular hipotalâmico (MCKINLEY et al., 2015).

Diante das evidências da participação do MnPO no equilíbrio hidrossalino e sabendo da presença de receptores opióides nesta área, além de conhecer sua participação no comportamento de ingestão de sal, decidimos investigar o papel dos receptores do tipo mu-opiíides no MnPO na ingestão de sódio em ratos depletados desse íon e além disso, buscamos identificar se outros neurotransmissores como a angiotensina (AII) e o Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) estavam envolvidos neste comportamento ingestivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HOMEOSTASIA HIDROSSALINA

O equilíbrio entre os meios intracelular e extracelular é essencial para manutenção da vida. A troca iônica entre esses meios, depende do gradiente de concentração e a troca de água é dependente do gradiente osmótico e da presença de aquaporinas. A osmolalidade do compartimento líquido extracelular (LEC) é mantida em aproximadamente 300 mOsm/kg e a concentração de Na⁺, o principal íon deste compartimento, se mantém em cerca de 145 mEq/l, enquanto o K⁺, o principal íon do compartimento líquido intracelular (LIC), é mantido em 140 mEq/l (NODA; SAKUTA, 2013). A manutenção da homeostasia dos líquidos corporais é importante para vários processos fisiológicos, dentre eles a excitabilidade neural e de células musculares esqueléticas e cardíacas, filtração glomerular, pressão arterial, trocas capilares e débito cardíaco (DANIELS; FLUHARTY, 2004).

Alterações nas concentrações de sódio no LEC, como a hipernatremia, podem levar a quadro de cefaléia, níveis reduzidos de alerta e dificuldade de concentração e, em situações mais graves, a letargia, fraqueza, irritabilidade, hiperreflexia espasticidade e confusão mental. As situações crônicas de hipernatremia se relacionam à hiperreatividade vascular e hipertensão arterial. Por outro lado, a hiponatremia também traz grandes prejuízos, principalmente neurológicos, podendo progredir para coma e morte (BOURQUE, 2008).

Os mamíferos mantêm a osmolalidade constante no LEC, podendo ocorrer variações que dependem da taxa de excreção e ingestão de sódio e água. A água, assim como o sódio pode ser excretada por meio das fezes, por evaporação (suor), e através da urina sendo esta a forma quantitativa mais significativa. A entrada no organismo, tanto de água, quanto de sódio é dada basicamente pela ingestão. Mecanismos neuro-hormonais e comportamentais são responsáveis pelo controle das perdas e ganhos de água e eletrólitos (BOURQUE, 2008; GUILLAUMIN; DIBARTOLA, 2017). O sistema nervoso é capaz de detectar variações no

volume, na tonicidade e na composição do LEC através de receptores no SNC e na periferia, estes últimos localizados ao longo do trato digestivo e nos vasos sanguíneos (DOS SANTOS MOREIRA et al., 2017). Quando há uma hiperosmolaridade e diminuição do volume no LEC, com conseqüente desidratação celular, ocorre sensação de sede que leva a ingestão de água, assim como a liberação de vasopressina que aumenta a retenção de água nos túbulos coletores renais (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004b). Já em resposta a hiposmolaridade no LEC, ocorre supressão da liberação da vasopressina, que resulta em aumento da diurese, bem como na abolição da sensação de sede (BOURQUE, 2008). Outro hormônio que também atua nos túbulos renais e está relacionado à regulação do volume dos líquidos corporais é a aldosterona, que promove aumento da reabsorção de sódio. Essas ações hormonais são complementadas por ação da inervação simpática nos túbulos renais que, quando ativada, aumenta a reabsorção de sódio e água (JOHNSON, 2007).

Alterações na osmolaridade do líquido cérebro-espinhal, assim como desequilíbrios na osmolalidade plasmática, desencadeiam estímulos a fim de reestabelecer a homeostasia dos líquidos corporais. Pequenas variações de 1 a 3% são suficientes para desencadear comportamento motivado de ingestão de água, ativação de funções neuroendócrinas, bem como alterações na atividade do nervo simpático renal e da pressão arterial (BOURQUE, 2008). Também foi visto que injeção de líquido cerebrospinal artificial hipertônico no ventrículo ativa a liberação de vasopressina, leva a descarga simpática e à sede. Estas respostas são mediadas por osmorreceptores presentes em muitas regiões do sistema nervoso central, principalmente na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) que inclui: o órgão subfornical (SFO), o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e o MnPO (JOHNSON, 2007).

Algumas áreas cerebrais participam diretamente da homeostasia dos líquidos corporais. As mais notáveis dentre essas áreas são os órgãos circumventriculares SFO, OVLT e área postrema (AP), núcleos prosencefálicos como o núcleo preótico mediano, núcleo paraventricular hipotalâmico parvicelular e magnocelular, núcleo supraótico, amígdala (principalmente os núcleos centrais e mediais), núcleo do leito da estria terminal, área septal e hipotálamo lateral e estruturas romboencefálicas, como o núcleo do trato solitário (NTS), medula ventrolateral rostral e caudal, núcleo parabraqüial (PBN) (JOHNSON, 2007).

O SFO e o OVLT projetam seus neurônios para núcleos como o supraótico e paraventricular hipotalâmico que liberam vasopressina e oxitocina, hormônios estes também relacionados à manutenção da homeostase dos líquidos corporais e disparos simpáticos (WESTERHAUS; LOEWY, 1999; MILLER; LOEWY, 2014). Diferente desses dois OCVs, a

área postrema (AP) apresenta principalmente conexões com o NTS, a medula ventrolateral e uma região do núcleo parabraquial. Além disso, um grupo de neurônios da AP se projeta para neurônios pré-ganglionares parassimpáticos pancreáticos. (LOEWY; HAXHIU, 1993). Do ponto de vista funcional, a AP está envolvida em diversas funções viscerais como no reflexo do vômito, reflexos cardiovasculares e ingestão de alimentos (MCKINLEY et al., 2003; FRY; FERGUSON, 2009).

Estudos neuroanatômicos mostraram que a área septal, integrante do sistema límbico, recebe e envia projeções para áreas prosencefálicas envolvidas no equilíbrio hidroeletrólítico, como o SFO, a área preóptica medial (mPOA) e hipotálamo lateral (LH) (PAULIN et al., 2009). Blass e colaboradores descreveram que lesões eletrolíticas na AS levava a um aumento de ingestão de salina ainda maior do que aquele estimulado pela angiotensina II (BLASS; NUSSBAUM; HANSON, 1974). Administração de vasopressina da área septal medial, aumentou a ingestão de água de forma dose dependente em animais privados de água por 24 horas e ainda aumentou a ingestão de água e sódio em animais depletados de sódio (CAMARGO, A. A. L.; CAMARGO, M. P. A. G; SAAD, 2007). Estes dados da literatura evidenciam que a área septal é um núcleo importante no controle hidrossalino.

Para manter a homeostasia hidrossalina nos compartimentos celulares, é importante o equilíbrio entre os mecanismos centrais e periféricos que regulam a ingestão e a excreção de água e sódio no organismo.

2.2. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DO APETITE POR SÓDIO

Apetite por sódio é um comportamento específico, motivado, inato presente em diversas espécies de animais, inclusive em humanos e pode ser definido como ingestão de solução NaCl, mesmo que em uma concentração expressivamente alta, diante de um quadro de deficiência, enquanto que, em uma condição de ausência de necessidade fisiológica desse íon a ingestão seria bastante desagradável e até aversiva (FORMENTI; COLOMBARI, 2011).

Há na literatura muitos estudos em animais que mostram a motivação para a ingestão de sal, no entanto no homem é pouco descrito o comportamento motivado para o apetite por sódio, isto se deve ao fato que a ingestão dietética humana normalmente é rica em sódio (DANIELS; FLUHARTY, 2004). Mas este comportamento motivado também existe no homem como foi demonstrado no relato de caso clássico descrito por Wilkins e Richter em 1940 que confirmaram aumento do apetite por sódio em humanos em situação de distúrbios do balanço deste íon. Os autores relatam a história de uma criança de três anos e meio que foi hospitalizada apresentando sinais de desenvolvimento precoce, e que veio a falecer após sete

dias de internamento. Após falecimento da criança foi constatado que ela apresentava insuficiência da adrenal, como consequência não produzia mineralocorticóides e ficava impossibilitada de reter sódio. Acredita-se que o falecimento tenha ocorrido devido à dieta hipossódica oferecida pelo hospital. Segundo o relato dos pais da criança esta tinha uma vontade insaciável de ingerir sal e que em casa fazia isso sem moderação. Neste relato fica evidente a presença do apetite por sal em humanos (WILKINS; RICHTER, 1940)

Em animais, o primeiro estudo que demonstrou que o apetite por sódio é um comportamento motivado e que ocorre especificamente em resposta a uma deficiência desse íon foi feito em 1936 por Curt Richter. Ele mostrou que ratos adrenalectomizados mantidos com dieta hipossódica morriam dentro de poucos dias, porém quando era oferecido a esses animais salina hipertônica a 3% eles não só aceitavam como conseguiam manter-se vivos. Além disso, em outro estudo Richter observou que esse comportamento ingestivo era abolido após os animais receberem transplante de tecido funcional da glândula adrenal (RICHTER; ECKERT, 1938).

O apetite por sódio geralmente aumenta após um período prolongado de deficiência deste íon, porém os mecanismos exatos responsáveis por este comportamento ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que, assim como a sede, o apetite por sódio é um mecanismo regulatório imprescindível para restauração do compartimento líquido extracelular (GEERLING; LOEWY, 2008). Estudos iniciais sugeriram que o aumento do apetite por sódio era devido a hiponatremia induzida pela privação dietética de sódio. Entretanto, CONTRERAS; HATTON, (1975) mostraram que os valores plasmáticos de sódio estavam normais mesmo após 7 dias de dieta hipossódica, embora os animais apresentassem alta preferência e aumento na ingestão de solução hipertônica. Os valores normais de sódio plasmático poderiam ser explicados pela redução expressiva da excreção urinária deste íon, que restaurava a hiponatremia.

A depleção de sódio leva a um estado motivado de apetite por sal. Embora haja uma mediação periférica para este comportamento, as maiores evidências é que ele seja de origem central. Atualmente já se sabe que o apetite por sódio é capaz de alterar a preferência de sabor, de modo que uma substância com alta concentração de sal antes tida como aversiva se torna hedônica e por isso ganha bastante aceitabilidade. É importante salientar que quanto maior for o desequilíbrio de sódio corporal maior será preferência por este íon, desta forma a modulação do comportamento ingestivo permite a correção do balanço homeostático (CONTRERAS; HATTON, 1975; HURLEY et al., 2015)

Muitas são as áreas cerebrais que foram descritas como participantes do comportamento do apetite por sódio. Os órgãos circumventriculares que incluem o SFO, o OVLT, a eminência média e a AP. Morfologicamente estas áreas são caracterizadas por abundante rede vascular com capilares de tipo fenestrado. Essas áreas possuem neurônios que fazem a interface entre o ambiente químico da circulação periférica e o ambiente cerebral. Entre as substâncias que são detectadas está o sódio por meio dos canais sensíveis à variação de sódio (Na_x) (DE ALMEIDA, 1984; JOHNSON; GROSS, 1993; NODA, 2006). Um estudo realizado com ratos geneticamente modificados mostrou que os animais que não expressam os canais (Na_x) ingerem sal em excesso quando desidratados, diferente dos ratos selvagens que nesta condição evitam a ingestão de sal. Portanto o canal (Na_x) exerce influências inibitórias na atividade neuronal durante o estado de desidratação no SFO e OVLT (WATANABE ET.AL, 2000). Confirmando o papel desses canais, em outro estudo observou-se que injeções intracerebroventriculares de solução salina hipertônica em ratos selvagens produz um comportamento aversivo ao sódio, mas o mesmo não ocorre em ratos que não expressam os canais (Na_x) (HIYAMA et al., 2004). Posteriormente foi descoberto que os canais (Na_x) são expressos especificamente nas células gliais (astrócitos e células endoteliais) dos órgãos circumventriculares e não exatamente nos neurônios (WATANABE et al., 2006). Isso levantou o questionamento de como estas células gliais não sendo células excitáveis conseguem transmitir as informações detectadas referentes à concentração de sódio no líquido cérebro espinhal aos neurônios a figura 01 mostra o resumo de como isso acontece nas células endoteliais no SFO, no entanto, esse mecanismo parece ocorrer também com astrócitos positivos para os canais Na_x .

Quando os animais estão desidratados, a concentração de sódio tanto no plasma quanto no líquido cérebro espinhal aumenta acima dos níveis normais (145 mEq/l) e, assim que ultrapassa os 150 mEq/l ocorre abertura dos canais Na_x fazendo aumentar a concentração intracelular de sódio, isso ocorre com gastos de ATP. Para garantir a quantidade de ATP suficiente para esse trabalho além do nível usual, as células gliais aumentam a absorção de glicose e estimula a glicólise anaeróbica para gerar energia, produzindo o lactato como produto final desta via. Esse lactato é liberado e fornecido aos neurônios, inclusive aos neurônios GABAérgicos e estimula a atividade destes. Os neurônios GABAérgicos estão envolvidos no comportamento aversivo para ingestão de sódio (SHIMIZU et al., 2007).

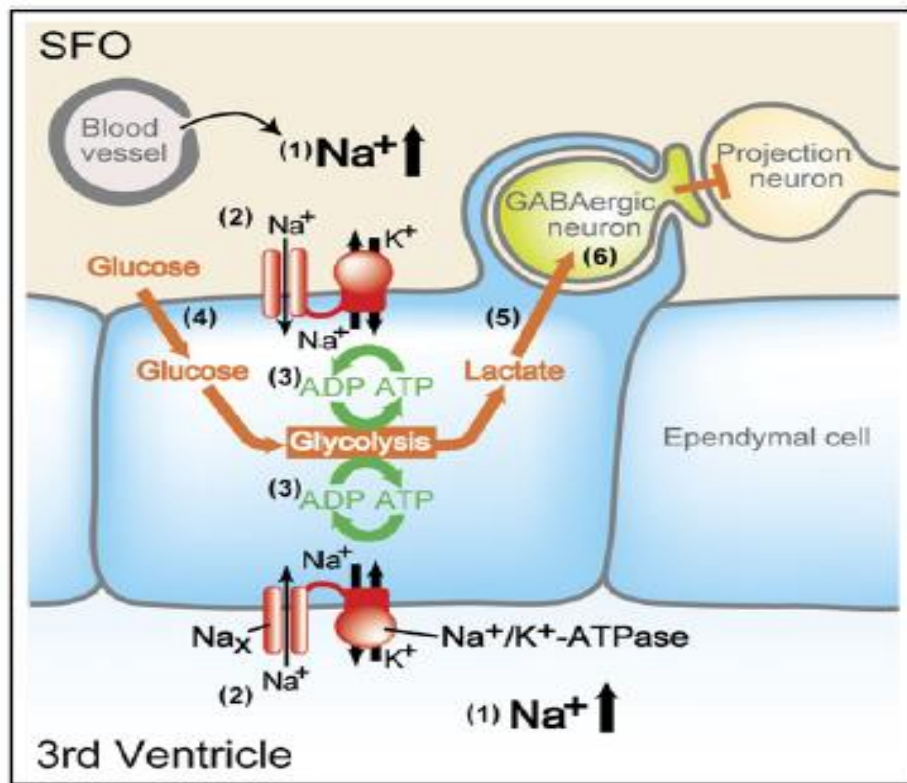


Figura 01- Mecanismo de sinalização da concentração de sódio no líquido cerebrospinal das células gliais para os neurônios (Retirada de Shimizu, 2007).

Além dos OCVs (SFO, OVLT, AP e ME), os canais (Na_x) também são expressos em célula de outros núcleos hipotalâmicos que estão envolvidos na homeostasia como no núcleo paraventricular e supraóptico. No MnPO esses canais são expressos apenas em cérebros de ratos, mas não em camundongos, sugerindo que há uma diferença no padrão de expressão dos canais (Na_x) entre as espécies de roedores (NEHMÉ et al., 2012).

O núcleo do trato solitário (NTS), localizado no tronco cerebral, é a primeira área que recebe informações gustativas através dos VII, IX e X pares de nervos cranianos, captadas por barorreceptores e quimiorreceptores e também participa da regulação do apetite por sódio (JOHNSON, 2007). Foi visto que lesões no NTS levam ao aumento da ingestão de sódio, tanto de forma aguda, quanto crônica em animais depletados desse íon, o que sugere que esse núcleo constitui parte das vias inibitórias para o comportamento ingestivo (OGIHARA et al., 2009). Em outro estudo foi mostrado que um grupo de neurônios sensíveis à aldosterona no NTS expressou o marcador de atividade neuronal c-Fos especificamente quando os animais estavam com deficiência crônica de sódio e cerca de duas horas após ser oferecida salina hipertônica a 3% de NaCl aos animais, esses neurônios deixaram de ser ativados (OHMAN; JOHNSON, 1986).

Outra área importante no controle da ingestão de sódio e água e que já foi descrita como participante dos mecanismos inibitórios é o núcleo parabraquial lateral (LPBN), uma estrutura pontina, localizada dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior. O LPBN tem conexões com áreas prosencefálicas como o núcleo paraventricular, o núcleo central da amígdala (CEA) e MnPO, bem como, com áreas situadas em regiões medulares como a AP e porção medial do NTS, estruturas estas relacionadas ao equilíbrio hidrossalino (ANDRADE-FRANZÉ et al., 2010). Dados da literatura mostram que lesão eletrolítica no LPBN é capaz de aumentar a ingestão de sódio e água em animais que receberam injeção de angiotensina II (AII) e isoproterenol, em relação ao grupo controle que manteve essa área cerebral intacta (OHMAN; JOHNSON, 1986). Alguns neurotransmissores e receptores participam da regulação da ingestão de sódio e água no LPBN, como a serotonina, o GABA, o glutamato, noradrenalina, opióides entre outros (PAVAN et al., 2015) e estes atuam em mecanismos diferentes na ingestão. Um estudo mostrou que os subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃ têm efeitos opostos. Enquanto o primeiro inibe a ingestão de sódio e água em animais depletados de sódio, o 5-HT₃ contribui para a facilitação da ingestão em animais também depletados deste íon. (DE GOBBI et al., 2007).

O MnPO é uma das estruturas que compõe a parede anterior do terceiro ventrículo (AV3V) juntamente com os OCVs SFO e OVLT. Ele é considerado um centro de integração da homeostasia hidrossalina, pois recebe sinais neurais provenientes dos OCVs e posteriormente os envia para os núcleos supra ótico e paraventricular do hipotálamo, áreas cerebrais envolvidas na liberação de vasopressina. Em situação de hipertonicidade e de diminuição de volume observa-se ativação dos neurônios de todas as estruturas da AV3V que projetam para áreas associadas à liberação de vasopressina (HUSSY et al., 2000; SOMPONPUN et al., 2004; TAKAHASHI; HAYASHI; TANAKA, 2017). Embora o SFO e o OVLT tenham conexão direta com núcleos hipotalâmicos, o papel integrador do MnPO parece ser importante para a regulação homeostática. Um estudo demonstrou que lesões com ácido no MnPO foi capaz de atenuar a ingestão de água secundária à administração de AII diretamente no SFO (GUTMAN; JONES; CIRIELLO, 1989). Foi demonstrado ainda que lesões comprometendo parte ou todo o MnPO levou distúrbios eletrolíticos devido alteração na liberação de vasopressina (ANDERSSON; LEKSELL; LISHAJKO, 1975). Dados do nosso laboratório mostram a participação do MnPO na ingestão de sódio. Injeções de interleucina1-beta nessa área levaram a uma diminuição da ingestão de sódio em ratos depletados desse íon quando comparados ao grupo controle, além disso, com a maior concentração de interleucina1-beta utilizada no experimento foi possível observar uma

completa abolição da ingestão de sal nesses animais. A ingestão de água permaneceu inalterada (CERQUEIRA et al., 2016). Em um estudo recente no qual se realizou ativação de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos, do MnPO/OVLT utilizando abordagens técnicas da optogenética, foi visto que ativação dos neurônios glutamatérgicos promovem consumo de água, enquanto que a ativação dos neurônios GABAérgicos suprimem este consumo. Embora essa ativação tenha sido feita nas duas áreas simultaneamente, é importante frisar que a população de neurônios GABAérgicos é bem maior no MnPO do que no OVLT, o que levou os autores concluírem que este núcleo é o principal responsável pela inibição do consumo de água com a ativação dos neurônios GABAérgicos (ABBOTT et al., 2016). Além de participar da homeostasia dos líquidos corporais o MnPO também é muito importante para o controle do sistema cardiovascular, regulação da temperatura corporal e sono-vigília (MCKINLEY et al., 2015).

Localizada bilateralmente no lobo temporal medial, a amígdala é uma área cerebral composta por aproximadamente treze núcleos organizados em três grupos principais: superficial, centromedial e basolateral. Através de suas fortes conexões com regiões corticais está envolvida no processamento de emoções, principalmente aquelas relacionadas ao medo, preparando o organismo para um estado de luta ou fuga, mas também em emoções prazerosas e de raiva. Além disso, a amígdala ainda está envolvida em comportamentos fisiológicos ou motivados como dormir, comer, beber, recompensa e punição entre outros (MCDONALD, 1998).

Diversos estudos mostram a participação da amígdala no apetite por sódio e esta parece exercer um papel facilitatório para este comportamento, uma vez que em um estudo no qual se realizou uma amigdalectomia total observou-se redução da ingestão de salina hipertônica após estímulo com mineralocorticoides e furosemida (COX; CRUZ; RUGER, 1978). Também, a ativação farmacológica dos receptores de serotonina 5-HT₃ localizados dentro do núcleo central da amígdala inibiu a ingestão de sódio em ratos depletados desse íon (LUZ et al., 2007). Anteriormente, esse mesmo grupo também mostrou que a ativação farmacológica por um agonista seletivo de receptores serotoninérgicos 5-HT₃, localizados dentro do núcleo medial da amígdala, levava a uma redução da ingestão de sódio em animais depletados desse íon, e este efeito foi totalmente bloqueado pela administração de um antagonista seletivo. Foi mostrado ainda que este antagonista sozinho não exerceu efeito algum sobre a ingestão de sódio. Já ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2c} localizados nesta mesma área não alterou a ingestão de sódio, mas o bloqueio levou a uma diminuição desse comportamento, indicando que é importante a integridade funcional desses

receptores para a expressão completa do apetite por sódio (LUZ et al., 2006). Estudos mais recentes, demonstraram a participação da amígdala, especialmente o seu núcleo central, no comportamento do apetite por sódio, considerando as conexões desta área com áreas gustatórias e corticais, foi mostrado que lesões no núcleo central foram capazes de diminuir o limiar de tolerância ao sabor salgado em ratos, aumentando assim a sensibilidade ao sal. Esse pode ser um dos mecanismos capaz de justificar a redução do apetite por sódio após lesões dessa área (LI et al., 2012).

Diversos neurotransmissores têm sido descritos como facilitadores ou inibidores dos mecanismos regulatórios do apetite por sal nas áreas cerebrais envolvidas neste comportamento. Entre eles, destacamos no presente trabalho os opióides que alguns estudos têm demonstrado sua participação na modulação do apetite por sódio (NASCIMENTO et al., 2012, 2014; YAN et al., 2013; PAVAN et al., 2015) e ainda, observamos como os opióides interagem com os neurotransmissores angiotensinérgicos e GABAérgicos no controle deste comportamento motivado.

2.3. OPIÓIDES E SISTEMAS EFETORES

O ópio é uma substância extraída da semente da papoula de uma planta denominada *Papaver Somniferum*. A mais conhecida dessas substâncias é a morfina, porém pode se isolar dessa planta outros alcalóides como a codeína, papaverina e tebaína. Conjuntamente esses compostos são denominados opiáceos. Opióide é um termo mais amplo que abrange todo composto que interage com os receptores opióides no sistema nervoso central (TRESKOT et al., 2008; PATHAN; WILLIAMS, 2012). Eles podem ser divididos em quatro grupo: os peptídeos opióides produzidos de forma endógena como a dinorfina e a met-enkefalina; alcalóides de ópio como a morfina; opióides semi-sintéticos; onde há uma modificação da estrutura natural da morfina e como exemplo pode se citar a diacetilmorfina popularmente conhecida como heroína e os derivados sintéticos que possuem estruturas não relacionadas à morfina como exemplo, tem se a série da fenilpiperidina, entre outros (MCDONALD; LAMBERT, 2008).

As encefalinas, beta-endorfinas e dinorfinas constituem a família dos peptídeos de opióides endógenos. Estes são encontrados amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central. A encefalina é derivada da molécula preproencefalina, que é expressa em grande parte do sistema nervoso central desde o córtex pré-frontal até a medula espinhal e codifica peptídeos de natureza opióide. Após ser clivada ela dá origem a sete novos peptídeos, sendo quatro moléculas de [MET] encefalina, uma de [LEU] encefalina e outros dois peptídeos no

terminal carboxílico. A preproopiomelacortina é expressa dentro do cérebro, no núcleo arqueado do hipotálamo e núcleo do trato solitário, dando origem a proopiomelacortina, polipeptídio formado por 241 aminoácidos que quando clivado próximo ao seu terminal carboxílico origina o peptídeo beta-lipotrofina, que por sua vez clivada gera a beta-endorfina e a beta-MSH. Quando clivada na região média a proopiomelacortina origina o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que ainda pode ser clivado em alfa-MSH e no Peptídeo do lóbulo intermediário tipo Corticotropina (CLIP). Por fim, quando clivado um pouco mais próximo ao seu terminal amínico a proopiomelacortina gera o peptídeo gama-MSH. Os peptídeos de dinorfina são derivados do precursor pré-prodinorfina, encontrada ao longo do cérebro. A prodinorfina quando clivada também origina três principais peptídeos contendo [LEU] encefalina, sendo eles a alfa/beta neodinorfina, dinorfina A e dinorfina B (Figura 02) (AKIL et al., 1984; POULIN et al., 2009).

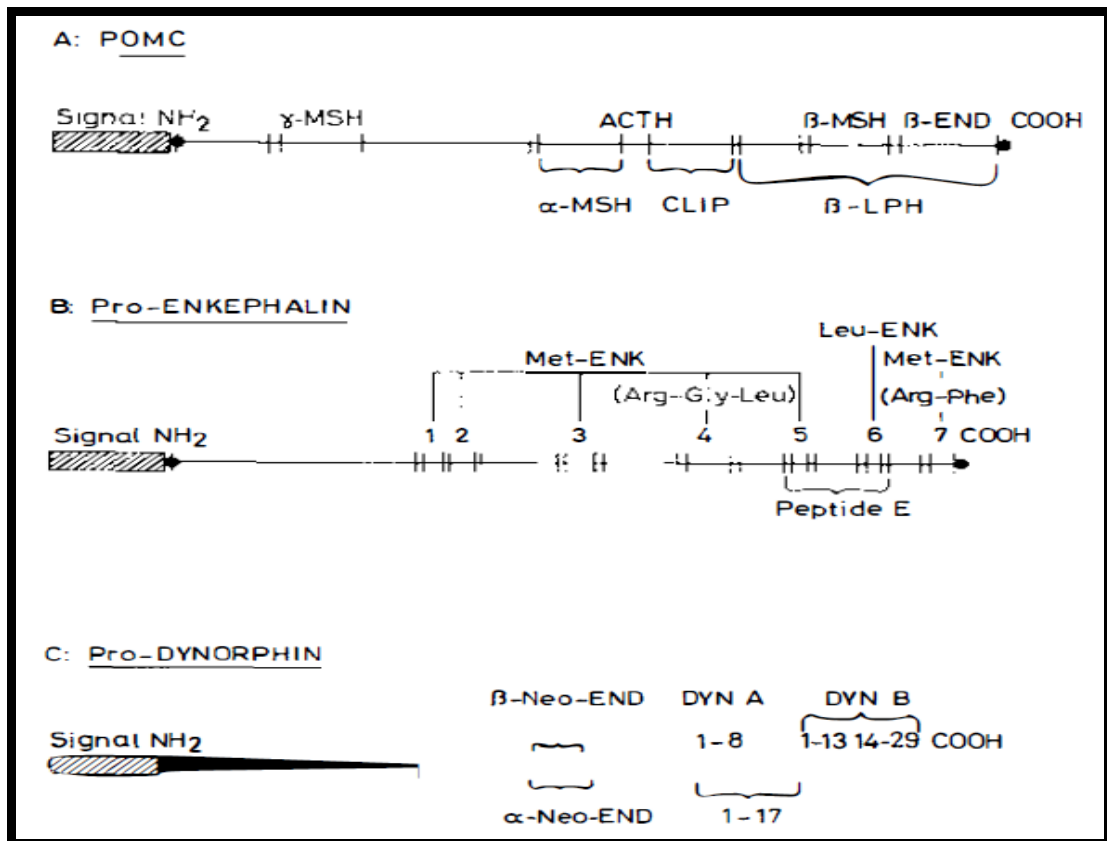


Figura 02- Representação esquemática das estruturas precursoras de proteínas das três famílias dos opióides clássicos. As linhas verticais duplas representam sítios de clivagem dos aminoácidos (Retirado de Akil et.al, 1984).

Além desses três opióides endógenos considerados clássicos, foi identificado em 1995 um quarto composto denominado de orfanina FQ ou nociceptina, que é derivado do polipeptídeo pre-pronociceptina. Embora os efeitos deste composto não sejam bloqueados

pelo naloxone como os demais, ele foi considerado um opióide endógeno por compartilhar características com estes, como as sequências de aminoácidos e possuir um sistema de receptores acoplados à proteína G, além de que, a nível celular, a orfanina atua produzindo ações semelhantes aos outros opióides endógenos (PATHAN e WILLIAMS, 2012).

Os receptores opióides originalmente foram denominados com letras gregas, mu, kapa e delta. Em 1996, a União Internacional de Farmacologia mudou a nomeação para OP1 (receptor delta), OP2 (receptor kapa) e OP3 (receptor mu), mais tarde nos anos 2000 novamente essa nomenclatura foi alterada para DOP, KOP e MOP (PATHAN; WILLIAMS, 2012). No presente trabalho será utilizada a nomenclatura clássica para estes receptores.

Os opióides exercem suas ações através da ligação com seus receptores. As encefalinas se ligam preferencialmente aos receptores delta, as beta-endorfinas aos receptores tipo mu, as dinorfinas aos receptores tipo kapa e a nociceptinas aos receptores NOP. Porém, é de grande importância salientar que os opióides não são completamente seletivos e podem se ligar a mais de um tipo de receptor, um exemplo, claro disto, são as beta-endorfinas que podem se ligar em qualquer um dos três tipos de receptores clássicos, mas preferencialmente se ligam aos receptores do tipo mu (MCDONALD; LAMBERT, 2008)

Todos os receptores opióides pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G inibitória. Estruturalmente eles são formados por uma região amino terminal extracelular, (N-terminal), seguido por sete domínios transmembranas helicoidais, conectados entre si por três alças de interligação no meio extracelular e três no meio intracelular finalizando com um domínio intracelular, C-terminal. As alças no meio intracelular se ligam à proteína G que possui a função de propagar o sinal de ativação que se inicia no domínio extracelular do receptor. (TRESKOT et al., 2008). A proteína G é formada por três subunidades distintas, sendo elas a alfa, a beta e a gama. Após o receptor ser ativado por um agonista opióide, ele muda sua conformação e se liga a proteína G, que em seguida dissocia a subunidade alfa do complexo beta gama a partir da fosforilação, então a molécula de GDP (difosfato de guanosina) se transforma em uma molécula de GTP (trifosfato de guanosina). Em seguida, a subunidade alfa inibe a via da adenilato ciclase com consequente inibição do AMPc que inativará os canais de cálcio, aumentando a condutância aos íons de potássio o que consequentemente levará a hiperpolarização da célula. Após este processo ocorre a desfosforilação da subunidade alfa, e novamente a molécula de GTP se transforma em GDP unindo as subunidades alfa e o complexo beta gama da proteína G (figura 3) (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011).

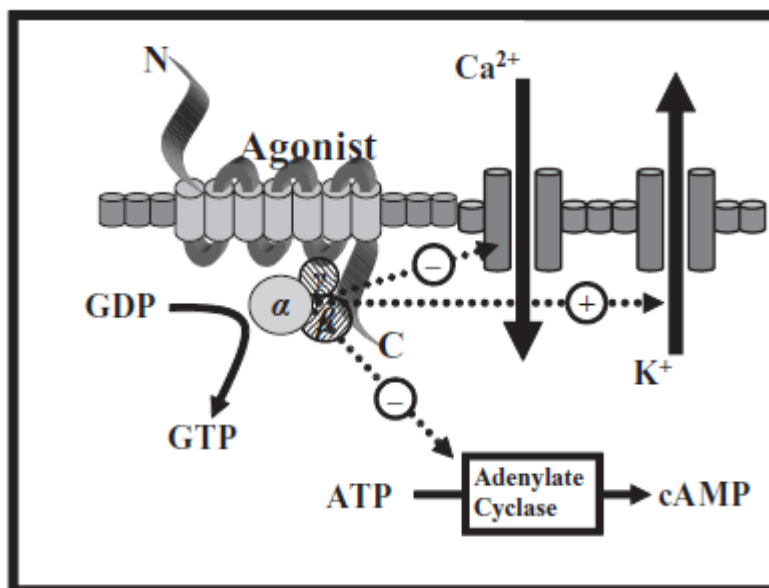


Figura 03 - Eventos intracelulares que ocorrem após a ligação de um agonista opióide a um receptor opióide acoplado a proteína G inibitória (Retirado de PATHAN & WILLIAMS, 2012).

2.4. OPIÓIDES E INGESTÃO DE SAL

O sistema opioidérgico central desempenha importantes funções no organismo, como a antinocicepção, controle cardiovascular e do humor, regulação endócrina e comportamentos alimentares (NASCIMENTO et al., 2014). Distribuídos difusamente pelo sistema nervoso central, os receptores opióides são encontrados em áreas relacionadas ao controle da ingestão de sódio como o núcleo do leito da estria terminal, núcleo central da amígdala, o SFO, MnPO entre outros (POULIN et al., 2009; YAN et al., 2013). Os opióides participam da modulação do apetite por sódio atuando basicamente através de dois componentes que estão envolvidos neste comportamento: a motivação para ingerir sal, e a palatabilidade hedônica do sal (SMITH; LAWRENCE, 2017).

Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que o bloqueio central dos receptores delta opióides, leva a inibição da ingestão de sódio em animais depletados desse íon pelo uso do diurético furosemida, sugerindo que a ativação dos receptores delta opióides em animais depletados pode ser importante para corrigir o desequilíbrio nas concentrações de sódio, enquanto que em condições normonatrêmicas os opióides participam mantendo a ingestão normal de sódio. Além disso, mostrou também uma possível interação entre as vias opioidérgicas e angiotensinérgicas centrais, uma vez que o bloqueio dos receptores delta opióides levou a inibição da ingestão de sódio induzida pela administração central de

angiotensina II. Resultados semelhantes foram encontrados quando foi realizado o bloqueio central de receptores Kappa opióides (NASCIMENTO et al., 2012, 2014).

Também há na literatura trabalhos mostrando a participação dos receptores mu-opiíides no apetite por sódio. A ativação desses receptores no LPBN levou ao aumento da ingestão de sódio e água em ratos pré-tratados com diurético furosemida associado com captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina e este efeito foi revertido pelo pré-tratamento com um antagonista seletivo de receptores mu-opiíides, enquanto que o bloqueio dos receptores kappa produziu apenas tendência a reverter este efeito. Já o bloqueio dos receptores delta não modificou a ingestão de água ou sódio, mostrando assim que a ativação dos receptores do tipo mu-opiíide é capaz de reverter a característica inibitória do LPBN para a ingestão de sódio e água (PAVAN et al., 2015).

O presente estudo está baseado em três hipóteses principais elencadas a seguir. 1 – Como os efeitos dos opiíides são decorrentes de hiperpolarização neuronal, e como a depleção de sódio leva à ativação endógena dos receptores mu-opiíides no MnPO, nossa hipótese é que na depleção de sódio a ativação dos opiíides endógenos irá desinibir o comportamento ingestivo e os animais irão aumentar o apetite por sódio. Para testar esta hipótese se for realizado o bloqueio farmacológico dos receptores mu-opiíides no MnPO haverá inibição da ingestão de salina hipertônica em ratos depletados de sódio. 2 – Em condições de aumento da concentração plasmática de sódio, há ativação dos canais Nax no MnPO. Isso resulta em aumento da concentração extracelular de lactato, que por sua vez ativa neurônios GABAérgicos com efeito inibitório sobre a motivação para ingestão de sódio. Desta forma, nossa hipótese é que na depleção de sódio a ativação de receptores mu-opiíides no MnPO irá inibir os neurônios GABAérgicos, tendo um efeito desinibitório sobre a motivação para ingestão de sódio. Para testar esta hipótese se for feito o bloqueio farmacológico dos receptores GABAérgicos, se observará uma reversão do efeito inibitório da ingestão de sódio promovida pelo bloqueio dos receptores mu-opiíides. 3- A AII pode atuar em terminais pré-sinápticos dos neurônios GABAérgicos inibindo a transmissão deste impulso e desta forma aumentando a ingestão de sódio. Nossa hipótese é que se o bloqueio das vias mu-opiíidérgica for capaz de impedir a inibição do neurônio GABAérgico pela AII exógena, haverá redução da ingestão de sódio. Portanto, para testar esta hipótese se for feito o bloqueio das vias mu-opiíidérgicas haverá inibição da ingestão de sódio, induzida pela AII.

3 HIPÓTESES

A depleção de sódio estimula a liberação de opióides no MnPO que através da ativação dos receptores mu-opioides modula o apetite por sódio.

3.1. HIPÓTESE TESTE (H1)

3.1.1. Se a depleção de sódio ativa as vias opioidérgicas e isto leva ao aumento da ingestão de sódio, então o bloqueio farmacológico dos receptores mu-opioides no MnPO levará a inibição da ingestão de salina hipertônica.

3.1.2. Se a ativação das vias opioidérgicas inibe os neurônios gabaérgicos presentes no MnPO, então o bloqueio dos neurônios gabaérgicos, levará a reversão do efeito inibitório da ingestão de sódio promovida pelo bloqueio dos receptores mu-opioides em ratos depletados de sódio.

3.1.3. Se o bloqueio das vias mu-opioidérgicas impedir a inibição do neurônio GABAérgico pela angiotensina II exógena, então haverá redução da ingestão de sódio em ratos normoanatrêmicos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel dos receptores mu-opioides no MnPO sobre o controle do apetite por sódio em ratos depletados desse íon.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Estudar o efeito do bloqueio dos receptores mu-opioides do MnPO na ingestão de sódio em ratos depletados desse íon.

4.2.2. Investigar se o bloqueio dos receptores GABAérgicos presentes no MnPO reverte o efeito antinatriorexigênico induzido pelo bloqueio dos receptores mu-opioides nesta área.

4.2.3. Testar se o bloqueio dos receptores mu-opioides presentes no MnPO inibe o apetite por sódio induzido por Angiotensina II.

4.2.4. Analisar se o bloqueio dos receptores mu-opioides, no MnPO altera a ingestão de substâncias palatáveis.

4.2.5. Verificar se o bloqueio dos receptores mu-opioides, no MnPO altera a atividade locomotora

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar machos adultos com peso entre 260 e 280g. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências da Universidade Federal da Bahia, localizado no Instituto de Ciências da Saúde da referida Universidade. Eles foram mantidos em temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, e em ciclo claro escuro de 12 horas, recebendo livremente água e ração.

5.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O número de animais utilizados nos experimentos foi determinado por meio do programa BioEstat versão 5.0, e também está de acordo com trabalhos existentes na literatura que tratam de temática semelhante. Os protocolos experimentais apresentaram-se em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e os mesmos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS-UFBA) e foram registrados com o número 024/2012.

5.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Cinco dias precedentes à realização dos experimentos, foram implantadas cânulas guias no cérebro dos animais, confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com diâmetro de 0.7mm e comprimento padronizado de 13mm, para administração de injeções de fármacos no encéfalo. Para isso eles foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.), com cetamina (80mg/kg) / xilazina (11,5mg/kg). Em seguida foi realizada tricotomia da cabeça e então eles foram posicionados no aparelho estereotáxico. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para canular os encéfalos no MnPO foram determinadas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998), sendo anteroposterior 0,3mm posterior ao Bregma, lateral 0,0mm considerando a sutura da linha média e vertical 5,8mm a partir da superfície do crânio. Para fixação das cânulas utilizou-se resina acrílica autopolimerizável JET. Após implantação destas, os animais receberam doses profiláticas de pentabiótico veterinário (benzilpenicilina benzatina 24.000UI; benzilpenicilina procaína 12.000UI; benzilpenicilina potássica 12.000UI; diidroestreptomicina base 10 mg estreptomicina base 10 mg) na dose de

0,2 ml/rato e antiinflamatório/analgésico (flunixinina meglumina 2,5 g/ml, na dose de 0,1 ml/100g peso), ambos foram administrados por via intramuscular (I.M). Para prevenir a obstrução das cânulas, foram utilizados mandris removíveis feitos com fio de aço inoxidável número 28 e que possuíam o mesmo comprimento das cânulas guias.

Após recuperação anestésica os animais foram colocados em caixas individuais e tiveram livre acesso à ração, bebedouros com água destilada e bebedouros com salina hipertônica 1,5%. Diariamente essas caixas foram trocadas e os animais foram manipulados simulando as condições experimentais a fim de diminuir o estresse no momento do experimento.

5.4 DROGAS E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

As drogas utilizadas foram Naloxone (antagonista do receptor μ (mu)) nas concentrações de 3, 6 e 12 nmol/0,2 μ L, Bicuculina (antagonista gabaérgico) 2 nmol/0,2 μ L, angiotensina II (10 μ g/0,2 μ l), sendo todas dissolvidas em solução salina (Nacl 0,9%) e foi utilizado para a depleção de sódio o diurético furosemida (Lasix) 10mg/ml obtida do laboratório Sanofi Aventis, São Paulo, Brasil. As concentrações e volumes foram escolhidos baseados em dados da literatura e também em trabalhos prévios do nosso laboratório (DE OLIVEIRA et.all,2007; NASCIMENTO, 2012).

A furosemida foi administrada por via subcutânea (s.c.), e os demais fármacos foram injetados diretamente no MnPO por meio de uma seringa de 10 μ l (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica nº 30G com 14 mm, através de um tubo de polietileno (PE10) com aproximadamente 30 cm de comprimento. As injeções foram feitas lentamente, aproximadamente durante 60 segundos e a agulha injetora foi mantida no local por mais 60 segundos para evitar o refluxo de líquido nas cânulas.

Como veículo, foi utilizada solução salina isotônica 0.9%, também injetada diretamente no encéfalo por meio de uma seringa de Hamilton de 10 μ l.

5.5 HISTOLOGIA

Após a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com associação de cetamina (80mg/kg) e xilazina (11,5mg/kg) via intraperitoneal (i.p.), e submetidos a perfusão transcardíaca. Inicialmente com solução salina glicosada e em seguida com formol a 10% com o objetivo de fixação. Logo após, os cérebros foram removidos da calota craniana e conservados em formol a 10% durante 7 dias, sendo posteriormente transferidos para

recipientes contendo formol glicosado a 30%. Os cortes histológicos dos encéfalos foram feitos em criostato com espessura de 40µm e montados em lâminas previamente gelatinadas. Após a secagem em estufa a 50°C por 24 horas os cortes dos encéfalos foram corados com cresil violeta 2%. Posteriormente as lâminas foram analisadas e apenas os dados dos animais onde o sítio da injeção foi o núcleo preóptico mediano (MnPO) foram incluídos neste estudo.

5.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.6.1 DEPLEÇÃO DE SÓDIO

Para induzir o apetite por sódio utilizou-se o diurético furosemida, que bloqueia o co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ na porção ascendente da alça de Henle, desta forma diminuindo a reabsorção deste eletrólito e promovendo aumento da diurese e da natriurese. (LUNDY, et. al., 2003). Quatro dias após a cirurgia de implantação das cânulas, e 24 horas antes dos experimentos os animais foram submetidos ao protocolo de depleção de sódio. Para isso eles foram pesados e receberam injeção subcutânea (s.c) do diurético furosemida (10mg/ml/rato). Em seguida foram colocados em caixas individuais forradas com papel absorvente. Durante o período de 4 horas subsequentes os animais foram trocados de caixa a cada 1 hora devido ao grande volume urinário e nesse tempo não tiveram acesso a alimento, água ou solução salina hipertônica. Após esse período os animais foram novamente pesados e transferidos para caixas contendo maravalha, recebendo água destilada e dieta livre de sódio (fubá de milho cozida em água destilada).

No dia seguinte os animais foram pesados, trocados de caixas e iniciaram-se os procedimentos experimentais.

5.6.2 PROTOCOLO DO TESTE DE SOBREMESA

O teste de sobremesa já está bem estabelecido na literatura como forma de avaliação de resposta hedônica e de palatabilidade às soluções. Estudos anteriores do nosso laboratório também utilizaram este protocolo (LUZ et. al, 2007; CERQUEIRA et. al, 2016).

Cinco dias antes do experimento, os animais tiveram cânulas implantadas no MnPO como já descrito anteriormente, sendo que para realização deste protocolo após a cirurgia central, eles ficaram em caixas individuais e foram oferecidas ração e água filtrada. No dia

seguinte, bem como pelos outros quatro dias subsequentes, os animais foram manipulados e ambientados às condições experimentais, algo que consistia em pesá-los e transferi-los para uma caixa forrada com papel absorvente branco. Foram ofertados durante duas horas, bebedouros graduados contendo água destilada e solução de sacarina a 0,1%. Durante esse período não era oferecida ração. Após isso eles eram novamente transferidos para caixas contendo maravalha, recebiam ração e água filtrada e tinham seus mandris trocados. No último dia de treino vinte e quatro horas antes do experimento eles eram privados de água.

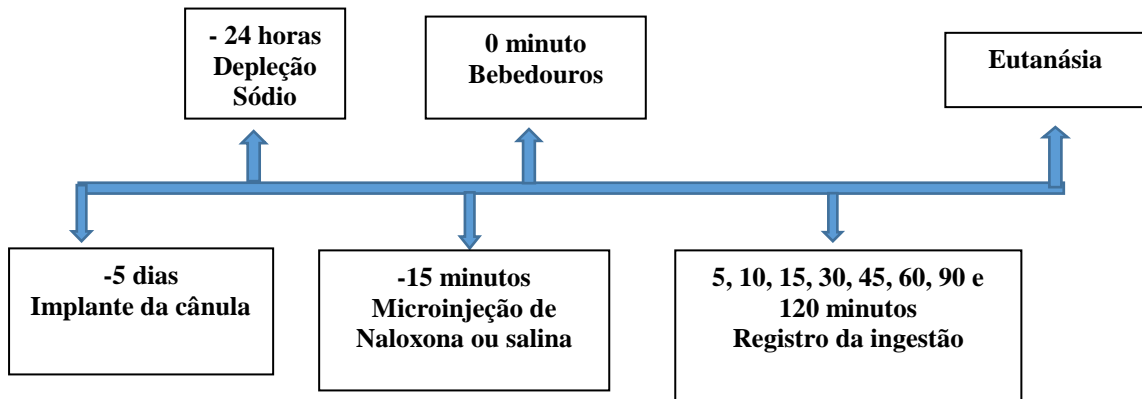
5.6.3 PROTOCOLO DO TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto consiste em colocar os animais em uma arena cilíndrica tendo como medidas 60 cm de diâmetro e 60 cm de altura, com o assoalho marcado com oito áreas de 42,43 cm² e a parte superior aberta. A locomoção dos animais pelos espaços demarcados, foi observada e registrada durante dez minutos, sendo que apenas quando o animal colocava as quatro patas dentro do espaço delimitado era contabilizada uma área.

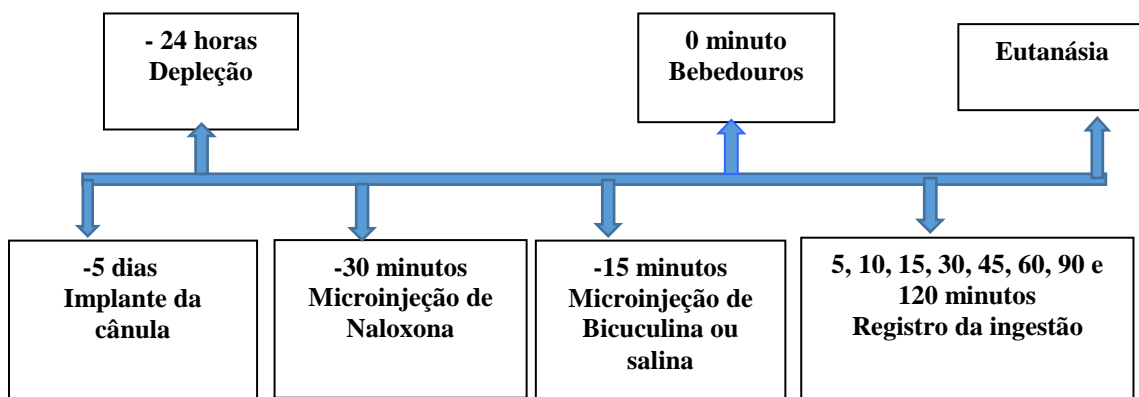
O experimento foi realizado no quinto dia após a implantação das cânulas no MnPO, o treinamento e a depleção foram semelhantes aos já descritos anteriormente. Os animais não foram colocados na arena durante os dias de treinamento, pois isso poderia deixá-los habituados à mesma levando-os a não explorar a área no dia do experimento.

5.7 DESENHOS EXPERIMENTAIS

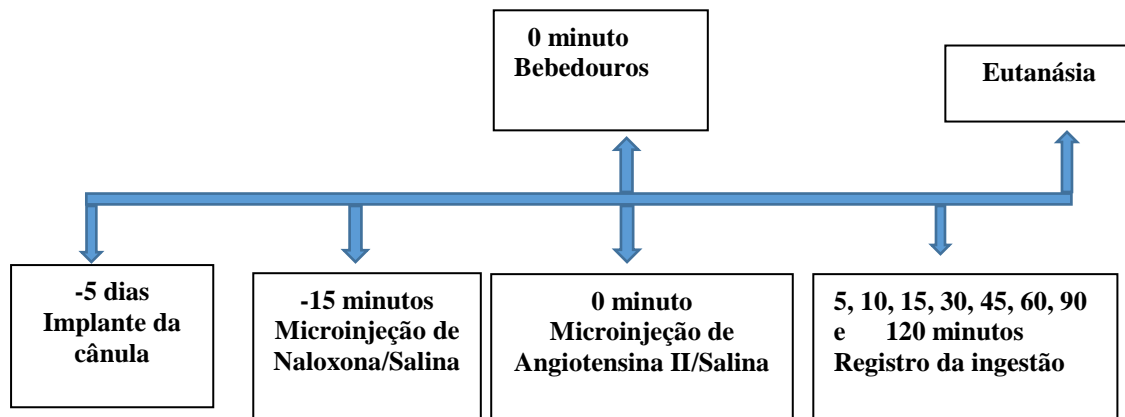
Desenho Experimental 01- Após 24h do procedimento de depleção de sódio os animais foram pesados e receberam as microinjeções encefálicas de naloxona, nas concentrações 3, 6 ou 12 nmol/0,2µl. O grupo controle recebeu microinjeção encefálica de solução salina isotônica (0,9%) no mesmo volume de 0,2µl. Quinze minutos após as microinjeções, os animais receberam bebedouros graduados contendo água destilada e solução salina hipertônica 1,5%. O volume ingerido foi registrado cumulativamente nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Durante o experimento os animais não tiveram acesso a ração.



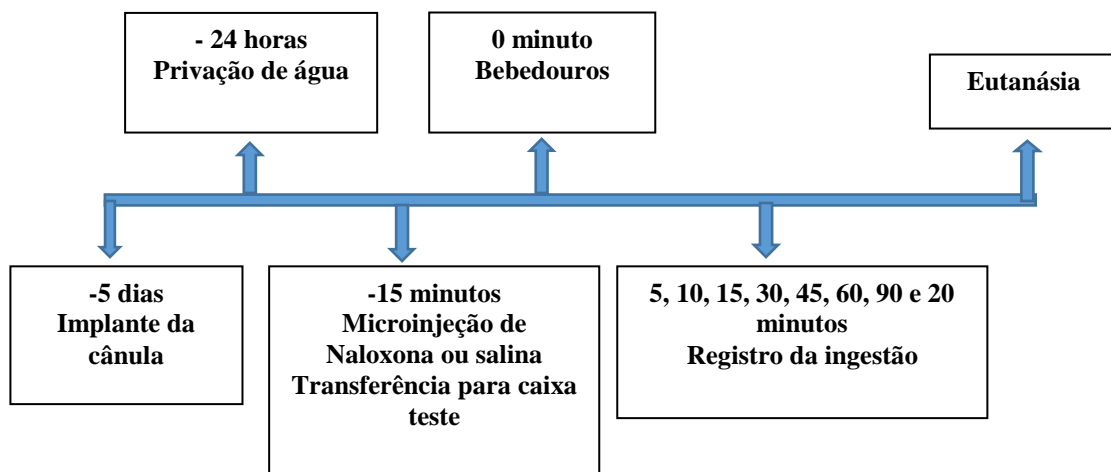
Desenho Experimental 02 - Após 24h do procedimento de depleção de sódio os animais foram pesados e receberam as microinjeções encefálicas de naloxona, na concentração 12nmol/0,2µl. Após 15 minutos receberam as injeções de Bicuculina 2nmol/0,2µl ou solução salina 0,9%. Quinze minutos após a segunda microinjeção, os animais receberam bebedouros graduados contendo água destilada ou salina hipertônica 1,5%. O volume ingerido foi registrado nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos de forma cumulativa. Durante o experimento os animais não tiveram acesso a ração.



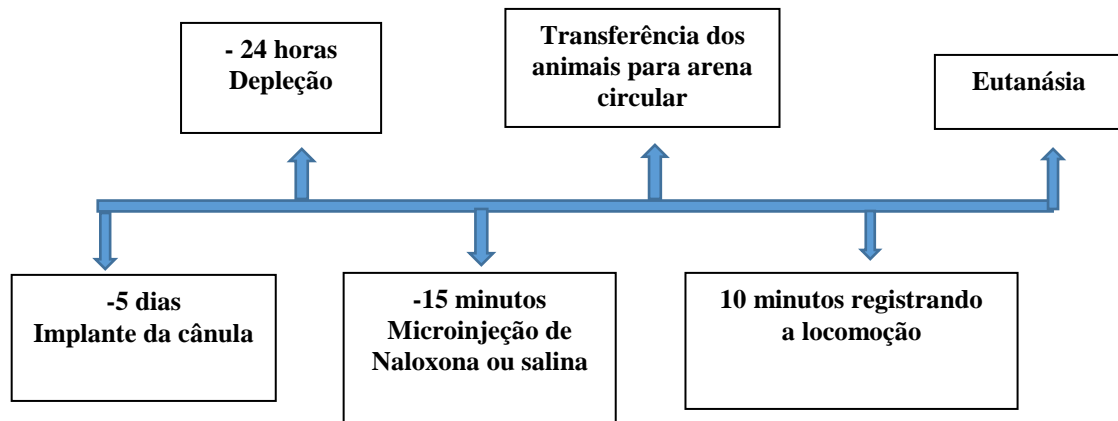
Desenho Experimental 03 - Inicialmente os animais foram pesados e receberam microinjeções de Naloxona 12nmol/0,2µl ou salina 0,9% no mesmo volume. Após 15 minutos receberam as microinjeções de Angiotensina II 10ng/0,2µl ou salina 0,9%. Logo em seguida foram oferecidos bebedouros graduados contendo água destilada ou salina hipertônica 1,5%. O volume ingerido foi registrado nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos de forma cumulativa. Durante o experimento os animais não tiveram acesso a ração.



Desenho Experimental 04- No dia das sessões experimentais, os animais receberam microinjeções de salina 0,9% ou naloxona 12 nmol no mesmo volume 0,2µl e após quinze minutos foram transferidos para a caixa forrada com papel absorvente branco e receberam bebedouros graduados contendo solução de sacarina 0,1% ou água destilada. O volume ingerido tanto de água quanto de solução de sacarina foi observado durante 120 minutos, e nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o oferecimento do bebedouro foram cumulativamente registrados os volumes ingeridos.



Desenho Experimental 05- No dia do experimento, os animais receberam as microinjeções de naloxona 12nmol/0,2 µL, ou salina isotônica estéril 0,9% 0,2 µL e após 15 minutos foram colocados dentro da arena por 10 minutos, uma área era contabilizada como percorrida assim que o animal colocasse as quatro patas dentro de suas limitações.



6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados obtidos foi realizada pelo “software” GraphPad-Prism versão 6.0. Para analisar o efeito das microinjeções de naloxona, da bicuculina e angiotensinaII, no encéfalo sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon e comparar cada tratamento no tempo correspondente com o grupo controle, utilizou-se ANOVA *two-way* para medidas repetidas, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O teste de sobremesa foi analisado também por meio da ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. E por fim, o teste de campo aberto foi avaliado através do teste t-Student não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, e os dados foram apresentados como média e erro-padrão (média \pm SEM).

7 RESULTADOS

Análise histológica

As figuras abaixo mostram a fotomicrografia típica do corte cerebral no MnPO, sítio das microinjeções deste estudo, seguida pela representação no diagrama de Paxinos e Watson 1998.

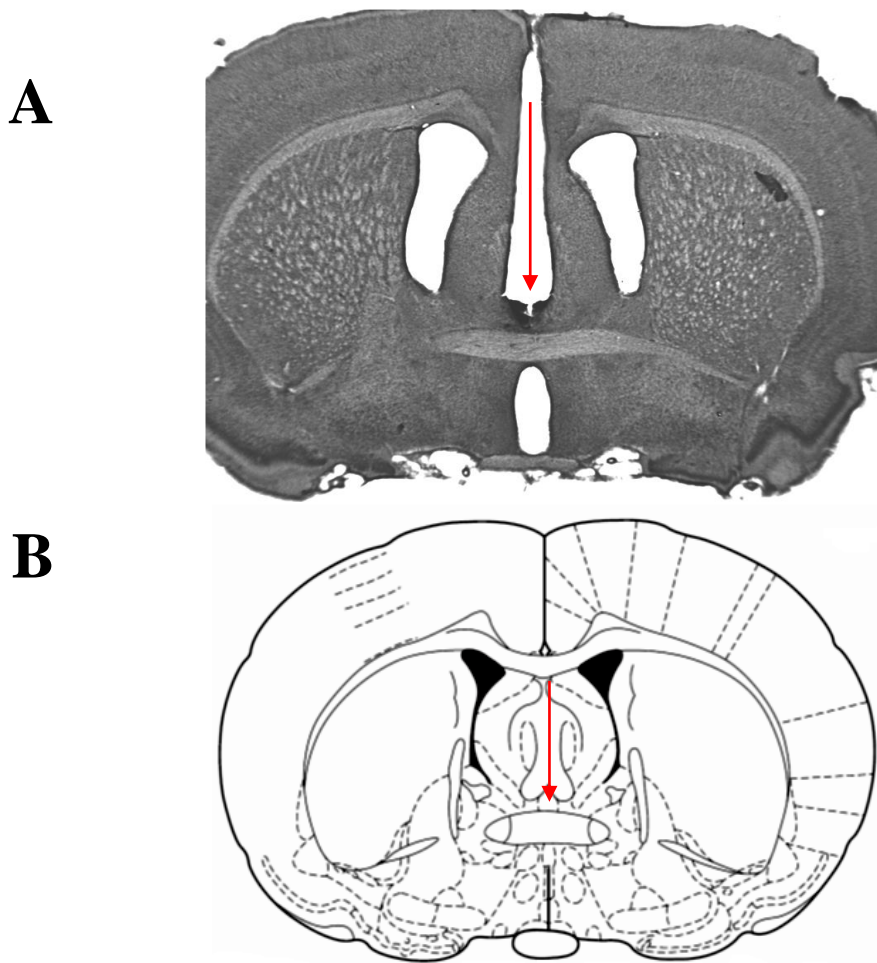


Figura 04. Fotomicrografia típica (A) e diagrama (Watson & Paxinos, 1998) (B) do corte de cérebro de rato mostrando o local da microinjeção **no MnPO** (seta vermelha).

Efeito de microinjeções de naloxona no MnPO sobre a ingestão cumulativa de salina 1,5% e água em animais depletados de sódio.

O objetivo deste protocolo foi investigar o papel dos receptores mu-opioides presentes no núcleo preóptico mediano no controle do apetite por sódio.

A administração de naloxona em diferentes concentrações no MnPO, reduziu a ingestão de solução salina hipertônica 1,5% e não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 12 (n=11), 6 (n=11) e 3nmol/0,2µl (n=10), todas inibiram a ingestão de sódio de forma semelhante, quando comparadas ao grupo controle (n=11). É possível observar que as três concentrações começaram a ser estatisticamente diferentes do controle no tempo de 10 minutos e assim permaneceram até o final do experimento aos 120 minutos. A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, indica que houve diferença estatística significativa na interação $F(21, 273) = 12$; $p < 0,0001$, tempo $F(7, 273) = 56$; $p < 0,0001$ e droga $F(3,39) = 24$; $p < 0,0001$.

Como é possível observar na figura 5 (B), durante todo o experimento, a ingestão de água permaneceu inalterada, tanto no grupo controle, como nos grupos que receberam naloxona em qualquer uma das três concentrações. A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, mostra que não houve diferença estatística significativa na interação $F(21, 273) = 0,97$; $p = 0,5043$, tempo $F(7, 273) = 0,95$; $p = 0,4675$ e droga $F(3, 39) = 0,54$; $p = 0,6574$.

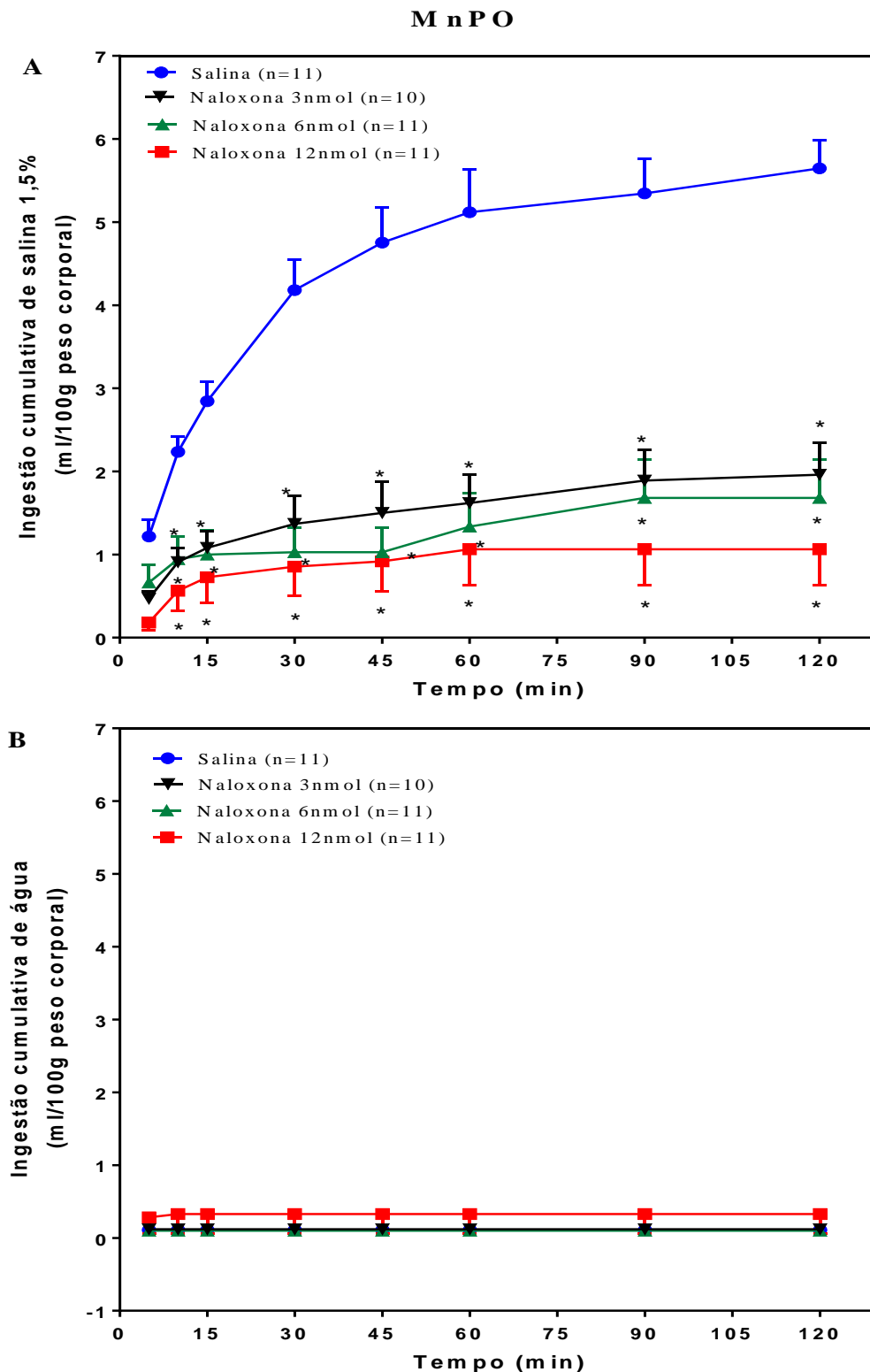


Figura 05. (A) Ingestão cumulativa de salina 1,5%; (B) Ingestão cumulativa de água em animais depletados de sódio, após microinjeção no MnPO de naloxona nas concentrações 12 (n=11), 6 (n=11), e 3nmol/0,2 μ l (n=10), ou salina isotônica 0,9%. Os asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controle (n=11) em cada tempo. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias de modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

Efeito de microinjeções de naloxona associada com bicuculina no MnPO sobre a ingestão cumulativa de solução salina 1,5% e água em animais depletados de sódio.

O objetivo deste protocolo foi investigar se o bloqueio dos receptores GABAérgicos presentes no MnPO é capaz de reverter o efeito antinatriorexigênico induzido pelo bloqueio dos receptores mu-opiíde nesta área.

A administração de microinjeções de naloxona 12 nmol/0,2µl (naloxona + salina) (n=9) em ratos depletados de sódio, inibiu a ingestão de solução salina hipertônica 1,5% desde os 5 minutos iniciais permanecendo até o fim das sessões experimentais aos 120 minutos ($0,1 \pm 0,1$ ml/100g de peso corporal), ($0,5 \pm 0,2$ ml/100g de peso corporal) respectivamente, em relação ao grupo controle (salina+salina) (n=9), ($1,3 \pm 0,2$ ml/100g de peso corporal), ($5,6 \pm 0,3$ ml/100g de peso corporal). Contudo ao associar o naloxone 12 nmol com o antagonista gabaérgico bicuculina (2nmol n=9) este efeito antinatriorexigênico diminuiu. A partir do tempo de 45 até os 120 minutos observa se diferença estatística significativa entre naloxona associado com bicuculina ($1,6 \pm 0,5$ ml/100g de peso corporal), ($2,8, \pm 0,3$ ml/100g de peso corporal), em relação à naloxona sozinha ($0,5 \pm 0,2$ ml/100g de peso corporal), ($0,5 \pm 0,2$ ml/100g de peso corporal), mas apesar disso, o efeito inibitório em relação ao grupo controle não foi totalmente revertido, visto que houve diferenças estatisticamente significativa entre o grupo (salina + salina) e (bicuculina + naloxone). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, indica que houve diferença estatística significativa na interação $F(14, 168) = 15,57$; $p < 0,0001$, tempo $F(7, 168) = 61,42$; $p < 0,0001$ e droga $F(2,24) = 49,56$; $p < 0,0001$.

Como é possível observar na figura 6 (B), durante todo o experimento, a ingestão de água permaneceu inalterada, tanto no grupo controle, como nos grupos que receberam naloxona e também naloxona associado com bicuculina. A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, mostra que não houve diferença estatística significativa na interação $F(14, 168) = 0,0$; $p > 0,9999$, tempo $F(7, 168) = 0,0$; $p > 0,9999$ e droga $F(2, 24) = 0,40$; $p = 0,6747$.

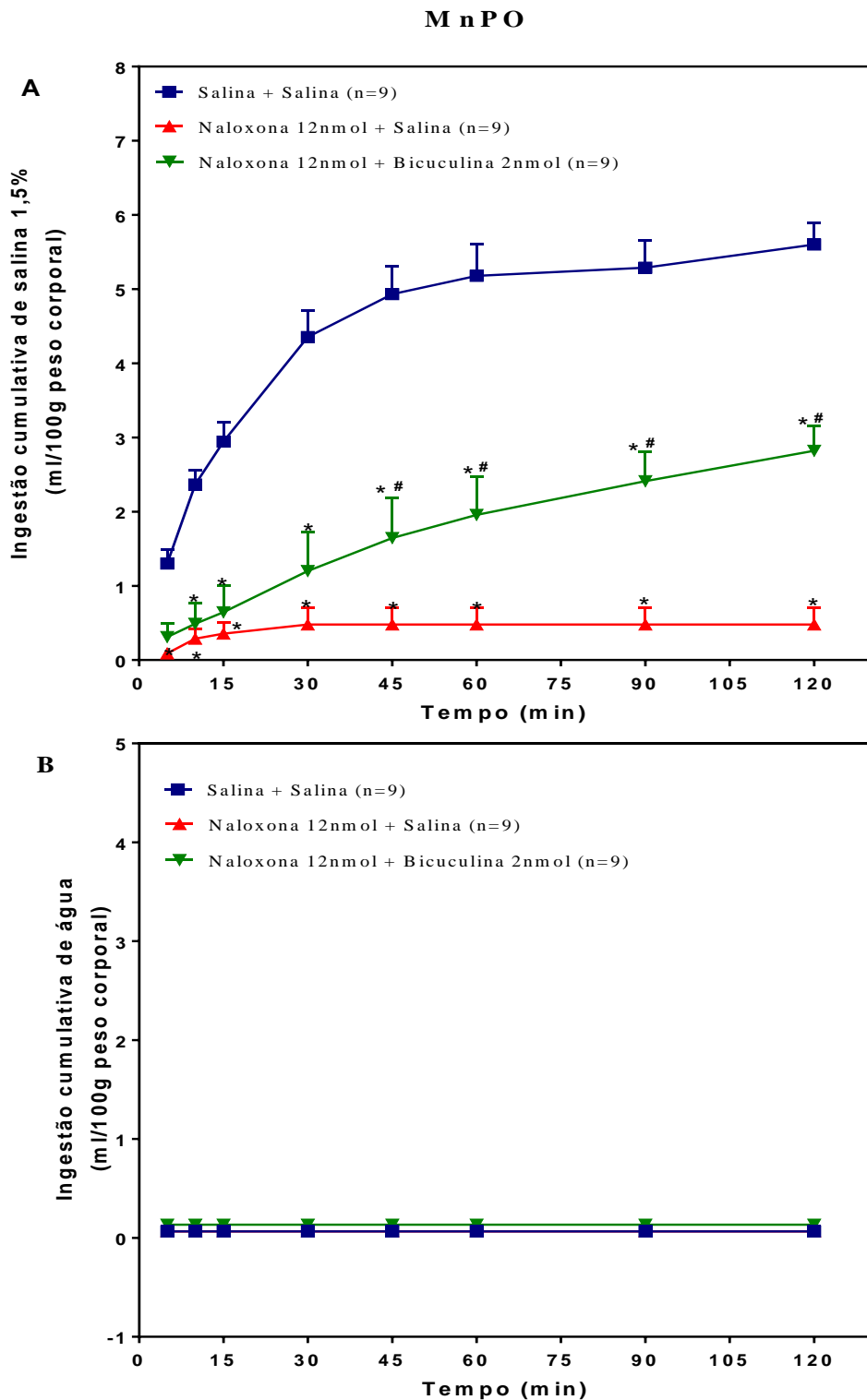


Figura 06. (A) Ingestão cumulativa de salina 1,5% em animais depletados de sódio, (B) Ingestão cumulativa de água, após microinjeção de naloxona 12nmol/0,2 μ l (n=9), naloxona 12nmol/0,2 μ l + bicuculina 2nmol/0,2 μ l (n=9), ou salina isotônica 0,9% (n=9). O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controle, (#) indica diferença estatística significativa entre o grupo naloxona 12nmol + salina 0,9% /0,2 μ l e naloxona 12nmol + bicuculina 2nmol/0,2 μ l . Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

Efeito de microinjeções de Angiotensina II e Angiotensina II associada à naloxona no MnPO sobre a ingestão cumulativa de salina 1,5% e água em animais normonatrêmicos.

A administração de Angiotensina II, na concentração de $10\mu\text{g}/0,2\mu\text{l}$ em animais normonatrêmicos ($n=4$) no MnPO, aumentou significativamente a ingestão de salina hipertônica 1,5% (FIGURA 7A) a partir dos 15 minutos iniciais do experimento e perdurou por toda duração até os 120 minutos ($1,7 \pm 0,5\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal), ($3,3 \pm 1,0\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal) comparado aos animais que receberam microinjeções de salina ($0,1 \pm 0,1\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal), ($0,2 \pm 0,1\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal). Entretanto, este efeito foi inibido de forma significativa a partir do tempo 30 e permaneceu até o fim da sessão experimental aos 120 minutos ($2,2 \pm 0,7\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal) ($3,3 \pm 1,0\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal) quando foram feitas microinjeções de angiotensina II $2\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ associada com naloxona 12nmol ($0,4 \pm 0,2\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal), ($0,5 \pm 0,2\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal). A análise de variância, modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, indica que houve diferença estatística significativa na interação $F(14,98) = 6,6$; $p < 0,0001$, tempo $F(7, 98) = 12$; $p < 0,0001$ e droga $F(2,14) = 10$; $p < 0,0019$.

Como é possível notar na FIGURA 7B, a ingestão de água não se alterou de maneira estatisticamente significativa, embora os animais que receberam microinjeções de angiotensina II + salina ($n=4$) tenham apresentados valores de ingestão superior àqueles que foram tratados com salina + salina ($n=7$) ou naloxona associada com angiotensina II ($n=7$). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, indica que não houve diferença estatística significativa na interação $F(14,98) = 0,85$; $p = 0,6191$, tempo $F(7, 98) = 4,4$; $p < 0,0003$ e droga $F(2,14) = 1,5$; $p = 0,2548$.

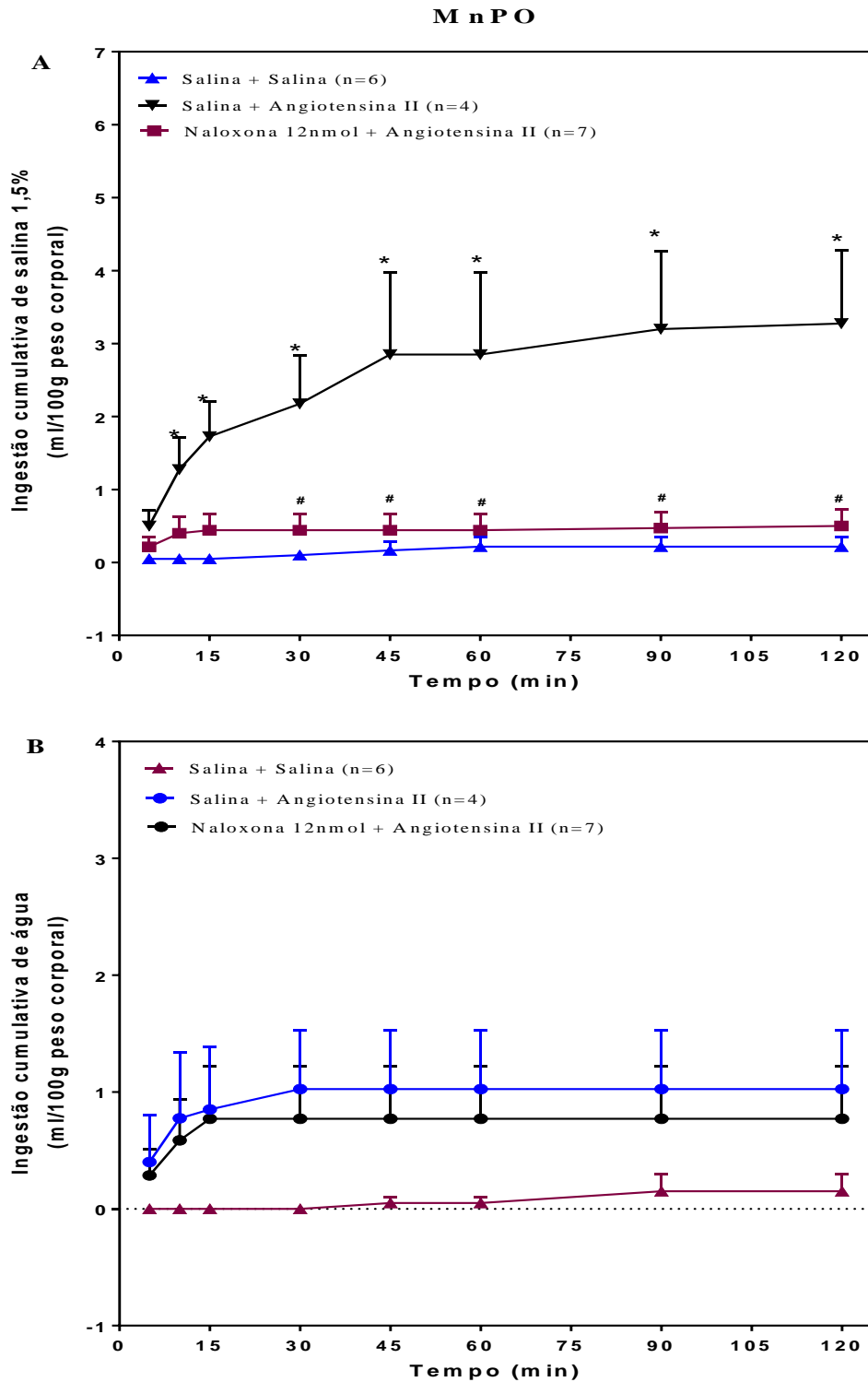


Figura 07. (A) Ingestão cumulativa de salina 1,5%; (B) Ingestão cumulativa de água, em animais normonatrêmicos e normohidratados, após microinjeção de angiotensina II 10 μ g + salina 0,9% ou angiotensina II 10 μ g + naloxona 12nmol ou salina 0,9% + salina 0,9% todas no volume de 0,2 μ l no MnPO. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controle e (#) indica diferença estatística em relação aos animais do grupo salina + angiotensina II. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA *two-way* modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções de naloxona 12nmol ou salina 0,9% no MnPO.

O bloqueio dos receptores mu-opioides endógenos no MnPO com naloxona provocou inibição significativa da ingestão de solução de sacarina 0,1% nos animais que receberam naloxona 12nmol/0,2µl (n=5) quando comparados com o grupo controle (n=6) ($4,5 \pm 0,5$ ml/100g de peso corporal) e ($8,2 \pm 0,8$ ml/100g de peso corporal). Quanto a ingestão de água, embora os animais do grupo controle tenham bebido menos, não houve diferença estatística significativa daqueles animais tratados com microinjeções de naloxona 12 nmol ($0,9 \pm 0,5$ ml/100g de peso corporal) ($1,5 \pm 0,7$ ml/100g de peso corporal). A ingestão de solução de sacarina foi significativamente maior do que a ingestão de água entre os animais do grupo controle, mas não foi diferente entre os animais que receberam as microinjeções de naloxona 12nmol no MnPO. A análise de variância, modelo misto de duas vias para medidas repetidas com um fator de variação, indica que houve diferença estatística significante na interação $F(1,18) = 10,37$; $p=0,0047$, ingestão $F(1,18) = 58,24$; $p<0,0001$ e droga $F(1,18) = 5,41$; $p=0,0318$.

Teste de Sobremesa

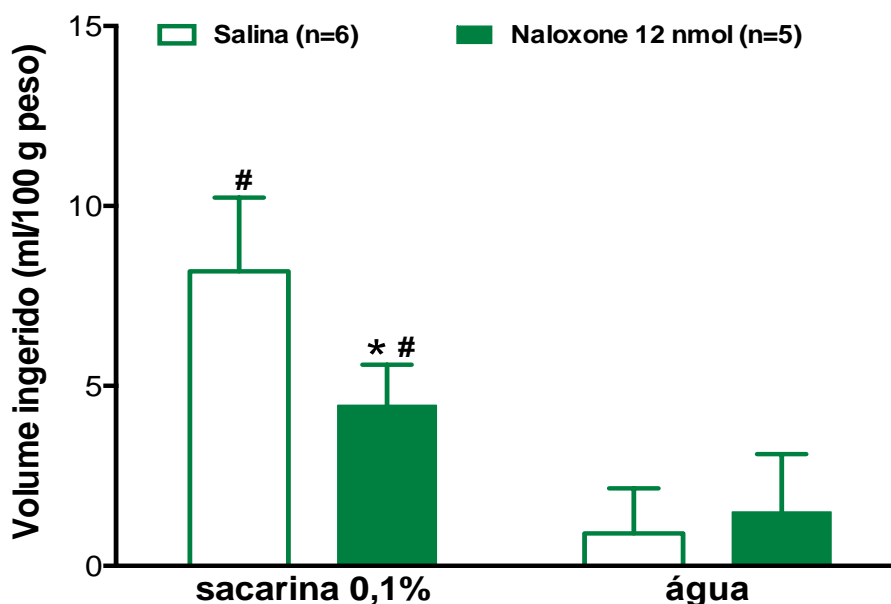


Figura 08: Teste de Sobremesa realizado em animais privados de água por 24 horas e tratados com naloxona 12 nmol/0,2µL no MnPO sobre a ingestão total de solução de sacarina 0,1% e de água. Os animais do grupo controle foram tratados com salina 0,9% (n=6; n=6, respectivamente). Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p<0,05$). O asterisco * indica a diferença na ingestão de sacarina entre animais tratados com salina (controle) e com naloxona e os símbolos # indicam a diferença entre ingestão de sacarina e água para o mesmo tratamento (salina ou naloxone).

Teste de campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções de naloxona 12nmol ou salina 0,9% no MnPO.

A figura 08 mostra o teste de campo aberto realizado para verificar se o bloqueio dos receptores mu-opioides no MnPO altera a atividade locomotora dos animais. É possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle que recebeu microinjeções de solução salina 0,9% e o grupo experimental tratado com naloxona 12nmol/0,2µl ($34,0 \pm 4,0$ ml/100g de peso corporal) e ($34,6 \pm 5,0$ ml/100g de peso corporal). Portanto o bloqueio dos receptores mu-opioides não altera atividade locomotora de ratos depletados de sódio. A análise não pareada do teste “t” de Student indica $t=0,09416$; $dfn=9$; $dfd=9$; $p=0,9260$.

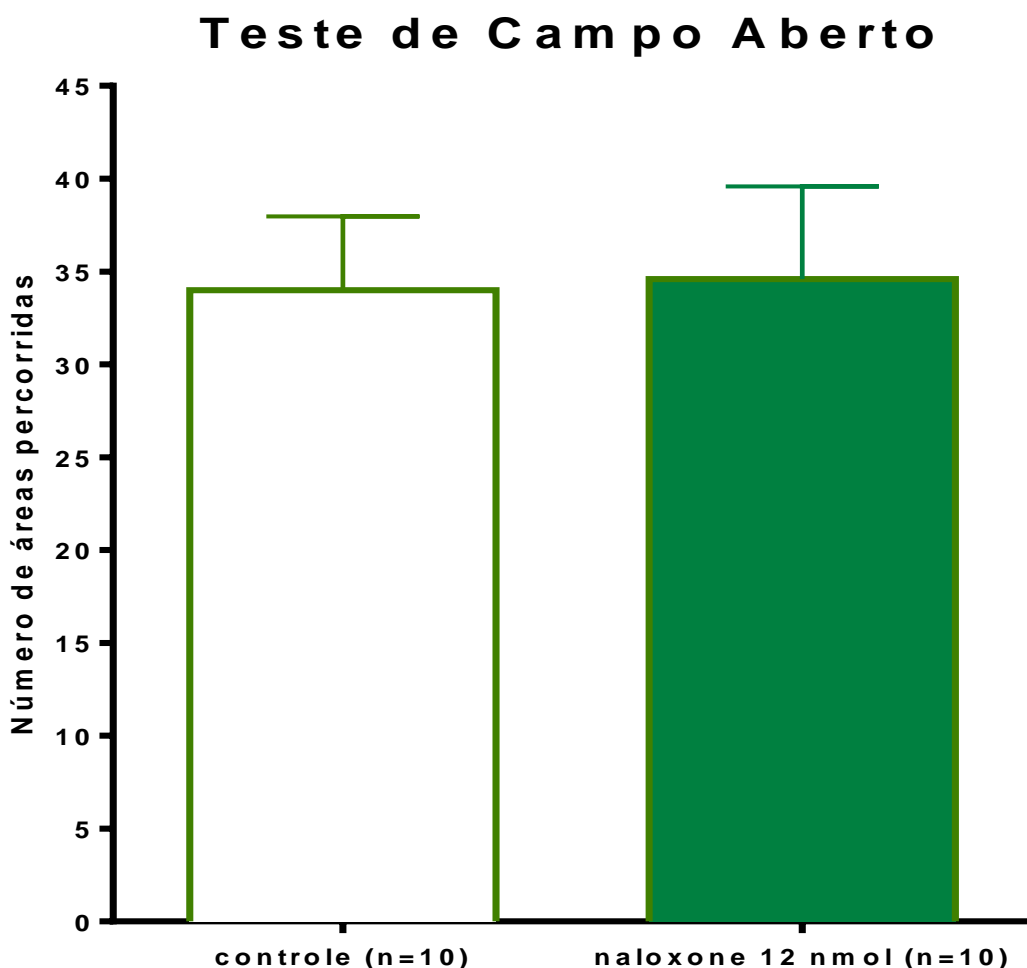


Figura 09: Teste de Campo Aberto realizado em animais depletados de sódio e tratados com naloxona 12nmol/0,2µL ou salina 0,9% no mesmo volume no MnPO. Os animais controles foram tratados com salina (n=10; n=10; respectivamente). Os dados são apresentados como médias \pm EPM. A análise estatística foi feita por meio do Teste “t” de Student não pareado, $p < 0,05$.

8 DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos que o bloqueio dos receptores mu-opioides no MnPO foi capaz de inibir o apetite por sódio em ratos depletados deste íon. Este efeito inibitório sobre a ingestão de sódio foi reduzido pelo bloqueio GABAérgico no MnPO. Além disso, verificou-se também que o bloqueio dos receptores mu-opioides inibiu a ingestão de sódio induzida pela administração de angiotensina II no MnPO. O efeito antinatriorexigênico da naloxona no MnPO não parece ter sido devido a alterações na atividade locomotora dos animais, uma vez que o “teste de campo aberto” não apresentou diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com naloxona. Por outro lado, este efeito pode ter sido, ao menos em parte, devido a redução na palatabilidade, pois no “teste de sobremesa” se observou diminuição da ingestão de solução palatável (sacarina).

A naloxona, que foi utilizada como ferramenta farmacológica no presente estudo, tem atividade antagonista específica para receptores opioides apresentando maior seletividade para os receptores mu-opioides do que para os receptores dos tipos delta e kappa (CHEN; VU; BELL, 1993; TOLL et al., 1998). Este antagonista mu-opioides já foi utilizado em estudo prévio, quando injetado em baixas doses é capaz de alterar a secreção de hormônios hipofisários, aumentar a sensibilidade a dor e modificar o comportamento sexual. Esses efeitos são característicos do bloqueio dos receptores mu-opioides relacionados às endorfinas (BROWN; HOLTZMAN, 1981).

A ideia central do presente trabalho foi baseada principalmente nos estudos de Shimizu e colaboradores (2007), Grondin e colaboradores (2011), Pavan e colaboradores (2015) e Yan e colaboradores (2013). O primeiro estudo mostra que quando há aumento na concentração de sódio no plasma e no líquido cefaloraquidiano, isto é detectado por células gliais (astrocíticas e endoteliais) que apresentam canais Na_x e estão localizadas na parede dos OCVs, especialmente do SFO. A informação de alteração do balanço de sódio é transmitida a núcleos encefálicos envolvidos no comportamento ingestivo, tais como MnPO, SFO, LPBN e amígdala. Com o aumento da concentração de sódio no meio extracelular, os canais Na_x se abrem e o sódio começa a entrar nas células. Este influxo de Na^+ aumenta o gasto energético, e isto leva a captação de glicose e ativação da via da glicólise anaeróbica. Desta forma, o lactato, produto final deste processo, é liberado pelas células e utilizado como substrato por neurônios GABAérgicos que apresentam papel modulatório negativo no comportamento de ingestão de sal (SHIMIZU et al., 2007). No segundo estudo foi demonstrado que a depleção de sódio ativa a expressão de receptores mu-opioides no MnPO

(GRONDIN et al., 2011). Os outros dois estudos mostraram que a ativação dos receptores mu-opioides no LPBN e na CEA tem efeito natriorexigênico (YAN et al., 2013; PAVAN et al., 2015). Assim, nossa hipótese é que na depleção de sódio o aumento da atividade opioidérgica irá desinibir o comportamento ingestivo e os animais irão aumentar o apetite por sódio e que as vias GABAérgicas e angiotensinérgicas centrais participam deste mecanismo de controle.

Para testar a primeira hipótese foi feito o bloqueio dos receptores mu-opioides e como esperado esse bloqueio levou à inibição da ingestão de sal. Em 2015, Pavan e colaboradores mostraram que a ativação dos receptores mu-opioides no LPBN aumenta a ingestão de sal e este aumento é revertido pelo bloqueio destes receptores com um antagonista seletivo. Ainda neste estudo, foi observado aumento significativo na ingestão de água (PAVAN et al., 2015). Este último efeito foi diferente do observado no presente trabalho e isso, pode se justificar pela diferença de protocolos utilizados nos dois estudos. No presente trabalho, após quatro horas de depleção foram oferecidas água e dieta hipossódica aos animais por aproximadamente 24 horas, permitindo assim, a reposição do volume do LEC. Portanto, os experimentos foram realizados com os animais em condições de normovolemia e hiponatremia. No estudo de Pavan diferindo de nosso estudo, as microinjeções foram realizadas 45 minutos após a depleção e o registro da ingestão iniciou-se 15 minutos após, ou seja, uma hora após a depleção, sem que os animais tivessem tido acesso a água, e, portanto, apresentavam hipovolemia e hiponatremia. Em estudos anteriores do nosso laboratório, realizados para elucidar a participação dos opioides na ingestão de sal, e que utilizaram metodologias semelhantes ao do presente estudo, também não foram observadas diferenças na ingestão de água entre o controle e o grupo experimental tratados com antagonistas opioides (NASCIMENTO et al., 2012, 2014).

Nossa segunda hipótese foi que na depleção de sódio a ativação de receptores mu-opioides no MnPO seria capaz de inibir os neurônios GABAérgicos, produzindo efeito desinibitório sobre a motivação para ingestão de sódio. Para testar esta hipótese foi feito primeiro o bloqueio farmacológico dos receptores mu-opioides e em seguida o bloqueio dos receptores GABAérgicos. Observou-se redução do efeito antinatriorexigência promovida pelo bloqueio dos receptores mu-opioides. GABA é um neurotransmissor inibitório amplamente distribuído no sistema nervoso central e sua ação depende da ligação com um de seus receptores, GABA_A e GABA_B. A participação das vias GABAérgicas no comportamento ingestivo vem sendo estudada por diferentes grupos de pesquisa.

No presente trabalho foi possível observar a interação entre os neurotransmissores GABAérgicos e opióides, no MnPO. A naloxona administrada isoladamente inibiu a ingestão de sódio, mas quando foi associada ao antagonista GABAérgico, bicuculina, observou-se redução deste efeito antinatriorexigêntico. A interação GABA/opióide foi verificada em outros estudos. Buscando explicar como o bloqueio dos opióides diminui o consumo de substâncias palatáveis como chocolates, a explicação encontrada foi que bloqueando os receptores mu-opióides no VTA, ocorreu desinibição dos neurônios GABAérgicos e isso, conseqüentemente reduziu a liberação de dopamina no núcleo accumbens (NATHAN; BULLMORE, 2009). Outro estudo realizado com o objetivo de compreender os mecanismos pelos quais a ativação dos receptores mu-opióides na amígdala basolateral levava a analgesia, concluiu que a ativação desses receptores inibe os neurônios GABAérgicos da BLA que se projetam para a CEA (FINNEGAN; CHEN; PAN, 2006). Vindo de encontro aos nossos resultados foi demonstrado que no hipotálamo lateral a bicuculina atenuou o efeito inibitório da naloxona no comportamento alimentar (ARDIANTO et al., 2016). Estes dados corroboram a ideia deste trabalho que pressupõe que a ativação dos receptores mu-opióides, inibe os neurônios GABAérgicos o que desinibe o comportamento ingestivo. Em outros estudos, observou-se em ratos saciados que a inibição da atividade neuronal no LPBN, através da ativação dos receptores GABA_A, induz ingestão de água e cloreto de sódio (CALLERA et al., 2005). Ao contrário, a ativação do LPBN pelo bloqueio dos receptores GABA_A e GABA_B em ratos depletados de sódio não afetou a ingestão de sal ou água, enquanto que a ativação dos neurônios GABA_A com muscimol levou a inibição da ingestão de sal (DE OLIVEIRA et al., 2007). Pode-se concluir, destes estudos que o LPBN tem papel funcional inibitório sobre o apetite por sódio mediado por vias GABAérgicas.

No presente estudo além de inibir o apetite por sódio, induzido pela depleção de sódio, a naloxona também inibiu significativamente a ingestão de sódio após administração central de angiotensina II. A depleção de sódio leva a um estado de desidratação do compartimento líquido extracelular que está associado a redução do volume total de líquidos corporais. Essa diminuição no volume é percebida pelos barorreceptores que são sensíveis à variação da pressão e faz com que o organismo responda de forma rápida através da estimulação simpática promovendo a retenção de água e sódio, além de respostas comportamentais como aumento do apetite por sódio e sede para restaurar o volume e garantir a perfusão dos órgãos cruciais à manutenção da vida (HURLEY et al., 2015).

Basicamente, os mecanismos periféricos e centrais são acionados, sendo que os periféricos envolvem o coração, vasos e rins e são modulados pelo sistema renina-

angiotensina-aldosterona, enquanto que os centrais são controlados pelos neurotransmissores e neuromoduladores no cérebro. O início da ativação do sistema renina angiotensina aldosterona ocorre com a liberação pelos rins da renina no plasma, então essa renina circulante cliva o angiotensinogênio em angiotensina I e esta sofre ação de uma enzima chamada enzima conversora de angiotensina localizada nos pulmões e vasos e se transforma em angiotensina II que irá promover a restauração da homeostase. A angiotensina II promove vasoconstrição e atua na liberação de dois hormônios a vasopressina e a aldosterona responsáveis pela reabsorção de água e sódio respectivamente (MCKINLEY; JOHNSON, 2004). Além disso, no sistema nervoso central, a angiotensina II atua como neurotransmissor e quando injetada em áreas relacionadas à homeostasia dos líquidos corporais ou mesmo nos ventrículos promove sede e aumento do apetite por sódio. Porém, quando circulante no líquido cérebro espinhal como hormônio, a angiotensina II é capaz de ativar os órgãos circumventriculares e assim também promove a liberação de vasopressina, a sensação de sede e o apetite por sódio. (JOHNSON, 2007; HURLEY et al., 2015). Além dos barorreceptores que detectam alterações no volume, na periferia, estão presentes os receptores para sódio localizados nas regiões hepatoportal, na cavidade orofaríngea, no trato gastrointestinal, rins e ainda quimiorreceptores linguais, que fornecem informações ao sistema nervoso central. Essas informações chegam através dos nervos cranianos VII (facial), IX (glossofaríngeo) e X (vago) inicialmente ao NTS que enviam projeções para outras áreas cerebrais (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; JOHNSON, 2007; BOURQUE, 2008).

Dados do presente trabalho corroboram estes achados e mostram que a administração de AII no MnPO aumenta a ingestão de água e de sódio como já havia sido demonstrado em outros estudos (NASCIMENTO et al., 2012; VOISIN; DROLET; MOUGINOT, 2012). A literatura mostra que AII quando injetada centralmente em ratos, em áreas envolvidas no controle do balanço hidroeletrolítico produz efeito natriorexigênico e dipsogênico (DANIELS AND FLUHARTY 2004). No presente trabalho demonstrou-se que o bloqueio dos receptores mu-opiídeos no MnPO foi capaz de inibir estes efeitos da AII. A literatura mostra ainda que há interações entre as vias angiotensinérgicas e GABAérgicas. A Angio II, atuando através de seus receptores AT1, pode modular a transmissão sináptica GABAérgica e este efeito dependerá se a ativação desses receptores for pré ou pós-sináptico (DA SILVA; MENANI; CALLERA, 2011). Se a angiotensina atuar em receptores pré-sinápticos reduz a liberação de GABA (LI; PAN, 2005). Por outro lado foi visto também que a administração crônica central de angiotensina II, aumentou seletivamente a expressão do receptor GABA_B, no NTS de ratos (ZHANG et al., 2009). No presente estudo sugerimos que a angiotensina esteja atuando pré-

sinapticamente, inibindo as vias GABAérgicas, o que faz com que aumente a ingestão de sódio. Com isso, quando a AII é associada a naloxona ocorre o efeito antinatriorexigênico, pois o naloxone impede o efeito inibitório da angiotensina II sobre os neurônios GABAérgicos no MnPO.

O MnPO é um núcleo integrativo que recebe projeções de neurônios noradrenérgicos, angiotensinérgicos de regiões importantes para o equilíbrio hidrossalino como o SFO e o OVLT. Além disso, as projeções do MnPO para o PVN são importantes para promoverem ajustes humorais e autonômicos necessários para restaurar a homeostase (MCKINLEY et al., 2015; DOS SANTOS MOREIRA et al., 2017). Apesar disso, há na literatura poucos trabalhos atuais mostrando o envolvimento direto desta área no controle do apetite por sódio. Um estudo mostrou que após lesão no MnPO, com ácido ibotênico, houve diminuição da ingestão de salina em animais depletados de sódio por injeção intraperitoneal de furosemida, mas não houve diferença na ingestão de salina em animais submetidos ao protocolo de privação hídrica (DE LUCCA; FRANCI, 2004). Fitts e colaboradores em 1990 mostraram que lesão da parte mais ventral do MnPO era capaz de diminuir a ingestão de sódio em animais depletados deste íon. Entretanto, é importante salientar que estes danos na parte mais ventral do MnPO podem atingir também a OVLT e, como já é sabido, lesões que comprometam apenas a OVLT também inibi o apetite por sódio em ratos (FITTS; TJEPKES; BRIGHT, 1990; MCKINLEY et al., 2015). Ficando desta forma inconclusivo o papel do MnPO na ingestão de sódio. Nosso estudo, nesse sentido é muito importante, pois foi possível observar que o bloqueio dos receptores mu-opiídeos presentes no MnPO inibe a ingestão de sódio em animais depletados desse íon.

Os dados do presente estudo sugerem que na depleção de sódio ocorre ativação dos peptídeos opiídeos endógenos e estes, uma vez ativados, podem ser capazes de inibir os neurônios GABAérgicos. Desta forma mecanismos inibitórios conduzidos pelo GABA deixariam de atuar e, com isso, mecanismos facilitatórios para a ingestão de sódio estariam liberados. AII quando associada a naloxona ocorre o efeito antinatriorexigênico, isso, sugere que a naloxona impede o efeito inibitório da angiotensina II sobre os neurônios GABAérgicos no MnPO. O diagrama abaixo sintetiza este possível mecanismo:

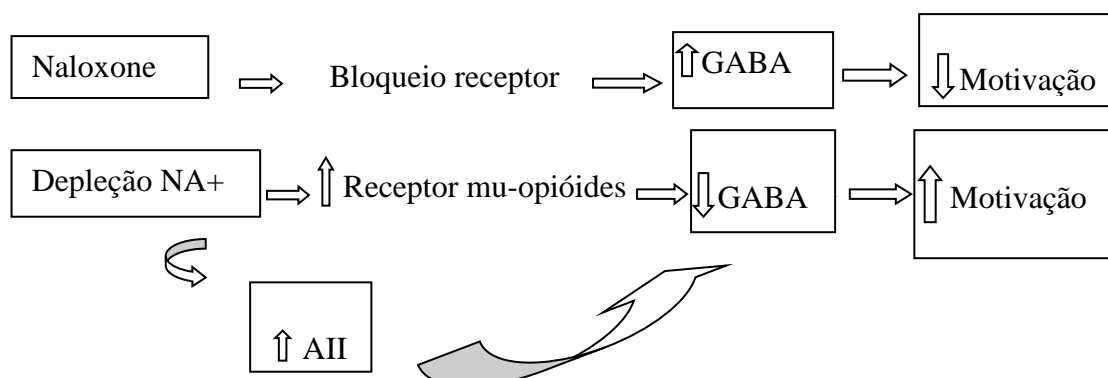


Figura 10. Diagrama esquemático indicando possíveis interações entre as vias GABAérgicas Angiotensinérgicas e Opioidérgicas na ingestão de sódio.

Adicionalmente, parte do efeito antinatriorexigênico, da naloxona encontrado no presente estudo, pode ser atribuído à diminuição do comportamento hedônico, uma vez que houve redução da ingestão de sacarina, uma substância palatável, pelos animais que tiveram os receptores mu-opioides bloqueados pela naloxona, quando comparados ao grupo controle. Já é sabido, que os opioides, em particular, os receptores do tipo mu, estão associados a aspectos hedônicos e prazerosos durante a ingestão de alimentos saborosos (NATHAN; BULLMORE, 2009a). Além disso, já é de conhecimento que a depleção de sódio é capaz de alterar a palatabilidade e, desta forma, uma solução com alta concentração de sódio que em condições normais seria aversiva em um estado de depleção passa a ser hedônica (HURLEY; JOHNSON, 2015).

Sabemos que as estruturas localizadas ao longo da lâmina terminal como o SFO, OVLT, MnPO, bem como outros núcleos romboencefálicos são capazes de detectar alterações na concentração de sódio do LEC e estas áreas atuam em conjunto com áreas do sistema límbico que promovem o comportamento motivado e de recompensa para juntos gerarem o comportamento de ingestão de sódio em caso de desequilíbrio homeostático (HURLEY et al., 2015). O comportamento motivado, seja para a ingestão de sódio, alimentos ou drogas de abuso é conduzido pelo sistema dopaminérgico mesolímbico, este circuito inicia-se com os neurônios de dopamina dentro da área tegmental ventral que se projetam para o núcleo acumbens e globo pálido ventral. A sinalização opioidérgica nesta via desempenha um papel importante na condução destes sistemas de recompensa e motivação (SMITH; LAWRENCE, 2017).

Alguns trabalhos mostram o envolvimento dos opióides no consumo de substâncias palatáveis. Microinfusões de DAMGO, agonista mu-opióide no acumbéns em ratos não privados, aumentou a ingestão de solução sacarina e salina (ZHANG; KELLEY, 2002). Adicionalmente microinjeções de morfina aumentaram a ingestão de gordura e açúcar (GOSNELL; LEVINE, 2009). Os agonistas mu-opióides aumentam o valor hedônico dos estímulos sensoriais naturais como o sabor doce e drogas de abuso (PECIÑA, 2008). No presente trabalho é possível observar isso, pois os animais do grupo controle ingeriram mais sacarina do que água, porém no grupo tratado com naloxona, não foi observada essa diferença. Portanto o bloqueio dos receptores mu-opióides parece influenciar a resposta hedônica à sacarina. Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho já foi descrito, Magnen e colaboradores mostraram que a administração periférica de naloxona aboliu a preferência por soluções doces, sacarina e glicose, mas não alterou a ingestão de água em ratos (LE MAGNEN et al., 1980). Contudo, novos estudos precisam ser realizados a fim de elucidar o mecanismo completo que levou a este resultado, considerando o envolvimento dos receptores opióides na palatabilidade, bem como no sistema de recompensa, especulamos que a dopamina possa ser o terceiro neurotransmissor envolvido nesta via. Para comprovar isto, seria interessante realização de estudos nos quais verificado se há redução na ativação de receptores de dopamina em áreas integrantes desses circuitos como o núcleo acumbéns, durante a realização do bloqueio dos receptores mu-opióides no MnPO.

Os peptídeos opióides podem alterar a atividade locomotora dependendo da dose utilizada e do tipo de experimento realizado. Em geral, receptores delta e mu-opióide estão relacionados com aumento dessa atividade, enquanto os receptores kappa diminuem a locomoção (FICHNA et al., 2007). Entretanto outros trabalhos do nosso laboratório que utilizaram metodologias semelhantes ao presente estudo, mostraram que tanto o bloqueio dos receptores kappa, como dos receptores delta, não alterou a atividade locomotora em ratos depletados de sódio (NASCIMENTO et al., 2012, 2014). No presente trabalho, afim de identificar se a atividade locomotora foi comprometida, realizou-se o “teste de campo aberto” e o resultado mostrou que, tanto o grupo de animais que foram tratados com naloxona, quanto os animais do grupo controle, percorreram quantidades semelhantes de áreas neste teste. Isso mostra que a naloxona não inibiu a atividade locomotora, portanto pode-se afirmar que os animais não buscaram a solução salina por diminuição na atividade locomotora, mas que, realmente houve uma diminuição do apetite por sódio provocada pelo bloqueio dos receptores mu-opióide no MnPO.

9 CONCLUSÃO

Em síntese é possível concluir que a atividade dos receptores mu-opioides no MnPO aumenta a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon. Além disso, os dados apresentados neste trabalho permitem afirmar que a atividade dos receptores mu-opioides no MnPO inibe neurônios GABAérgicos e por isso ocorre este aumento na ingestão de sódio.

Outro dado importante mostrado é a interação entre as vias Angiotensinérgicas e GABAérgicas no controle do apetite por sódio modulado pelos opioides endógenos. Pode-se afirmar que o efeito da naloxona em desinibir o GABA é preponderante em relação ao efeito inibitório da AII sobre o GABA.

A diminuição da ingestão de sódio no MnPO induzida pelo bloqueio dos receptores mu-opioides não foi devido à redução da atividade locomotora, mas parte do efeito antinatriorexigênico do bloqueio dos receptores mu-opioides pode ser explicado pela redução da palatabilidade. Portanto as vias opioidérgicas modulam tanto o aspecto hedônico, quanto o aspecto homeostático do apetite por sódio.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. B. G. et al. Reciprocal control of drinking behavior by median preoptic neurons in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 31, p. 8228–8237, 2016.

AKIL, H. et al. Endogenous opioids: biology and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 7, p. 223–255, 1984.

AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signalling and Behaviour. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, 2011.

ANDERSSON, B.; LEKSELL, L. G.; LISHAJKO, F. Perturbations in fluid balance induced by medially placed forebrain lesions. **Brain Research**, v. 99, n. 2, p. 261–275, 1975.

ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F. et al. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633–641, 3 fev. 2010.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.

ARDIANTO, C. et al. Opioid systems in the lateral hypothalamus regulate feeding behavior through orexin and GABA neurons. **Neuroscience**, v. 320, p. 183–193, 2016.

BLASS, E. M.; NUSSBAUM, A. I.; HANSON, D. G. Septal hyperdipsia: specific enhancement of drinking to angiotensin in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 87, n. 3, p. 422–439, 1974.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 519–531, jul. 2008.

BROWN, D. R.; HOLTZMAN, S. G. Suppression of drinking by naloxone in the rat: A further characterization. **European Journal of Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 331–340, 1981.

CALLERA, J. C. et al. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725–735, jan. 2005.

CAMARGO, M. P. A. G; CAMARGO, A. A. L.; SAAD, W. A. Vasopressin and angiotensin receptors of the medial septal area of the brain in the control of thirst and salt appetite induced by vasopressin in water-deprived and sodium-depleted rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 87, n. 4, p. 393–399, out. 2007.

CERQUEIRA, D. R. et al. Effects of interleukin-1 beta injections into the subfornical organ and median preoptic nucleus on sodium appetite, blood pressure and body temperature of sodium-depleted rats. **Physiology and Behavior**, v. 163, p. 149–160, 2016.

CHEN, Y. a N.; VU, L. E. I.; BELL, I. Pharmacological Characterization of the cloned Kappa, delta and mu-Opioid Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 45, p. 330–334, 1993.

CONTRERAS, R. J.; HATTON, G. I. Gustatory adaptation as an explanation for dietary-induced sodium appetite. **Physiology and Behavior**, v. 15, n. 5, p. 569–576, 1975.

COX, J. R.; CRUZ, C. E.; RUGER, J. Effect of total amygdalectomy upon regulation of salt intake in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 3, n. 5, p. 431–435, 1978.

DA SILVA, C. Z. C.; MENANI, J. V.; CALLERA, J. C. Natriorexigenic effect of baclofen is reduced by AT1 receptor blockade in the lateral parabrachial nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 5–6, p. 348–354, 2011.

DANIELS, D.; FLUHARTY, S. J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 319–37, abr. 2004.

DE ALMEIDA, L. B. Os órgãos circumventriculares encéfálicos. Histoquímica de fluorescência no estudo de barreiras de difusão no sistema nervoso central. **Acta Médica Portuguesa**, v. 5, p. 21–29, 1984.

DE GOBBI, J. I. F. et al. 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the lateral parabrachial nucleus mediate opposite effects on sodium intake. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1453–61, 8 jun. 2007.

DE LUCCA, W.; FRANCI, C. R. Angiotensinergic pathway through the median preoptic nucleus in the control of oxytocin secretion and water and sodium intake. **Brain Research**, v. 1014, n. 1–2, p. 236–243, 2004.

DE OLIVEIRA, L. B. et al. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Research Bulletin**, v. 73, n. 4–6, p. 238–247, 12 jul. 2007.

DOS SANTOS MOREIRA, M. C. et al. Neuronal circuits involved in osmotic challenges. **Physiological Research**, v. 8408, p. 411–423, 2017.

FICHNA, J.; JANECKA, A.; COSTENTIN, J.; DO REGO, J.-C. The endomorphin system

and its evolving neurophysiological role. **Pharmacological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 88–123, 2007.

FINNEGAN, T. F.; CHEN, S.-R.; PAN, H.-L. Mu opioid receptor activation inhibits GABAergic inputs to basolateral amygdala neurons through Kv1.1/1.2 channels. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 4, p. 2032–2041, abr. 2006.

FITTS, D. A.; TJEPKES, D. S.; BRIGHT, R. O. Salt appetite and lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. **Behavioral Neuroscience**, v. 104, n. 5, p. 818–27, 1990.

FORMENTI, S.; COLOMBARI, E. Mecanismos neuro-hormonais envolvidos na regulação do apetite ao sódio : alguns aspectos Neuro-hormonal mechanisms involved within sodium appetite : some aspects. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 3, p. 160–167, 2011.

FRY, M.; FERGUSON, A. V. Neural Integration of Peripheral Signals Implicated in the Ghrelin modulates electrical activity of area postrema neurons. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 6, p. 485–493, 2009.

GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Central regulation of sodium appetite. **Experimental physiology**, v. 93, n. 2, p. 177–209, fev. 2008.

GLASS, M. J.; BILLINGTON, C. J.; LEVINE, a S. Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? **Neuropeptides**, v. 33, n. 5, p. 360–8, out. 1999.

GOSNELL, B. A.; LEVINE, A. S. Reward systems and food intake: role of opioids. **International journal of obesity (2005)**, v. 33 Suppl 2, p. S54-8, jun. 2009.

GRONDIN, M.-E. et al. Na⁺ appetite induced by depleting extracellular fluid volume activates the enkephalin/mu-opioid receptor system in the rat forebrain. **Neuroscience**, v. 192, p. 398–412, 29 set. 2011.

GUILLAUMIN, J.; DIBARTOLA, S. P. Disorders of Sodium and Water Homeostasis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 47, n. 2, p. 293–312, 2017.

GUTMAN, M. B.; JONES, D. L.; CIRIELLO, J. Contribution of nucleus medianus to the drinking and pressor responses to angiotensin II acting at subfornical organ. v. 488, p. 49–56, 1989.

HANLON, E. C. et al. Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? **Psychopharmacology**, v. 172, n. 3, p. 241–247, mar. 2004.

HENRY, M.; GROB, M.; MOUGINOT, D. Endogenous angiotensin II facilitates GABAergic neurotransmission afferent to the Na⁺-responsive neurons of the rat median preoptic nucleus. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 297, p.783–792, 2009.

HIYAMA, T. Y. et al. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt-intake behavior. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9276–9281, 20 out. 2004..

HIYAMA, T. Y. et al. Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 511–512, jun. 2002.

HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 467, n. 3, p. 445–456, 2015.

HUSSY, N. et al. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 113–134, 2000.

JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1388–1400, ago. 2007.

JOHNSON, A. K.; GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 8, p. 678–686, 1993.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 292–353, jul. 1997.

KELLEY, A. E. et al. Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. **Physiology & Behavior**, v. 76, n. 3, p. 365–77, jul. 2002.

LE MAGNEN, J. et al. Pain modulating and reward systems: A single brain mechanism? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 12, n. 5, p. 729–733, 1980.

LI, D.; PAN, H. Angiotensin II Attenuates Synaptic GABA Release and Excites Paraventricular-Rostral Ventrolateral Medulla Output Neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 3, p. 1035–1045, 2005.

LI, J. et al. Lesions of the central nucleus of the amygdala decrease taste threshold for sodium chloride in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 89, n. 1–2, p. 8–15, 2012.

LOEWY, A. D.; HAXHIU, M. A. CNS cell groups projecting to pancreatic parasympathetic preganglionic neurons. **Brain Research**, v. 620, n. 2, p. 323–330, 1993.

LUNDY, R. F. et al. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. *Physiology & Behavior*, v. 78, n. 3, p. 449–458, 2003

LUZ, C. P. et al. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. **Brain Research**, v. 1139, p. 178–194, 30 mar. 2007.

LUZ, C. et al. Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v. 1099, n. 1, p. 121–132, 12 jul. 2006.

MAGRANI, J. et al. Involvement of central H₁ and H₂ receptors in water intake induced by hyperosmolarity, hypovolemia and central cholinergic stimulation. **Physiological Behaviour**, v. 30, p. 241–249, 2006

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 257–332, 1998.

MCDONALD, J.; LAMBERT, D. G. Opioid mechanisms and opioid drugs. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 1, n. 9, p. 33–37, 2008.

MCKINLEY, M. et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain: subfornical organ, OVLT and area postrema. **Springer Science & Business Media**, v. 172, p. 19–21, 2003.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News in Physiological Sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, p. 1–6, fev. 2004.

MCKINLEY, M. J. et al. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of

body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. **Acta Physiologica**, v. 214, n. 1, p. 8–32, maio 2015.

MILLER, R. L.; LOEWY, A. D. 5-HT neurons of the area postrema become c-Fos-activated after increases in plasma sodium levels and transmit interoceptive information to the nucleus accumbens. **American Journal Of Physiology. Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, v. 306, n. 9, p. R663-73, 2014.

NASCIMENTO, A. I. R. et al. Blockade of central delta-opioid receptors inhibits salt appetite in sodium-depleted rats. **Peptides**, v. 55, p. 110–119, 2014.

NASCIMENTO, A. I. R. et al. Central kappa opioid receptors modulate salt appetite in rats. **Physiology and Behavior**, v. 106, n. 4, p. 506–514, 2012.

NATHAN, P. J.; BULLMORE, E. T. From taste hedonics to motivational drive: central μ -opioid receptors and binge-eating behaviour. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 7, p. 995, 2009.

NEHMÉ, B. et al. The Expression Pattern of the Na(+) Sensor, Na(X) in the Hydromineral Homeostatic Network: A Comparative Study between the Rat and Mouse. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 6, n. July, p. 26, 2012.

NODA, M. The subfornical organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. **The Neuroscientist**, v. 12, n. 1, p. 80–91, fev. 2006.

NODA, M.; SAKUTA, H. Central regulation of body-fluid homeostasis. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 11, p. 661–73, nov. 2013.

NOGUEIRAS, R. et al. The opioid system and food intake: Homeostatic and hedonic mechanisms. **Obesity Facts**, v. 5, n. 2, p. 196–207, 2012.

OGIHARA, C. A. et al. Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 6, p. 561–566, 2009.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. . Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **American Journal of Physiology**, v. 251, n. 3, p. 504–509, 1986.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **British Journal of**

Pain, v. 6, n. 1, p. 11–16, 2012.

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

PAVAN, C. G. et al. Activation of μ opioid receptors in the LPBN facilitates sodium intake in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 288, p. 20–25, 15 jul. 2015.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain: *in stereotaxic coordinates***. 4rd ed. California: Academic Press, 1998.

PECIÑA, S. Opioid reward “liking” and “wanting” in the nucleus accumbens. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 5, p. 675–680, 6 ago. 2008.

POULIN, J.-F. et al. Neuroanatomical characterization of endogenous opioids in the bed nucleus of the stria terminalis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1356–1365, 13 nov. 2009.

RICHTER, C. P.; ECKERT, J. F. Mineral metabolism of adrenalectomized rats studied by the appetite method. **Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 214–224, 1938.

SAAD, W. A. et al. Effect of cholinergic stimulation of the amygdaloid complex on water and salt intake. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 27, n. 4, p. 915-920, 1994.

SHIMIZU, H. et al. Glial Nax Channels Control Lactate Signaling to Neurons for Brain [Na⁺] Sensing. **Neuron**, v. 54, n. 1, p. 59–72, 2007.

SMITH, C. M.; LAWRENCE, A. J. Salt Appetite, and the Influence of Opioids. **Neurochemical Research**, p. 1–7, 2017.

SOMPONPUN, S. J. et al. Estrogen receptor-alpha expression in osmosensitive elements of the lamina terminalis: regulation by hypertonicity. **AJP: Regulatory, Integrative, & Comparative Physiology**, v. 287, n. 3, p. R661–R669, 2004.

TAKAHASHI, M.; HAYASHI, Y.; TANAKA, J. Glutamatergic modulation of noradrenaline release in the rat median preoptic area. **Brain Research Bulletin**, v. 130, p. 36–41, 2017.

TOLL, L. et al. Standard binding and functional assays related to medications development

division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. **NIDA Research Monograph**, v. 178, p. 440–466, 1998.

TRESCOT, A. M. et al. Opioid Pharmacology. **Pain physician**, v. 11, p. S133–S153, 2008.

VOISIN, A. N.; DROLET, G.; MOUGINOT, D. Intrinsic properties of the sodium sensor neurons in the rat median preoptic nucleus. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, n. 8, p. R834-42, out. 2012.

WATANABE, E. et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Na(x) is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 3, p. R568-76, mar. 2006.

WESTERHAUS, M. J.; LOEWY, A. D. Sympathetic-related neurons in the preoptic region of the rat identified by viral transneuronal labeling. **Journal of Comparative Neurology**, v. 414, n. 3, p. 361–378, 1999.

WILKINS, L.; RICHTER, C. P. A great craving for salt by a child with cortico-adrenal insufficiency. **Jama**, v. 114, n. 10, p. 866–868, 1940.

YAN, J. et al. Activation of μ -opioid receptors in the central nucleus of the amygdala induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 233, p. 28–43, 2013.

ZHANG, M.; KELLEY, A. E. Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: microinjection mapping and fos expression. **Neuroscience**, v. 99, n. 2, p. 267–77, jan. 2000.

ZHANG, M.; KELLEY, A. E. Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 4, p. 415–23, fev. 2002.

ZHANG, Q. et al. Angiotensin II enhances GABAB receptor-mediated responses and expression in nucleus tractus solitarii of rats. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 5, p. H1837–H1844, 2009.