



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DOS RECEPTORES DO TIPO 5-HT₃ NA ÁREA
SEPTAL MEDIAL SOBRE O CONTROLE DA PRESSÃO
SANGUÍNEA, DO APETITE POR SÓDIO E DA INGESTÃO
HÍDRICA.**

ÁTILA DOS SANTOS BATISTA

**Salvador- Bahia-Brasil
2012**



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PAPEL DOS RECEPTORES DO TIPO 5-HT3 NA ÁREA
SEPTAL MEDIAL SOBRE O CONTROLE DA PRESSÃO
SANGUÍNEA, DO APETITE POR SÓDIO E DA INGESTÃO
HÍDRICA.**

Átila dos Santos Batista

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

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador- Bahia-Brasil
2012**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Batista, Átila dos Santos

B333p Papel dos receptores do tipo 5-HT3 na área septal medial sobre o controle da
pressão sanguínea, do apetite por sódio e da ingestão hídrica. [manuscrito] /
Átila dos Santos Batista. - 2012.

63 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Mestrado (dissertação) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo
Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2012.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Josmara Bartolomei Fregoneze. Laboratório de
Neurociências.

1. Pressão Arterial. 2. Estresse. 3. Equilíbrio hidroeletrólítico. 4. Receptores
colinérgicos. 5. Receptores muscarínicos. I.Título.

CDU 616.12-008.33

“PAPEL DOS RECEPTORES DO TIPO 5-HT3 NA ÁREA SEPTAL MEDIAL SOBRE O CONTROLE DA PRESSÃO SANGUÍNEA, DO APETITE POR SÓDIO E DA INGESTÃO HÍDRICA.”

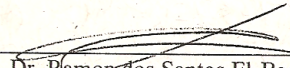
ÁTILA DOS SANTOS BATISTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

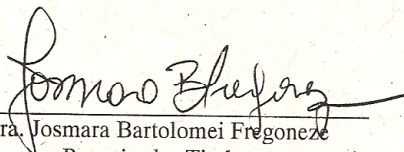
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Vanderlei Menani
Professor Titular
FOAR / UNESP



Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor Associado II
UFBA



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze
Pesquisador Titular
UFBA

A realização deste trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPESB e do Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

Adquire sabedoria, adquira inteligência, e não te esqueças nem te apartes das palavras da minha boca.

Provérbios 4:5

AGRADECIMENTOS

“ Bendize, ó minha alma, ao Senhor!” .Em primeiro lugar agradeço aquele que me formou, ao Deus da Criação. Obrigada pela tua infinita misericórdia.

Aos meus pais que com grande sabedoria me ensinaram a viver.

Aos meus irmãos Julimar e Junior pelo grande apoio, mesmo quando nem abriam os seus lábios

As minhas colegas de mestrado Diana e Daniela pelas grandes lutas e conquistas.

A minha grande amiga e professora Rejane pelo seu apurado olho histológico.

A professora Hilda pela sua preciosa atenção.

As querida amigas Lilia e Ana que muito me ajudaram.

As alunas de iniciação científica Regina, Camila, Vanessa, Naiara e Luana.

Ao nosso grande bioterista, seu Zé, parabéns pelo trabalho.

Aos meus queridos professores desde o jardim de infância a pós-graduação.

Aos ratinhos, sementes desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

E principalmente, a grande orientadora Josmara Fregoneze que com toda garra conseguiu fazer infinitos papéis, orientadora, amiga, mãe, educadora.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	10
Índice de figuras	12
I. Resumo	13
II .Abstract	14
III. Introdução	15
IV. Revisão da Literatura	17
IV.1. Serotonina	17
IV.2. Controle cardiovascular e serotonina	24
IV.3. Serotonina e apetite por sódio	26
IV.4. Serotonina e estresse	27
IV.5. Caracterização anatômica da área septal medial	29
IV.6 Área septal medial no controle cardiovascular, equilíbrio hidroeletrolítico e estresse	30
V-Objetivos e Hipóteses	32
VI- Material e Métodos	33
VI.1. Animais	33
VI.2. Implante de cânula na área septal medial	33
VI.3. Cateterização da carótida	33
VI.4. Drogas e microinjeções	34
VI.5. Registro da pressão arterial pulsátil	34
VI.6. Estresse de restrição	35
VI.7. Depleção de sódio	35
VI.8. Privação Hídrica	36
VI.9 Descrição dos Grupos Experimentais	36
VI.10. Procedimentos Histológicos	37
VI.11. Análise estatística	38
VII. Resultados	39
VIII. Discussão	52
IX. Referências Bibliográficas	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OH DPAT	8-hidroxi-2- <i>N</i> -dipropilamino-tetralina
5-HT	Serotonina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ASL	Área Septal Lateral
ASM	Área Septal Medial
ASM/DB	Complexo septo medial área de Broca
A ₂ AVP	Vassopressina do tipo 2
BDB	Banda diagonal de Broca
CeA	Amígdala central
DAG	Diacilglicerol
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DRN	Núcleo dorsal da rafe
FC	Frequência cardíaca
<i>FOS</i>	Gene de ativação para c-fos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IP3	Inositol-3-Fosfato
LH	Hipotálamo lateral
LS	Septo lateral
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
MDL 72222	8-metil-8-azabicyclo [3,2,1] octano-3-yl]3,5 diclorobenzoato
<i>m</i> -CPBG	<i>meta</i> - Clorofenilbiguanidina
MeA	Amígdala medial
mCPP	<i>meta</i> -Clorofenilpiperazina
mPOA	Área préótica medial
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NTS	Núcleo do trato solitário

PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PAM	Pressão arterial média
PEG	Polietilenoglicol
PVN	Núcleo paraventricular
SDZ SER 082	<i>cis</i> - 4,5,7 ^a ,8,9,10,11,11 ^a -Octahidro-7H-10-metilindol [1,7-bc] [2,6]-naftiridino fumarato
SERT	Transportador de serotonina
SFO	Órgão subfornical
SON	Núcleo supraóptico
SNC	Sistema Nervoso Central
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
TPH2	Triptofano hidroxilase 2

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Via de biossíntese da serotonina

FIGURA 2. Representação da sinapse serotoninérgica. Síntese, liberação, absorção e metabolismo da 5-HT

FIGURA 3. Localização dos grupos serotoninérgicos em secção sagital do Sistema Nervoso Central de ratos

FIGURA 4. Papel dos receptores 5-HT₃ em diferentes condições patológicas

FIGURA 5. Efeito dos receptores 5HT₃ *m*-CPBG e ondansetrona nas doses de 160nmol sobre a variação da pressão arterial média e frequência cardíaca

FIGURA 6. Efeito do pré-tratamento com atropina nas doses de 2,5 e 5 nmol sobre a variação da pressão arterial média e frequência cardíaca em animais que receberam ondansetrona na dose de 160 nmol

FIGURA 7. Efeito do tratamento com atropina nas doses de 2,5 e 5 nmol na ASM sobre a variação da pressão arterial média e frequência cardíaca em animais normotensos

FIGURA 8. Efeito farmacológico dos receptores 5HT₃ presentes na ASM sobre a ingestão de sódio e água

FIGURA 9. Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores do tipo 5HT₃ presentes na ASM em animais sob privação hídrica no controle da ingestão de água

FIGURA 10. Fotomicrografia e Diagrama da ASM

I - RESUMO

BATISTA, A.S. PAPEL DOS RECEPTORES DO TIPO 5-HT₃ NA ÁREA SEPTAL MEDIAL SOBRE O CONTROLE DA PRESSÃO SANGUÍNEA, DO APETITE POR SÓDIO E DA INGESTÃO HÍDRICA. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ, Salvador, 2012.

Diferentes áreas do sistema nervoso central que participam da regulação cardiovascular recebem projeções de núcleos da rafe produtores de 5-HT. Diversos estudos têm também demonstrado a participação dos receptores serotoninérgicos nas respostas neuroendócrinas e emocionais ao estresse e no equilíbrio hidrossalino, assim os objetivos do referido trabalho foram: a) estudar o papel dos receptores do tipo 5-HT₃ presentes na ASM (área septal medial) sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de contenção em ratos; b) verificar a possível interação entre os receptores colinérgicos muscarínicos e 5-HT₃ presentes na ASM no controle cardiovascular; c) verificar o papel dos receptores do tipo 5-HT₃ na ASM sobre o controle hidrossalino. Foram utilizados ratos Wistar (280-300g) submetidos ao implante de uma cânula guia na ASM. Os animais destinados aos estudos cardiovasculares receberam implante de catéter carotídeo para análise da PA. No momento do experimento referente ao estresse os animais receberam injeção de *m*-CPBG e ondansetrona na ASM e 15 min após a microinjeção foram submetidos ao estresse de contenção com registro da PA. Para análise da interação entre os receptores muscarínicos e os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ os animais receberam previamente atropina, antagonista colinérgico muscarínico, e após 10 min receberam ondansetrona com registro constante da PA por mais 110min. No protocolo experimental para depleção de sódio os animais receberam microinjeções de furosemida 24h antes do experimento tendo disponíveis bebedouros de água destilada. No momento do experimento os animais receberam microinjeções de *m*-CPBG e ondansetrona e após 15 min os volumes de água e salina 1,5% foram registrados por 2h. Para análise do efeito do bloqueio dos receptores 5-HT₃ sobre o comportamento de ingestão de água os animais foram submetidos a privação hídrica por 24h. No momento do experimento microinjeções de salina, *m*-CPBG ondansetrona foram feitas na ASM com medida dos volumes ingeridos ao longo de 2h. Verificamos que os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM inibem o aumento da PA em animais submetidos ao estresse, além disso, verificamos também que a resposta hipertensiva decorrente do bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ depende da integridade funcional dos receptores colinérgicos muscarínicos. Por outro lado, tanto a ativação, quanto o bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM parecem não mediar a ingestão de sódio em animais sódio-depletados nem a ingestão de água em animais sob privação hídrica.

Palavras-chave: 1. Pressão arterial; 2. Estresse; 3. 5-HT₃; 4. Equilíbrio hidroeletrólítico; 5. Receptores colinérgicos muscarínico

II - ABSTRACT

BATISTA, A. S. THE ROLE OF 5-HT₃ TYPE RECEPTORS IN THE MEDIAL SEPTAL AREA FOR BLOOD PRESSURE, SODIUM APPETITE AND WATER INGESTION CONTROL. Dissertation (Mastership) – Federal University of Bahia/ FIOCRUZ, Salvador, 2012

Different areas of the central nervous system that participate in cardiovascular regulation receive the projections of rafe nuclei that product 5-HT. Several studies have also demonstrated the participation of serotonergic receptors in neuroendocrine and emotional responses for stress and in fluid and electrolyte balance. Thus, the objectives of this work were: a) to study the role of type 5-HT₃ receptors present in MSA (medial septal area) on the cardiovascular responses to stress of restraint in rats; b) to verify the possible interaction between muscarinic cholinergic receptors and 5-HT₃ present in MSA in cardiovascular control; c) to verify the role of type 5-HT₃ receptors in MSA on fluid and electrolyte control. There were used Wistar rats (280-300g) submitted to a guide cannula implant in MSA. The animals for cardiovascular studies received carotid catheter implant to AP analyses. At the time of stress experiment the animals received *m*-CPBG and ondansetron injection in MSA and, 15 minutes after microinjection were submitted to stress of restraint with the AP register. To analyses the interaction between the muscarinic receptors and 5-HT₃ serotonergic receptors, the animals previously received atropine, cholinergic muscarinic antagonist, and 10 minutes after received ondansetron with the constant register of AP for 110 minutes more. In the experimental protocol for sodium depletion animals received furosemide microinjections 24 hours before the experiment with distilled water drinking fountains available. At the time of the experiment the animals received *m*-CPBG and ondansetron injection and after 15 minutes the volumes of water and 1,5% saline were registered for two hours. To analyses the effect of 5-HT₃ receptors blockade on the water ingestion behavior the animals had been submitted to water privation by 24 hours. At the time of the experiment microinjections of saline, *m*-CPBG and ondansetron were made in MSA with measurement of ingested volumes during two hours. We verified that the type 5-HT₃ serotonergic receptors present in MSA inhibit the increase of AP in animals on stress. In addition, we also verified that the hypertensive response due to the type 5-HT₃ serotonergic receptors blockade depends on the functional integrity of the muscarinic cholinergic receptors. On the other hand, both the activation as the blocking of type 5-HT₃ serotonergic receptors presents in MSA seem not to mediate sodium ingest in sodium-depleted animals nor the water ingestion in animals on water deprivation.

Key-words: 1. Arterial Pressure; 2. Stress; 3. 5-HT₃; 4. Fluid and electrolyte balance; 5. Muscarinic cholinergic receptors.

III- INTRODUÇÃO

A serotonina (5HT) é uma das monoaminas com larga distribuição no sistema nervoso central. Os corpos neuronais produtores de serotonina estão localizados nos núcleos da rafe mesencefálica (BARKER; HALLIDAY; TORR, 1990) sendo que as projeções para o prosencéfalo têm origem nos núcleos dorsal e mediano da rafe, enquanto as projeções para o tronco cerebral e medula espinhal têm origem nos núcleos da rafe pálida e rafe obscura (JACOBS; AZMITZIA, 1992). O sistema serotoninérgico possui 14 subtipos de receptores (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-ht_{1E}, 5-ht_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-ht_{5A}, 5-ht_{5B}, 5-ht₆ e 5-HT₇) que participam de diferentes processos fisiológicos e homeostáticos, além de modular variedades de comportamentos tais como: ciclo sono-vigília, apetite, nocicepção, humor e comportamento sexual e de defesa.

Diversos trabalhos têm intensificado o papel dos receptores serotoninérgicos em diferentes condições patológicas tais como desordens psiquiátricas, disfunções do trato gastrointestinal, distúrbios alimentares, depressão, ansiedade, pânico e estresse (NAKAGAWA; ISHIMA; TAKASHIMA, 1998; CHAOULOFF; BERTON; MORMÈDE, 1990). Em nosso laboratório temos estudado a participação das vias serotoninérgicas centrais no controle da ingestão de água e do apetite por sódio, além de investigar o possível envolvimento deste neurotransmissor na regulação cardiovascular (CASTRO, et al., 2000, 2002, 2003; FERREIRA et al., 2004, 2005; LUZ et al., 2006).

Dados anteriores do nosso laboratório têm demonstrado que a ativação central dos receptores 5-HT₃ evoca significativa hipotensão em ratos e o bloqueio destes mesmos receptores resulta em aumento significativo da pressão sanguínea, mostrando que estes receptores parecem exercer um tônus inibitório sobre a pressão sanguínea e que esta ação parece depender de um mecanismo simpato-inibitório (FERREIRA et al., 2004). No presente trabalho estudamos o papel dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na área septal medial (ASM) sobre a regulação cardiovascular em animais submetidos ao estresse de contenção.

A área septal caracteriza-se por ser parte integrante do sistema límbico apresentando abundante aferência GABAérgica, glutamatérgica, colinérgica, serotoninérgica, dopaminérgica e noradrenérgica (RISOLD; SWANSON, 1997). Apesar dos inúmeros

trabalhos tentando demonstrar a interrelação entre o sistema serotoninérgico e colinérgico nas alterações no âmbito cognitivo, até o momento a função desses sistemas na regulação cardiovascular não tinha sido estudada. Sendo assim, os dados obtidos no referido trabalho poderão contribuir para o entendimento da função integradora desses sistemas.

Evidências têm também demonstrado que a ASM é região importante para o equilíbrio hidrossalino (CAMARGO et al., 2002; SAAD et al., 2004). Apesar de a ASM apresentar receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ a influência desses receptores sobre o comportamento de ingestão de sódio em animais sódio-depletados e sobre o comportamento de ingestão de água em animais sob privação hídrica ainda necessitam de maiores estudos. Com base, nesses questionamentos os dados do presente trabalho podem contribuir para a análise da função desses receptores presentes na ASM sobre esses comportamentos descritos anteriormente.

IV-REVISÃO DE LITERATURA

Serotonina

A serotonina foi inicialmente descrita em humanos por volta de 1930 em células enterocromafins do trato gastrointestinal devido o seu efeito na contratilidade da musculatura uterina (JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008). Posteriormente em 1948 foi identificada na circulação sanguínea com propriedades tônicas vasoativas, após pesquisas na tentativa de elucidar quais vasoconstritores estavam envolvidos na gênese da hipertensão (JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008). Em 1955 foi encontrada no cérebro de mamíferos e classificada como neurotransmissor (FILIP; BADER 2009).

A biossíntese da serotonina (Figura 01) tem início com o processo de hidroxilação do aminoácido L-triptofano para L-5-hidroxi-triptofano reação essa catalisada pela enzima triptofano-5-hidroxilase (TPH; EC 1.14.16.4, hidroxilação do triptofano na posição 5) (FILIP; BADER 2009; DIKSIC; YOUNG, 2001). Cerca de 95% dessa monoamina é produzida na periferia em células enterocromafins encontradas nas criptas do trato gastrointestinal e nas plaquetas e somente uma pequena fração é sintetizada no cérebro, basicamente em neurônios do tronco cerebral (DUCY; KARSENTY, 2010; JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008). Esses dois sistemas, independentes, de síntese da serotonina são definidos pela presença das enzimas triptofano-hidroxilase-1 (TPH1) e triptofano-hidroxilase-2 (TPH2) descobertas a partir do estudo em animais que não apresentavam a enzima triptofano hidroxilase (NI; WATSS, 2006). TPH1 é responsável pela síntese da serotonina nas células enterocromafins, sendo então captada pelas plaquetas pelo transportador 5-HT (5-HTT) ou o transportador de serotonina (SERT), o qual é responsável pelo aporte de serotonina para todos os órgãos com exceção do cérebro por não ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (FILIP; BADER, 2009).

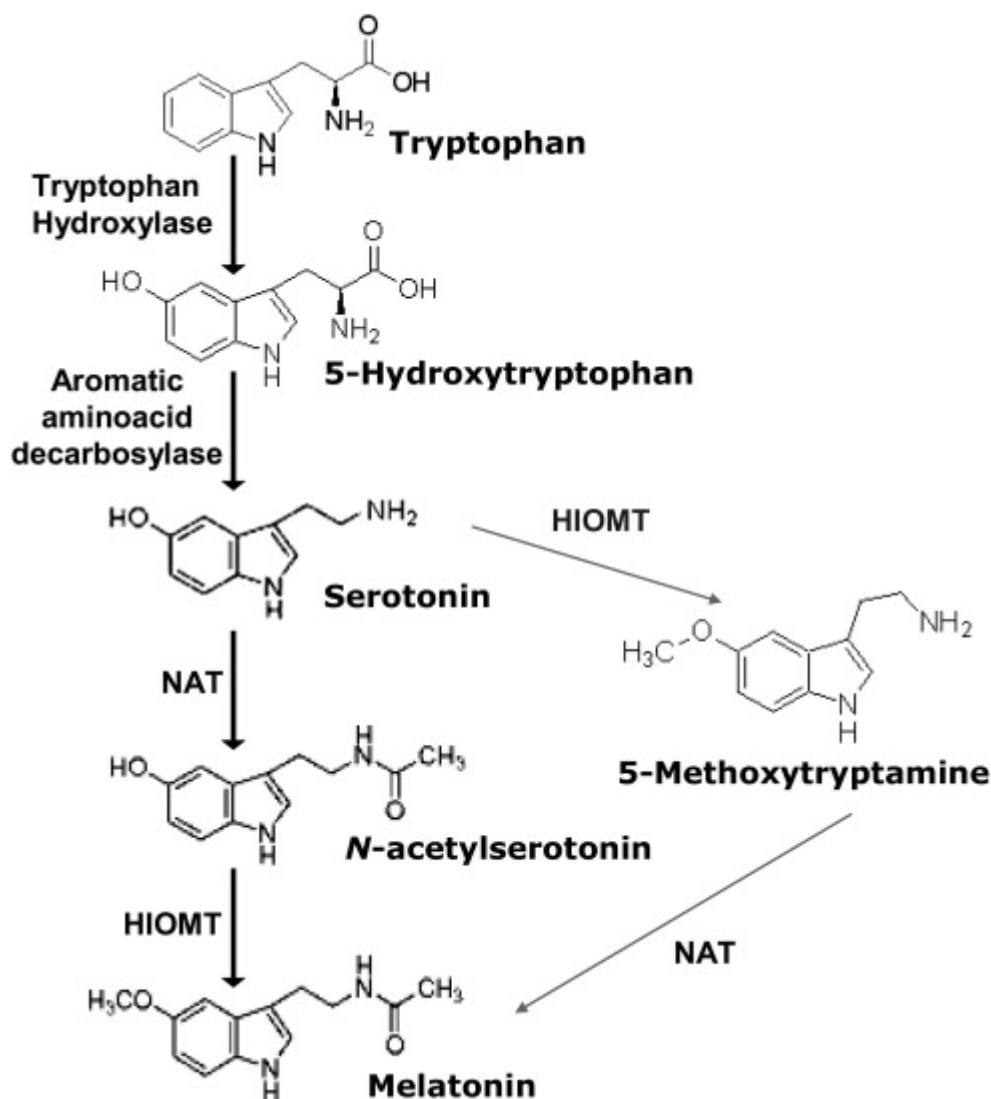


Figura 01: Via de biossíntese da serotonina (Fonte: RODRIGUEZ-NARANJO et al., 2011).

No cérebro a enzima responsável pela síntese da serotonina é a TPH2, onde ocorre a descarboxilação do L-5-triptofano em serotonina, sendo estocada em vesículas sinápticas, mais precisamente em grânulos secretórios (Figura 02). Entretanto, vale ressaltar que a serotonina periférica não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, apenas a molécula hidroxilada consegue transpor esta barreira. O processo de catabolismo da serotonina é dependente da monoamina oxidase mitocondrial tipo A, inicialmente oxidada a aldeído e posteriormente a ácido 5-hidroindolacético (FILIP; BADER, 2009; JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008).

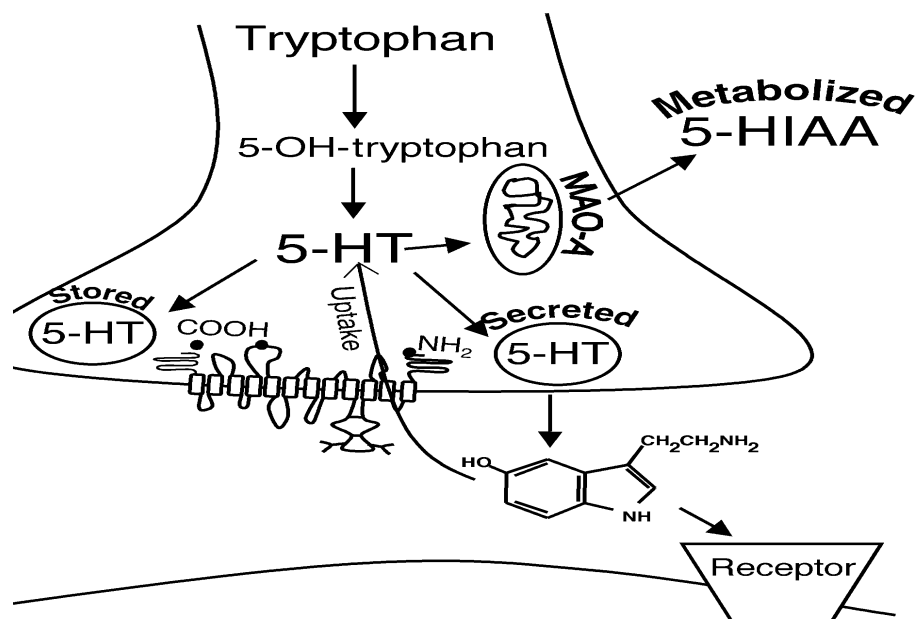


Figura 02: Representação da sinapse serotoninérgica. Síntese, liberação, absorção e metabolismo da 5-HT (Fonte: NI; WATTS, 2006).

Por apresentar estrutura química similar ao alcalóide monoamínico triptamina, dimetiltriptamina, dietriptamina e melatonina que são quimicamente relacionados ao aminoácido triptofano, e pela presença do anel indol a serotonina compõe o grupo das indolaminas (PYTLIAK et al., 2011).

Devido à liberação de serotonina dos terminais neuronais em quase a totalidade do SNC, essa monoamina está envolvida em importantes funções fisiológicas tais como regulação da pressão sanguínea, da temperatura corpórea, do apetite, da liberação de prolactina e outros hormônios, da percepção da dor e do comportamento emocional. Sabe-se também que o sistema serotoninérgico está envolvido na patogênese de doenças como a hipertensão, a depressão, a disfunção hormonal e a ansiedade (FINK; GÖTHER, 2007).

Esta multiplicidade de ação da serotonina no Sistema Nervoso Central (SNC) é exercida via 14 subtipos de receptores serotoninérgicos que são diferentes na genética, na farmacologia e na funcionalidade e estão distribuídos em 7 famílias (5-HT₁ – 5-HT₇) de acordo com a sequência de aminoácidos, com o mecanismo de transdução de sinal e com os critérios farmacológicos e funcionais (FINK; GÖTHER, 2007). A afinidade da serotonina a diferentes tipos de receptores garante flexibilidade da ação da 5-HT, além de facilitar a adaptabilidade do organismo às diferentes mudanças ambientais e fisiológicas. Além disso, a diferença de afinidade da 5-HT devido à diversidade de receptores provê ao neurônio a

capacidade de detectar e responder de forma diferenciada em relação à quantidade de serotonina presente na fenda sináptica (UPHOUSE, 1997).

Os corpos celulares e dendritos dos neurônios produtores de serotonina estão localizados nos núcleos da rafe (Figura 03), projetando-se para a maioria das áreas cerebrais e medula espinal. Estes grupos neuronais da rafe produtores de serotonina foram classificados em grupos (Tabela 01) B1 a B4 que apresentam projeções descendentes para a medula espinal e grupos B5 a B9 os quais ascendem para o prosencéfalo (FINK; GÖTHER, 2007).

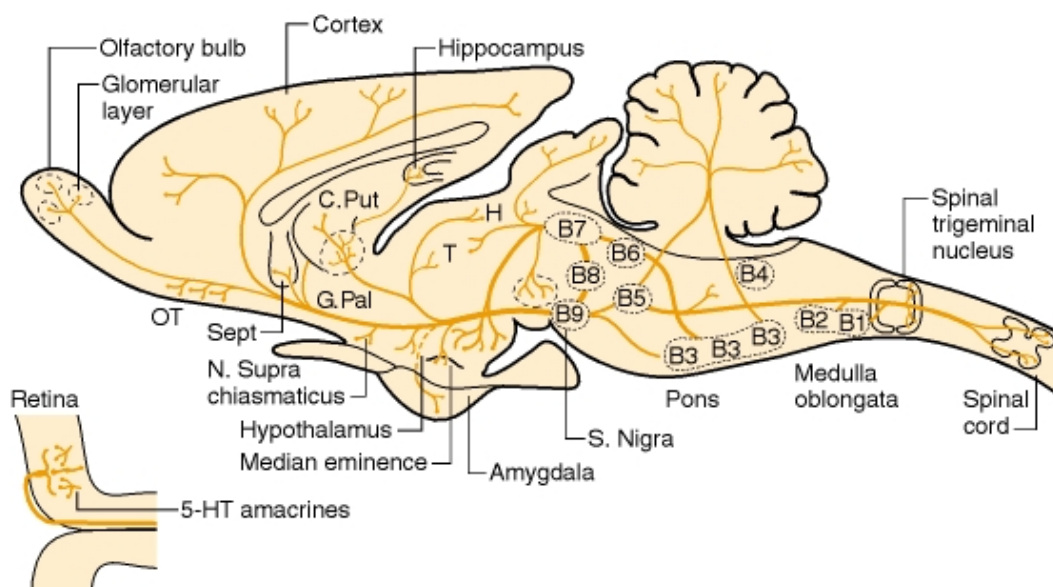


Figura 03: Localização dos grupos serotoninérgicos em secção sagital do Sistema Nervoso Central de ratos. OT, tubérculo olfatório; Sept, septo; C.Put, caudado putamen; G.Pal, globo pálido; T, tálamo; H, habenua; S.Nigra, substância nigra (Fonte: SIEGEL; AGRANOFF; ALBERS, 1999).

Tabela 01: Classificação dos grupos dos corpos celulares serotoninérgicos de acordo com Dahlstrom e Fuxe e estrutura anatômica correspondente (Fonte: SIEGEL; AGRANOFF; ALBERS, 1999).

Grupos celulares serotoninérgicos	Estrutura	Localização
B ₁	Núcleo rafe palida	Bulbo ventrolateral
B ₂	Núcleo rafe obscura	Bulbo ventral
B ₃	Núcleo rafe magna	Bulbo ventrolateral rostral, núcleo paragingatocelular lateral
B ₄	Núcleo rafe obscura	Parte dorsolateral do bulbo
B ₅	Núcleo rafe mediana	Parte caudal da ponte
B ₆	Núcleo dorsal da rafe	Parte caudal da ponte
B ₇	Núcleo rafe dorsal principal	Parte rostral da ponte
B ₈	Núcleo rafe mediana	Parte rostral, núcleo caudal linear, núcleo pontino oral.
B ₉	Núcleo ponte oral	Região supralemnisco

Todos os receptores serotoninérgicos, com exceção dos receptores do tipo 5-HT₃ são estruturalmente relacionados à superfamília de receptores acoplados a proteína G. Os seis receptores que são associados à proteína G são caracterizados pela natureza da sequência de aminoácidos presentes na molécula. O receptor 5-HT₁ apresenta 5 membros em sua subfamília (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}) sendo seu mecanismo de ação através da diminuição da concentração de cAMP. O receptor 5-HT₂ apresenta em sua subfamília 3 membros (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}) e seu mecanismo de ação ocorre com aumento intracelular da concentração de Inositol-3-Fosfato (IP3) e diaciglicerol (DAG). Dados recentes têm demonstrado haver múltiplas variantes do receptor 5-HT₄ (5-HT_{4A}, 5-HT_{4B}, 5-HT_{4C}, 5-HT_{4D}, 5-HT_{4E}, 5-HT_{4F}, 5-HT_{4G}, 5-HT_{4H}, 5-HT_{4HB}) apresentando diferença no segmento C-terminal, mas com similaridade farmacológica, além de serem estimulados pela adenilciclase. O receptor 5-HT₅ apresenta dois subtipos funcionais em roedores denominados 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}, em humanos é observado apenas o subtipo 5-HT_{5A}, pois o gene que codifica o 5-HT_{5B} inclui códons de parada, o que o torna não-funcional. Até o presente momento a farmacologia desse receptor é desconhecida, alguns acreditam que devido a sua localização estes receptores estejam envolvidos no controle motor, na ansiedade, depressão, consolidação da memória, comportamento adaptativo e desenvolvimento cerebral. Os receptores 5-HT₆ são expressos no núcleo caudado, no tubérculo olfatório, no hipocampo e núcleo acumbens e sua ativação estimula a atividade da adenilciclase. E por fim, o 5-HT₇ apresenta 5 isoformas que diferem no segmento C-terminal, mas exibem a mesma propriedade farmacológica (GERHARDT; HEERIKHUIZEN, 1997; HANNON; HOYER, 2008; FILIP; BADER, 2009; PYTLIAK et al., 2011; MASSON et al., 2012)

O receptor 5-HT₃ é membro da família de receptores ligantes-iônicos, nesta superfamília inclui-se os receptores da acetilcolina, os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) e os receptores da glicina (DAVIES, 2011), cuja 5 subunidades são arranjadas simetricamente ao redor de um poro iônico condutor (THOMPSON et al., 2006). A ativação do receptor 5-HT₃ medeia uma rápida resposta despolarizante no sistema nervoso central e periférico devido a abertura dos canais iônicos catiônicos não seletivos, conduzindo primariamente cátions monovalentes como o Na⁺ e K⁺, mas também cátions divalentes, como o Ca²⁺. (MOCHIZUKI et al., 2000; MACHU, 2011).

Os receptores 5-HT₃ estão presentes em estruturas corticais e subcorticais incluindo o córtex cerebral, o sistema olfatório, o sistema límbico (hipocampo, amígdala), gânglios basais, a substância cinzenta central, a formação reticular mesencefálica e o núcleo dorsal da

rafe. Em nível do núcleo dorsal da rafe os receptores 5-HT₃ são parcialmente expressos em interneurônios glutamatérgicos (MONTI, 2010).

Os primeiros antagonistas dos receptores 5-HT₃ com alta afinidade e seletividade foram formulados com base na estrutura da 5-HT e dos antagonistas não-seletivos cocaína, bemisetron e tropisetron (WALSTAB; RAPPOLD; NIESLER, 2010). O estudo farmacocinético desses antagonistas foi o ponto chave no entendimento do papel dos receptores 5-HT₃ na regulação da emese o que ratifica o uso de antagonistas dos receptores 5-HT₃ como padrão ouro no tratamento antiemético durante a quimioterapia, principalmente, por terem rápida absorção, prontamente atravessarem a barreira hematoencefálica e por serem metabolizados pelo sistema do citocromo P450 (ENGLEMAN et al., 2008; WALSTAB; RAPPOLD; NIESLER, 2010).

Nakagawa, Ishima e Takashima (1998) demonstraram que o agonista seletivo dos receptores 5-HT₃, o 1-*m*-clorofenil-biguanidina (*m*-CPBG) atenua o efeito dos antidepressivos desipramina e imipramina em reduzir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugerindo que a supressão da atividade dos receptores 5-HT₃ pode contribuir para a ação desses agentes antidepressivos. Dados da literatura também mostram que o *m*-CPBG apresenta ação ansiogênica no teste da cruz elevada em ratos (NAKAGAWA; ISHIMA; TAKASHIMA, 1998).

Há de se destacar a ação dos receptores 5-HT₃ na sensibilização comportamental induzida pelo uso de psicoestimulantes. Yoo et al., (2006) mostraram que o 8-metil-8-azabicyclo [3,2,1] octano-3-j]3,5 diclorobenzoato (MDL 72222- antagonista dos receptores 5-HT₃), atenua a expressão e o desenvolvimento de sensibilização comportamental induzidos pelo uso de metanfetamina. Dados da literatura têm demonstrado que o uso de psicoestimulantes e de cocaína induzem aumento da resposta a estas substâncias à medida que seu uso é intermitente e repetitivo, pois o sistema neuronal passa por um processo de adaptação e hipersensibilidade. Sendo assim, o uso de antagonistas serotoninérgicos no tratamento de dependência a metanfetamina pode ser um grande avanço para a saúde pública (AGO et al., 2008). Os receptores 5-HT₃ parecem ter importante papel também no desenvolvimento do alcoolismo. Estudos clínicos têm demonstrado que os antagonistas dos receptores 5-HT₃ são eficazes na redução do desejo pelo consumo do álcool, no número de episódios de ingestão de álcool, nos sintomas de ansiedade, depressão e hostilidade que frequentemente estão associados com alcoolismo como descrito na literatura sobre o

tratamento com ondansetrona em pacientes com histórico de alcoolismo que tiveram redução de forma significativa do consumo de álcool (JOHNSON et al., 2000; RUSCH et al., 2007)

Diversos trabalhos têm relacionado a ativação dos receptores do tipo 5-HT₃ com disfunção do trato gastrointestinal (Figura 04). É sabida a ação desses receptores no controle da peristalse e da secreção gástrica, além disso, os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ estão envolvidos na mediação da resposta anoréxica e o uso dos seus antagonistas tem sido eficaz no tratamento de pessoas com distúrbios alimentares. Há de se destacar também o papel desses receptores no processo de nocicepção uma vez que a 5-HT ativa os receptores do tipo 5-HT₃ pressinápticos nos terminais nervosos centrais favorecendo a resposta reflexa para a sensação de dor. Devido a sua expressão em diversas áreas cerebrais, a serotonina tem sido relacionada à patogênese da ansiedade e depressão. Dados da literatura têm demonstrado que a ação dos antagonistas serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ são eficazes como drogas ansiolíticas. Apesar de ainda não conclusivos, diversos trabalhos têm também tentado relacionar o papel da serotonina na gênese da esquizofrenia, uma vez que em humanos o uso de antagonistas dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ contribui para a melhora dos sintomas da esquizofrenia (WALSTAB; RAPPOLD; NIESLER, 2010).

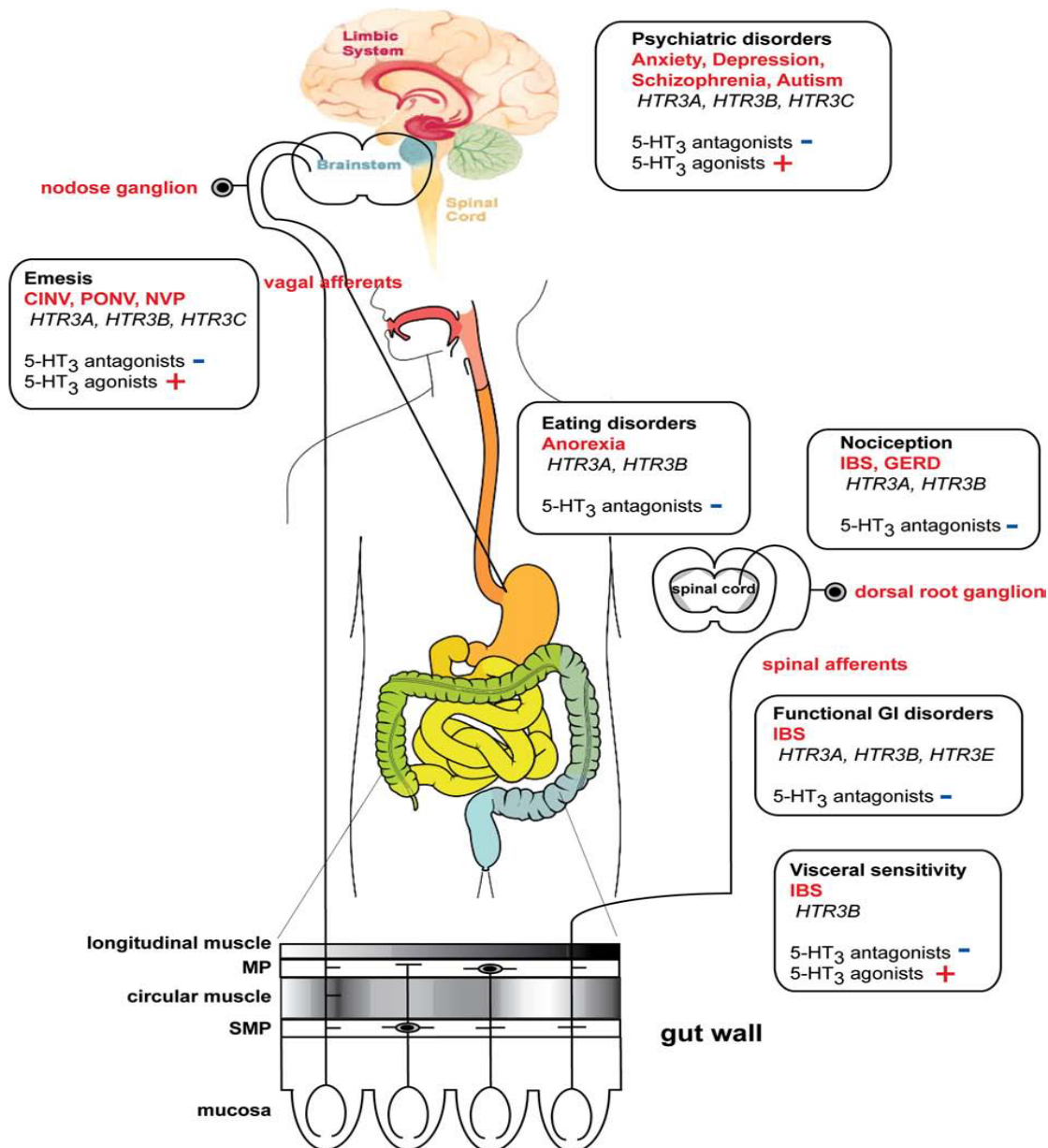


Figura 04: Papel dos receptores 5-HT₃ em diferentes condições patológicas. (Fonte: WALSTAB; RAPPOLD; NIESLER, 2010)

Controle cardiovascular e serotonina

No SNC a serotonina regula os centros cardiovasculares via neurônios da rafe obscura e pálida que se projetam para áreas autonômicas do tronco cerebral e medula espinal, enquanto que os neurônios da rafe dorsal e mediana se projetam para áreas prosencefálicas (CÔTE et al., 2004). As respostas cardiovasculares dos agentes serotoninérgicos variam de espécie para espécie e com o subtipo de receptor serotoninérgico estudado (SZABÓ; BUTZ; ALPER, 1998; RAMAGE, 2001). A serotonina e seus análogos, quando injetados centralmente, podem produzir tanto efeito hipotensor, quanto hipertensor (KUHN; WOLF;

LOVENBERG, 1980). Diversos trabalhos mostram que os principais receptores serotoninérgicos envolvidos na regulação cardiovascular são dos tipos 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃ (VILLALÓN et al., 1997; RAMAGE, 2001; CÔTE et al., 2004).

A ativação dos receptores 5-HT_{1A} na substância cinzenta periaquedutal (PAG) atenua a resposta taquicárdica evocada pela ativação farmacológica do hipotálamo dorsomedial (DMH) bem como a resposta taquicárdica e pressora induzida pelo estresse de jato de ar, mostrando que os receptores 5-HT_{1A} presentes na PAG têm importante papel na modulação da via descendente cardiovascular do DMH (VILLELA; da SILVA Jr.; FONTES, 2009). Esses dados confirmam o papel dos receptores 5-HT_{1A} na regulação cardiovascular observado anteriormente na literatura após microinjeções do 8-hidroxi-2-*N*-dipropilamino-tetralina (8-OH DPAT) no núcleo retrofacial que levou a diminuição da pressão sanguínea em ratos, gatos e cães (MCCALL; CLEMENT, 1994).

Recentemente foi demonstrado que os receptores do tipo 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B} participam do processo de remodelagem do tecido valvar aórtico induzido pelo colágeno em pacientes com disfunção cardiovascular (BALACHANDRAN et al., 2012). Além disso, é observado que os seus agonistas causam aumento da pressão sanguínea ao agir na periferia como potentes vasoconstritores (RAMAGE; VILLALON, 2008). Em humanos observa-se o uso do antagonista ketanserina no tratamento da hipertensão (NALIVAICO; SGOIFO, 2009).

Bonagamba et al. (2000) mostraram que a administração do *m*-CPBG, no núcleo do trato solitário (NTS) causa redução dose-dependente da resposta depressora e bradicárdica a microinjeção local ipsilateral do *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). A aplicação ionoforética do antagonista dos receptores 5-HT₃, granisetron, atenua a ativação dos neurônios do NTS pelos aferentes cardiopulmonares (RAMAGE; VILLALÓN, 2008).

Dados do nosso laboratório (FERREIRA et al., 2005) mostram que a administração central no 3º ventrículo do agonista do receptor 5-HT₂, *meta*-clorofenilpiperazina (mCPP), resulta em significativa resposta hipertensiva em ratos não estressados, sendo o período inicial dessa resposta hipertensiva acompanhado por bradicardia reflexa. Anteriormente demonstramos que a estimulação farmacológica dos receptores 5-HT₃ através de injeções com *m*-CPBG no 3º ventrículo induz significativa diminuição da pressão sanguínea em ratos não estressados e impede que haja aumento da pressão arterial quando os animais são submetidos ao estresse de contenção (FERREIRA et al., 2004). Porém, até o momento não foi estudado o efeito cardiovascular dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM em ratos submetidos ao estresse de contenção.

Serotonina e apetite por sódio

Devido à grande importância do balanço de Na^+ para a homeostasia dos líquidos corporais, grande número de estudos tem sido realizado para melhor caracterização das vias neuronais que regulam o apetite por sódio. Os circuitos serotoninérgicos originados da rafe mesencefálica têm sido apresentados como participantes da homeostase hidroeletrólítica (REIS et al., 1994; FRANCHINI et al., 2002; LIMA et al., 2003). A depleção de sódio diminui, enquanto que a ingestão de salina hipertônica aumenta a expressão de *FOS* em neurônios serotoninérgicos localizados no núcleo dorsal da rafe (GODINO et al., 2007), mostrando a importância do sistema serotoninérgico na regulação da ingestão de sódio.

O sistema serotoninérgico central pode regular o apetite por sódio por ação em estruturas do tronco cerebral tais como o núcleo parabraquial lateral (LPBN) e em áreas prosencefálicas (MAGALHAES-NUNES et al., 2007). Dados anteriores do nosso laboratório mostram que a administração intracerebroventricular dos agonistas dos receptores 5-HT_{2B/2C} e dos receptores dos 5-HT₃ inibe a ingestão de sódio (CASTRO et al., 2003). Além disso, o bloqueio farmacológico dos receptores 5-HT₂, na amígdala medial, pelo antagonista *cis*-4,5,7^a,8,9,10,11,11^a-Octahidro-7H-10-metilindol[1,7-bc][2,6]-naftiridino fumarato (SDZ SER 082) reduz significativamente a ingestão de sódio em ratos sódio-depletados (LUZ et al., 2006). Posteriormente, verificamos que a ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ reduz a ingestão de sódio em animais sódio-depletados sendo este efeito revertido com o pré-tratamento com ondansetrona (LUZ et al., 2007). Esses dados levam-nos a concluir que o sistema serotoninérgico tem importante participação no controle da ingestão de sódio por agir em estruturas prosencefálicas envolvidas nesse controle. Entretanto, até o presente momento não se conhece o efeito desses receptores no controle do apetite por sódio na ASM.

Serotonina e estresse

O termo “estresse” foi definido na década de 1930 como sendo a resposta fisiológica adaptativa dos organismos às mudanças físicas ou emocionais perceptíveis ou não pelo endocrinologista Hans Selye (LAURACHE; MULAK; TACHÉ, 2011). Entretanto, os estudos sobre a fisiologia do estresse foram iniciados em 1915 após a observação por W. Cannon de que as respostas de “fuga ou luta” ocasionadas por distúrbios orgânicos e ou ambientais

tenham envolvimento do sistema simpático, o qual levava ao aumento da frequência cardíaca e da respiração, bem como a inibição de respostas vegetativas relacionadas com reprodução, digestão, crescimento e alimentação (LAURACHE; MULAK; TACHÉ, 2011).

O estressor pode ser entendido como fator ou estímulo que leva a alteração do estado de homeostasia. De acordo com os dados da literatura está agrupado em 4 categorias principais: 1) estressor de natureza física que pode ser causado pelo frio, calor, radiação intensa e outros fatores; 2) estressor de natureza psicológica que reflete uma resposta apreendida em uma experiência adversa prévia; 3) estressor de natureza social que reflete alterações nas interações entre indivíduos e 4) estressor que desafia a homeostasia metabólica e cardiovascular, como por exemplo exercício físico (PACÁK e PALKOVITS, 2001). A resposta do organismo ao estressor ocorrerá através de um padrão integrado de mudanças endócrinas, autonômicas e comportamentais que foi conservado ao longo da evolução através das espécies de mamíferos sendo vista como uma resposta adaptativa por possibilitar a sobrevivência do indivíduo (DIMICCO et al., 2006).

Diversos estudos têm tentado ratificar a hipótese de que as diferenças individuais na reatividade ao estresse estão associadas à predisposição genética e envolve a desregulação do sistema serotoninérgico ligado ao polimorfismo do transportador de serotonina. Gardner et al. (2009) demonstram que há aumento da expressão do RNA_m para serotonina em neurônios da rafe dorsal em ratos adultos submetidos a estresse social e que esta expressão é mais intensa em animais que foram submetidos a estresse em idade precoce como por exemplo, separação maternal, mostrando sensibilidade dos neurônios da rafe ao estresse. Em humanos observou-se que a presença de uma ou duas cópias da região polimórfica do transportador de 5-HT aumenta de forma expressiva os sintomas depressivos e suicidas quando comparados com indivíduos homocigotos, mas somente em consequência de eventos de vida estressantes (GARDNER et al., 2009; NIETZER et al., 2011).

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de terminais nervosos de 5-HT ou receptores de 5-HT em regiões cerebrais responsáveis pelas respostas neuroendócrinas (hipocampo, hipotálamo, tronco cerebral, etc) e regiões comportamentais ao estresse (amígdala, hipocampo, córtex, substância cinzenta periaquedutal etc) (CHAOULOFF; BERTON; MORMÉDE, 1999). Lopes et al. (1999) demonstraram haver redução pósináptica de receptores do tipo 5-HT₁ em resposta ao estresse crônico e estresse agudo intenso em ratos. Nalivaiko e Sgoifo (2006) mostraram que a administração sistêmica de 8-hidroxi-2-N-

dipropilamino-tetralina (8-OH-DPAT-agonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}) diminui a resposta taquicárdica e pressora causados pelo estresse de jato de ar em coelhos e pelo

estresse de restrição em ratos (NALIVAICO; SGOIFO, 2009). Dados do nosso laboratório mostraram que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2C} centrais impede a resposta hipertensiva característica do estresse sem modificar a resposta taquicárdica (FERREIRA et al., 2005). O tratamento crônico de ratos Wistar machos e fêmeas com tropisetron e ondansetrona, ambos antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃, reduz ou reverte o aumento da pressão sanguínea induzida pelo estresse psicológico (NALIVAICO; SGOIFO, 2009), mostrando que a 5-HT é um importante neurotransmissor que medeia as mudanças cardiovasculares induzidas pelo estresse.

Com o avanço da biologia molecular foi possível caracterizar os peptídeos, neurotransmissores e fatores envolvidos na resposta ao estresse e com isso foi possível entender que quando ocorre a percepção do estímulo estressor diversas regiões cerebrais tais como, amígdala, córtex prefrontal, ponte e bulbo, ativam o núcleo paraventricular do hipotálamo induzindo a liberação do fator liberador de corticotrofina e de arginina-vassopressina que agem dentro do sistema porta hipofiseal. A terminação da resposta ao estresse ocorre através de um “feedback negativo” que em humanos é devido ao cortisol e em, roedores, em resposta a corticosterona (LARAUCHE; MULAK; TACHÉ, 2011).

Caracterização anatômica da área septal medial

A área septal é um agrupamento de núcleos localizados entre os cornos anteriores dos ventrículos laterais e abaixo do corpo caloso. É parte integrante do sistema límbico e faz conexão com o hipotálamo e o tronco cerebral. A área septal apresenta duas divisões principais, o septo lateral (LS) e o septo medial/ banda diagonal de Broca que por sua vez são subdivididas em quatro grupos: grupo lateral (septo lateral (LS), septofimbrial e o núcleo septohipocampal); complexo septal medial (núcleos septal medial (ASM) e banda diagonal de Broca (BDB); grupo posterior (núcleos triangulares e leito da comissura anterior e da estria medular); e grupo ventral (núcleo do leito da estria terminal) (HAGHDOOST-YAZD et al., 2009).

O complexo septo medial/ banda diagonal de Broca (ASM/DB) recebe projeções serotoninérgicas principalmente da rafe mediana (ALREJA, 1996). O complexo ASM/DB também apresenta alta densidade de fibras e receptores nicotínicos, muscarínicos, e GABAérgico (THINSCHMIDT et al., 2005). Sabe-se também que o complexo ASM/DB

contém neurônios glutamatérgicos (HUH et al., 2008) e neurônios que coexpressam marcadores para vários fenótipos de neurotransmissores, mostrando que esses neurônios tem a capacidade molecular para co-liberar múltiplos transmissores (HUH et al., 2008).

Estudos neuroanatômicos têm mostrado que a ASM recebe e envia projeções para áreas prosencefálicas envolvidas na regulação cardiovascular e balanço hidroeletrólítico, tais como o órgão subfornical (SFO), a área preóptica medial (mPOA) e o hipotálamo lateral (LH) (PAULIN et al., 2009).

Neurônios do complexo ASM/DB projetam-se para o hipocampo modulando atividades cognitivas como a memória (HUH et al., 2008). A destruição de neurônios da mPOA e da ASM através da injeção intracerebral com NMDA leva ao aumento da temperatura corpórea de ratos, sendo a resposta semelhante quando apenas a mPOA foi lesionada mostrando que a ASM também apresenta influência na termorregulação através da mPOA (SRIVIDYA; MALLICK; KUMAR, 2007).

Área septal medial no controle cardiovascular, equilíbrio hidroeletrólítico e estresse.

Evidências têm demonstrado que a ASM, um subnúcleo da área septal, está envolvida na regulação cardiovascular e no balanço do líquido eletrólítico. Barbosa et al. (1995) demonstraram que o tratamento com atropina nas doses de 0,1 e 5,0 nmol na ASM reduz o efeito pressor e dipsogênico induzido pela injeção intracerebroventricular de carbachol. Além disso, a literatura tem demonstrado que a ASM apresenta conexões anatômicas e funcionais com sítios cerebrais envolvidos na regulação cardiovascular e eletrólítica como fora observado por Colombari et al. (1994) que ao lesionarem de forma eletrólítica a ASM observaram haver redução da resposta pressora e dipsogênica induzida pela injeção de ANG II no órgão subfornical (SFO) (BARBOSA et al., 1995; COLOMBARI et al., 1994).

Estudos posteriores demonstraram que a ASM apresenta conexões também com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), estrutura que se caracteriza por ser um centro integrador de sinais neurais envolvidos na regulação da pressão arterial, no comportamento de ingestão e na liberação de vasopressina, dado esse confirmado após a injeção de losartan, antagonista seletivo dos receptores da angiotensina II, na dose de 40 nmol no PVN que causou o bloqueio da resposta da ANGII injetada na ASM em relação ao comportamento de ingestão de água e sódio e resposta pressora (CAMARGO et al., 2002).

Saad et al. (2004) demonstraram que a injeção de losartan na dose de 80nmol, no núcleo supraóptico (SON) reduz a ingestão de água e NaCl e aumenta a pressão arterial média (PAM) induzida pela ativação angiotensinérgica da área septal lateral (ASL) que é circunvizinha a ASM. Camargo et al. (2007) demonstraram que a injeção de vasopressina do tipo 2 (A₂AVP) em diferentes doses na ASM aumenta a ingestão de água induzida por privação hídrica (24h), além de aumentar a ingestão de sódio em ratos sódio depletados (SAAD et al., 2004; CAMARGO et al., 2007).

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da ASL na modulação comportamental e neuroendócrina ao estresse como apresentado por Kubo et al. (2002) que ao injetarem previamente, ao período do estresse, muscimol, agonista dos receptores do ácido gama amino-butírico (GABA-A), ASL ocorreu o bloqueio da resposta pressora característica do estresse de imobilização. Entretanto, a literatura até o momento não havia demonstrado o papel da ASM no controle cardiovascular em resposta ao estresse o que tornou o nosso trabalho pioneiro nessa análise.

Dados anteriores do nosso laboratório têm demonstrado que o bloqueio farmacológico dos receptores do tipo 5-HT₃ localizados na ASM com ondansetrona causa aumento da pressão arterial além de aumentar de forma significativa a resposta bradicárdica seguida da hipertensão induzida pela fenilefrina em animais que receberam ondansetrona. Verificamos também que o aumento da pressão sanguínea seguido do bloqueio desses receptores é dependente da integridade dos receptores angiotensinérgicos AT1 localizados no complexo ASM/DB, haja vista que o pré-tratamento com losartan, antagonista dos receptores angiotensinérgicos AT1, bloqueou o efeito hipertensor induzido pela ondansetrona (URZEDO-RODRIGUES, et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que a área septal recebe projeções tanto colinérgicas quanto serotoninérgicas ou é composta de núcleos colinérgicos que recebem projeções serotoninérgicas (HELLWEG et al., 2001; DAVID- JELTSCH; KOENIG; CASSEL, 2008). Essa interação tem sugerido papel importante desses sistemas em distúrbios afetivos. Entretanto, a maioria dos estudos sobre esses sistemas tem sido focada apenas em aspectos cognitivos. Embora os receptores 5-HT₃ e colinérgicos estejam presentes na ASM a função desses sistemas na regulação cardiovascular ainda não tem sido estudada o que ratifica um dos objetivos desse estudo.

Baseado nesses dados nos propusemos também a estudar o papel dos receptores do tipo 5-HT₃ presentes na ASM sobre o equilíbrio hidrossalino, com base no efeito do bloqueio

desses receptores sobre a ingestão de água em animais sob privação hídrica e sobre o efeito do apetite por sódio em animais sódio-depletados.

V-OBJETIVOS e HIPÓTESES

Objetivo geral:

Investigar a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM nas respostas cardiovasculares ao estresse, no comportamento de ingestão de sódio e água e sua interação com vias colinérgicas.

Objetivos Específicos:

1. Verificar o efeito da ativação e do bloqueio farmacológico dos receptores 5-HT₃ presentes na ASM nas respostas cardiovasculares em ratos submetidos ao estresse.
2. Estudar o papel dos receptores colinérgicos nas respostas cardiovasculares induzidas pelo bloqueio dos receptores 5-HT₃ presentes na ASM em ratos não-estressados.
3. Verificar o papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM sobre o comportamento de ingestão de sódio em animais sódio-depletados.
4. Verificar o efeito do bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM sobre o comportamento de ingestão de água em animais sob privação hídrica.

HIPÓTESES

1. A ativação dos receptores 5-HT₃ presentes na ASM impede a resposta pressora ao estresse em ratos.
2. O bloqueio dos receptores 5-HT₃ presentes na ASM aumenta a resposta pressora ao estresse em ratos.
3. A resposta pressora induzida pelo bloqueio dos receptores 5-HT₃ na ASM em ratos não-estressados depende da atividade colinérgica nesta área.
4. O bloqueio dos receptores 5-HT₃ na ASM em ratos sódio-depletados bloqueia o comportamento de ingestão de sódio.
5. O bloqueio dos receptores 5-HT₃ na ASM em ratos sob privação hídrica estimula a ingestão de água

VI- MATERIAIS E MÉTODOS

VI. 1- Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos pesando 280-310g provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Cirurgias:

VI. 2- Implante de cânula na Área Septal Medial (ASM)

Para o implante de cânulas de aço inoxidável (14 x 0,7 mm) área septal medial os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/11,5 mg/Kg) intraperitoneal. As seguintes coordenadas estereotáxicas do Atlas Paxinos (1986) foram usadas: antero-posterior = 0,5mm; lateral= 0,0mm; vertical = -5,0mm. Todas as medidas foram feitas tomando como referencia a linha sagital e o bregma.

As cânulas foram fixadas ao crânio bem como o parafuso de aço inoxidável com acrílico odontológico. Para prevenir possíveis obstruções das cânulas, mandris de aço inoxidável foram inseridos nas mesmas. Após o procedimento cirúrgico 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 - 0,2 ml/rato; im) e antiinflamatório/analgésico(flunixinina meglumina 2,5mg/kg; sc).

Após o implante das cânulas centrais os animais eram mantidos nas suas respectivas caixas individuais em sala com temperatura de 22±2 °C e luz controlada com período de claro/escuro de 12h sendo disponibilizados livremente ração e água filtrada durante o período pós-operatório. Durante quatro dias os animais eram diariamente manipulados para adaptação às condições experimentais.

VI. 3- Cateterização da carótida

Após quatro dias da cirurgia central para implante das cânulas e 24h antes do experimento os animais foram anestesiados novamente com cetamina/xilazina (80/11,5 mg/Kg) intraperitoneal para implante na carótida esquerda de catéter feito com polietileno

(PE50) preenchido com solução de heparina (1000U/ml) sendo exteriorizado no dorso do animal.

Após o procedimento cirúrgico 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 - 0,2 ml/rato; i.m) e antiinflamatório/analgésico (flunixinina meglumina 2,5mg/kg; sc)

VI. 4- Drogas e microinjeções

Foram utilizadas microseringas Hamilton de 10 µl (Hamilton Co. Inc.) para a microinjeção de drogas através das cânulas centrais. As microseringas eram conectadas ao tubo de polietileno (PE10) e a agulha injetora Gengival 30G de 15 mm. O volume injetado na ASM foi de 2µl. As drogas utilizadas foram obtidas da Sigma Aldrich da Tocris Cookson, Inc. Ballwin, M.O. , diluídas em salina isotônica estéril nas seguintes:

Salina isotônica (NaCl 0,15 M)

[1-(3-Clorofenilbiguanidina)], (m-CPBG)- agonista seletivo dos receptores 5-HT₃ na dose de 160 nmol.

Ondansetrona- antagonista seletivo dos receptores 5-HT₃ nas doses de 80 e 160 nmol.

Atropina- antagonista colinérgico muscarínico nas doses de 2,5 e 5,0 nmol.

Furosemida- diurético de alça (10mg/kg, s.c).

VI. 5- Registro da pressão arterial pulsátil

Após 24h da cirurgia de cateterização da carótida os animais tiveram seus catéteres conectados ao transdutor de pressão arterial e este ao amplificador e ao sistema de aquisição de dados (AqDados versão 5,0 – Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda). A taxa de aquisição de dados foi de 1000Hz, a pressão sistólica, diastólica e a frequência cardíaca foram calculadas a partir do registro da pressão pulsátil através do programa de software Acqknowledge. Segue abaixo o cálculo utilizado para pressão arterial média, delta PAM e delta da FC:

$$PAM = PD + 1/3(PS - PD)$$

Delta PAM: $PAM_n - PAM_{basal}$ (sendo n o valor da pressão arterial média a cada 5min do experimento)

Delta FC: $FC_n - FC_{basal}$ (sendo n o valor da frequência cardíaca a cada 5min do experimento)

Pressão basal: PAM no tempo 10 min – PAM no tempo de 5 min

VI. 6- Descrição dos grupos experimentais

GRUPO EXPERIMENTAL 1 - Respostas cardiovasculares ao estresse em ratos após a ativação ou o bloqueio dos receptores 5-HT₃ presentes na ASM.

GRUPO EXPERIMENTAL 2- Respostas cardiovasculares ao bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM e papel das vias colinérgicas

GRUPO EXPERIMENTAL 3- Estudo do papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM sobre o comportamento de ingestão de sódio em ratos sódio-depletados

GRUPO EXPERIMENTAL 4- Estudo do papel dos receptores serotoninérgicos 5HT₃ na ingestão de água em animais sob privação hídrica.

VI. 7- Procedimentos Histológicos

Após os experimentos os animais foram anestesiados com tionembutal sofrendo perfusão cardíaca a tórax aberto, inicialmente com salina 0,9% no volume de 300 ml seguido de formol a 10% no mesmo volume da salina. Os cérebros foram retirados e mantidos por 24 horas em formol a 10% e trocados para solução salina glicosada a 30%, posteriormente os cérebros foram seccionados com o auxílio do criostato na espessura de 40µm. Após 24 horas na estufa os cortes foram corados com cresil violeta para posterior análise do posicionamento da cânula.

VI. 8- Análise estatística

Os dados de delta PAM e delta da FC foram submetidos a ANOVA Two way para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni sendo plotados no GrafPad. Os dados obtidos sobre apetite por sódio bem como para os de privação hídrica foram submetidos ao teste ANOVA One Way seguido do pós teste de Student Newmann e Keuls para análise cumulativa da ingestão de sódio e água. Os valores de significância foram $p \leq 0,05$.

VII-RESULTADOS

7.1. Respostas cardiovasculares ao estresse em ratos após a ativação ou o bloqueio dos receptores 5-HT₃ presentes na ASM.

A figura 5 mostra o efeito da microinjeção do agonista e do antagonista dos receptores 5HT₃, ambos na dose de 160 nmol, sobre as alterações da PAM (Painel A) e FC (Painel B) na ASM (Figura 10). Observou-se que a injeção do agonista (salina/*m*-CPBG) inibiu o efeito hipertensor induzido pelo estresse quando comparado com os animais controles (salina/salina). Sendo essa resposta bloqueada pelo pré-tratamento com o antagonista (ondansetrona/*m*-CPBG). Os valores para a PAM de cada grupo foi: salina/salina 103 ± 2 mmHg; salina/*m*-CPBG 109 ± 2 mmHg e ondansetrona/*m*-CPBG 94 ± 4 mmHg. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas da PAM indicou que houve alteração estatística significativa na variável interação tempo X tratamento [$F_{(340,40)} = 3,214$ $p \leq 0,0001$; na variável tempo [$F_{(340,20)} = 14,42$ $p \leq 0,0001$ e na variável tratamento [$F_{(340, 2)} = 11,21$ $p= 0,0008$].

Em relação à FC (Painel B) o tratamento com *m*-CPBG foi capaz de inibir o efeito taquicárdico característico da resposta ao estresse, quando comparado com os animais controles. Este efeito inibitório foi parcialmente revertido pelo pré-tratamento com ondansetrona. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas da FC indicou que houve alteração significativa na variável tempo X tratamento [$F_{(340, 40)} = 4,964$ $p \leq 0,0001$; na variável tempo [$F_{(340,20)} = 12,01$ $p \leq 0,0001$ e na variável tratamento [$F_{(340, 2)}= 12,82$ $p= 0,0004$].

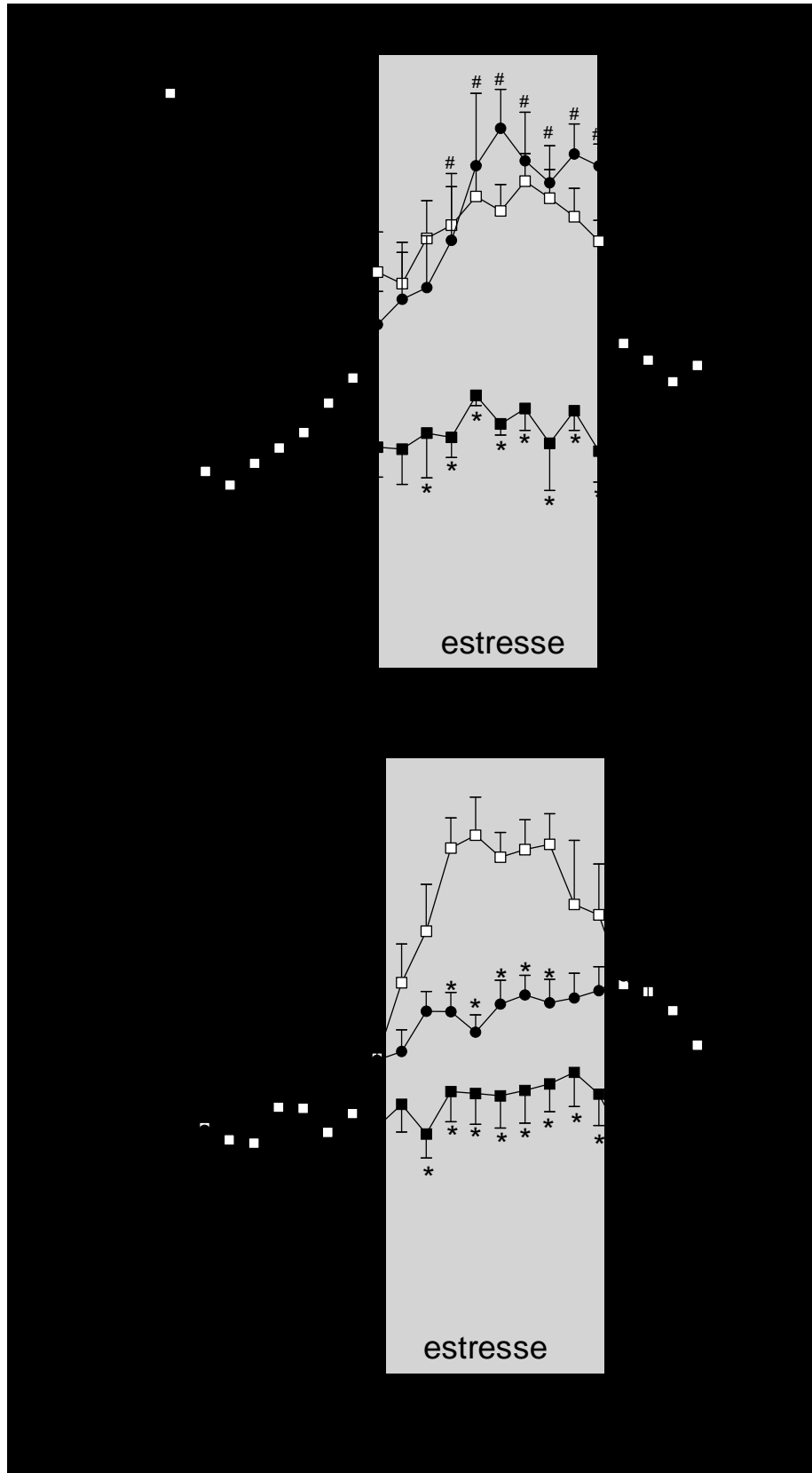


Figura 5. Alteração da PAM e FC em animais submetidos ao estresse de contenção após ativação e bloqueio dos receptores 5HT₃. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * indica diferença estatística entre os animais tratados com salina e os demais tratamentos. # Indica diferença estatística significativa entre o grupo tratado com salina + *m*-CPBG e ondansetrona + *m*-CPBG $p \leq 0,05$.

7.2- Respostas cardiovasculares ao bloqueio dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM e papel das vias colinérgicas

A figura 6 mostra o efeito da atropina nas doses de 2,5 e 5,0 nmol sobre as alterações da PAM (Painel A) e FC (Painel B) induzida pelo bloqueio dos receptores 5HT₃ presentes na ASM. Observou-se que após 5 min da injeção de ondansetrona na dose de 160 nmol houve um aumento significativo na PAM em comparação ao grupo controle. O efeito hipertensor induzido pela ondansetrona na dose de 160 nmol foi inibido pelo pré-tratamento com atropina, um antagonista colinérgico muscarínico, na dose de 5 nmol, enquanto que a dose de 2,5 nmol da atropina não conseguiu reverter o efeito hipertensor da ondansetrona. A PAM basal de cada grupo foi: atropina 5nmol/ondansetrona 105±2 mmHg, atropina 2,5 nmol/ondansetrona 100 ±3 mmHg, salina/ondansetrona 111 ±2 mmHg, salina/salina a PAM basal 104 ±2 mmHg. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni mostrou que houve alteração significativa na variável interação tempo X tratamento [$F_{(638, 66)} = 3,026$ $p \leq 0,0001$; na variável tempo [$F_{(638, 22)} = 21,94$ $p \leq 0,0001$ e na variável tratamento $F_{(638, 3)} = 26,16$ $p \leq 0,0001$].

Em relação à FC nenhum dos tratamentos usados para este experimento induziu qualquer diferença estatística. (FC, painel B). A FC basal para os animais tratados com atropina 5nmol + ondansetrona foi de 336 ± 9 bpm, atropina de 2.5 nmol/ondansetrona foi de 342 ± 17 bpm, salina/ondansetrona foi de 324 ± 10bpm e para os animais que receberam salina/salina foi de 371 ± 8bpm. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni indica que na interação tempo X tratamento não houve significância estatística [$F_{(638,66)} = 0,7264$ $p= 0,947$; havendo apenas mudança significativa na variável tempo [$F_{(638, 22)} = 5,543$ $p \leq 0,0001$. Porém a variável tratamento $F_{(638, 3)}= 1,265$ $p= 0,3049$] também não foi estatisticamente significativa.

A figura 07(painel A) mostra o efeito da microinjeção de atropina nas doses de 2,5 e 5,0 nmol na ASM sobre as respostas cardiovasculares. Verifica-se que a PAM foi semelhante nos animais tratados com atropina e nos animais que receberam microinjeções de salina na ASM. A PAM basal nos animais tratados com salina/salina foi de 104 ±2 mmHg; salina/atropina 2.5 nmol foi de 108 ± 4 mmHg e para o grupo tratado com salina/atropina 5,0 nmol foi de 107 ±2 mmHg. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni mostrou que não houve nenhuma alteração significativa na variável interação tempo X tratamento [$F_{(396,2)} = 1,929$ $p= 0,1742$; porém na variável tempo

houve alteração significativa [$F_{(396,22)} = 3,449$ $p \leq 0,0001$], mas não ocorreu significância estatística na variável tratamento [$F_{(396,44)} = 0,9044$ $p = 0,648$].

Observa-se que a FC (FC, painel B) também não foi modificada por qualquer dos tratamentos. Os valores basais para a FC foi: salina/salina 371 ± 8 bpm; salina/atropina 2,5 nmol 359 ± 20 bpm e para os animais tratados com salina/atropina 5,0 nmol 373 ± 11 bpm. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas da FC que na interação tempo X tratamento não houve qualquer significância estatística, [$F_{(396,44)} = 0,9180$ $p = 0,6239$], bem como na variável tratamento [$F_{(396,2)} = 0,3479$ $p = 0,7108$]; havendo apenas significância na variável tempo [$F_{(396,22)} = 3,642 \leq 0,000$].

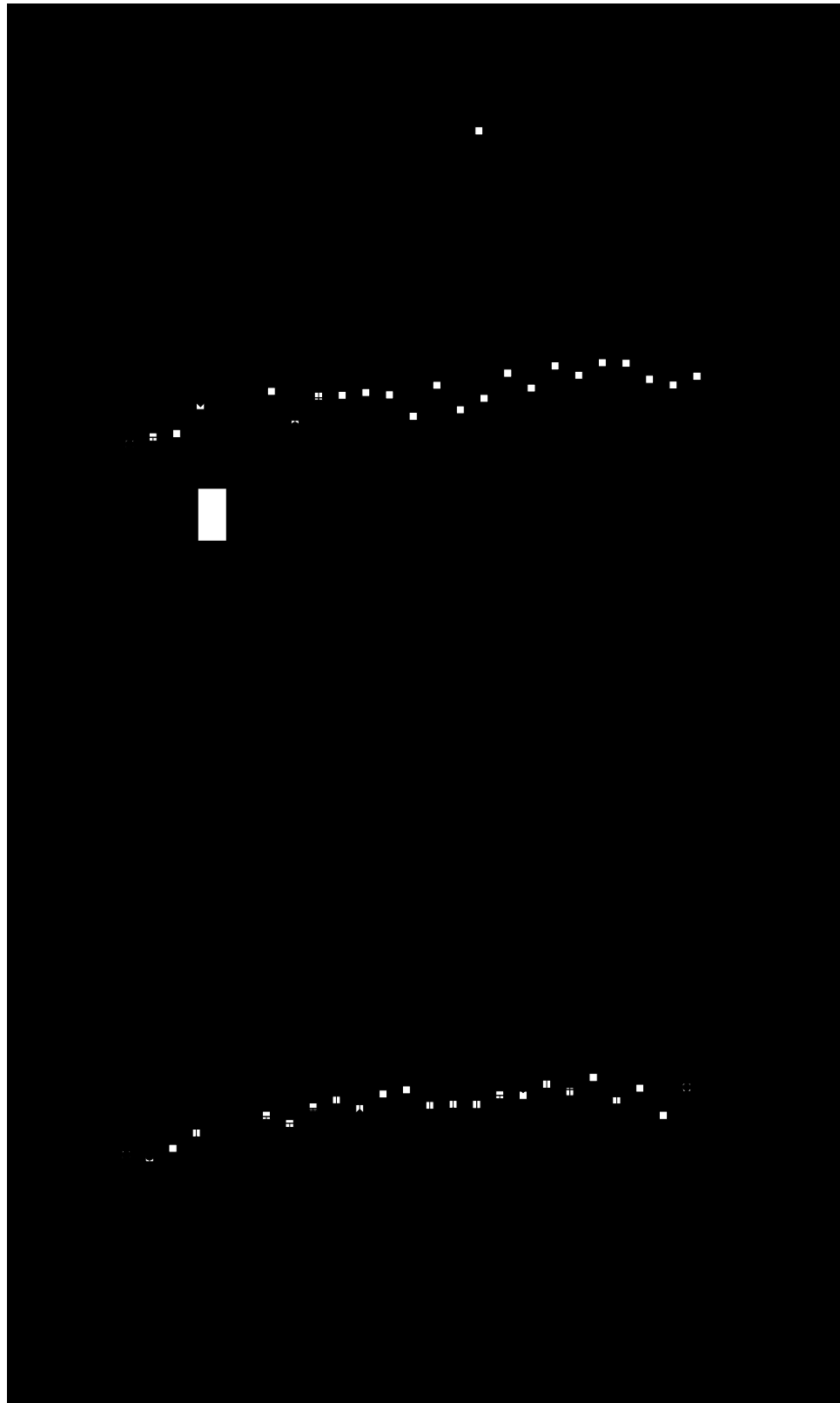


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com atropina nas doses de 2,5 e 5 nmol sobre a variação da pressão arterial média (PAM, painel A) e da frequência cardíaca (FC, painel B) em animais que receberam microinjeções de ondansetrona na dose de 160 nmol na ASM. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * indica diferença estatística significativa (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$) entre grupo tratado com salina + ondansetrona e os demais tratamentos e o # indica diferença estatística significativa entre o grupo tratado com atropina + ondansetrona e o grupo tratado com salina + ondansetrona.

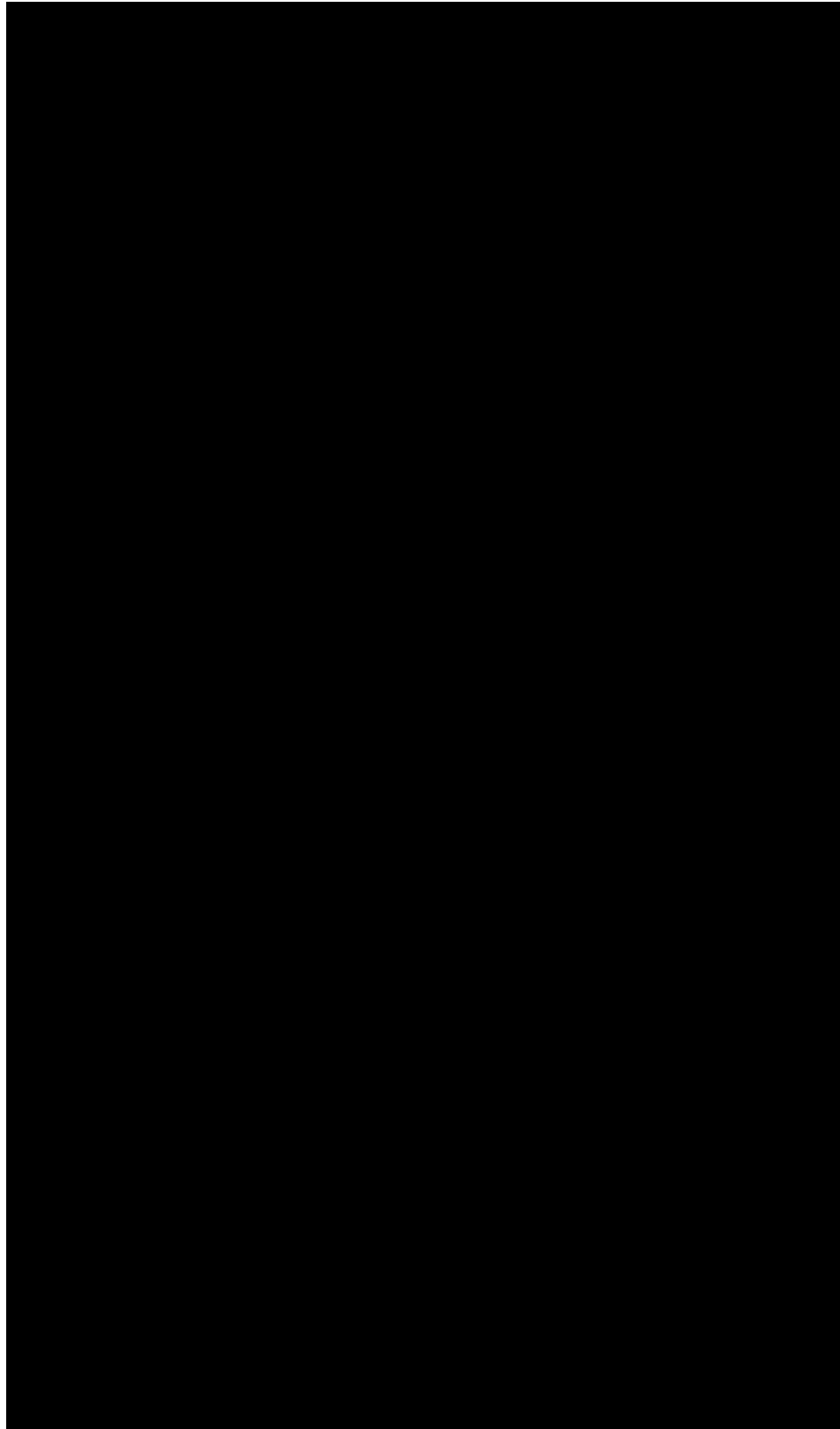


Figura 7. Efeito do tratamento com atropina nas doses de 2,5 e 5 nmol na ASM sobre a variação da pressão arterial média (PAM, painel A) e da frequência cardíaca (FC, painel B) em animais normotensos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

7.3- Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores serotoninérgicos do tipo 5HT₃ em região próxima a área septal medial (área septal lateral ventral) sobre as respostas cardiovasculares.

A tabela 02 mostra o efeito do bloqueio dos receptores 5HT₃ presentes em áreas circunvizinhas a ASM sobre a PAM e FC. Não foi observado qualquer alteração na PAM (painel A) quando comparado com o grupo controle. Os valores de PAM basais nestes grupos foram: grupo controle 104 ± 3 mmHg e para o grupo experimental foi de 114 ± 1 mmHg. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni mostra que nenhuma mudança significativa houve na interação tempo X tratamento [$F_{(132,22)} = 0,8032$ $p = 0,7172$ e na variável tratamento [$F_{(132,1)} = 8,776$ $p = 0,0252$; houve alteração significativa apenas na variável tempo [$F_{(132, 22)} = 5,676$ $p \leq 0,0001$].

Em relação à FC (FC, painel B) a administração de ondansetrona também foi incapaz de gerar qualquer efeito significativo quando comparada ao controle. Os valores basais de FC para o grupo controle foi 369 ± 12 bpm e para o grupo experimental foi de 342 ± 9 bpm. A análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni para as análises mostra que houve alteração significativa na variável interação tempo X tratamento [$F_{(132, 22)} = 1,994$ $p = 0,0091$ e na variável tempo [$F_{(132, 22)} = 3,139$ $p \leq 0,0001$, porém, nenhuma significância estatística na variável tratamento [$F_{(132, 1)} = 0,03867$ $p = 0,8506$ foi observada.

Tabela 2. Efeito da injeção de ondansetrona na dose de 160 nmol ou salina em áreas circunvizinhas a ASM sobre a variação da pressão arterial média (PAM, painel A) e frequência cardíaca(FC, painel B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

Drogas Tempo	Δ PAM (mmHg)		Δ FC (bpm)	
	Salina	Ondansetrona 160nmol	Salina	Ondansetrona 160nmol
0	109 \pm 1.2	120 \pm 3.3	405 \pm 16.2	349 \pm 14.8
10	108 \pm 1.6	123 \pm 4.6	408 \pm 22.7	348 \pm 16.3
30	107 \pm 0.9	124 \pm 1.9	391 \pm 13.6	372 \pm 10.9
60	109 \pm 1.4	128 \pm 3	371 \pm 28.4	426 \pm 10.9
90	113 \pm 1.8	127 \pm 1.2	418 \pm 34	401 \pm 25.7

7.4- Papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM sobre o apetite por sódio em animais depletados deste íon.

A figura 8 mostra o efeito dos receptores 5HT₃ presentes na ASM sobre a ingestão cumulativa de sódio a 1,5% e ingestão cumulativa de água em animais sódio-depletados. O *m*-CPBG, agonista dos receptores serotoninérgicos 5HT₃, foi administrado na dose de 160 nmol, enquanto que seu antagonista, ondansetrona, foi administrado nas doses de 80 e 160 nmol. Os animais controles receberam salina isotônica. A análise de variância ANOVA One-Way seguido do pós-teste de Newman keuls mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa na ingestão de sódio ao longo dos tempos observados nos grupos experimentais (*m*-CPBG 160nmol, ondansetrona 80 nmol e 160 nmol) quando comparado com os animais controle.

Em relação ao comportamento de ingestão de água, como esperado, o resultados de todos os tratamentos foram similares sem diferença estatística significativa

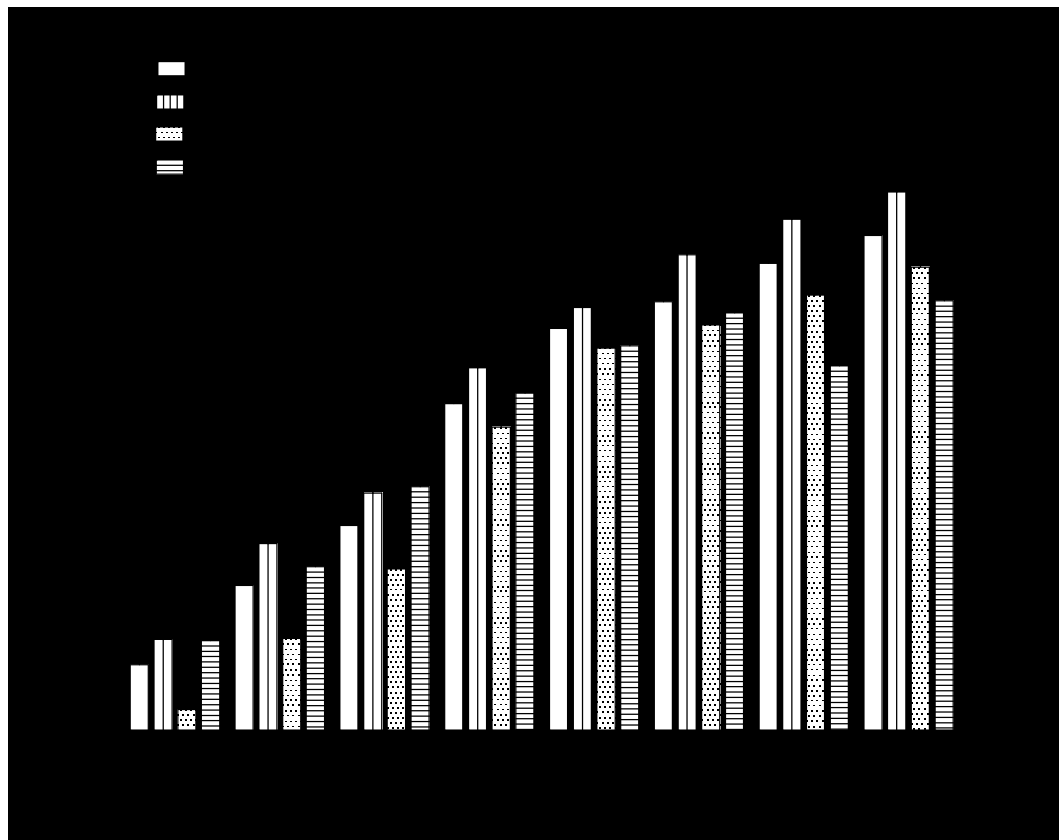


Figura 8. Papel dos receptores 5HT₃ presentes na ASM sobre o apetite por sódio em animais depletados deste íon. Os resultados estão expressos como média ± EPM.

7.5 Papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM sobre o comportamento de ingestão de água em animais sob privação hídrica por 24h.

A figura 9 mostra o efeito do bloqueio farmacológico dos receptores 5HT₃ presentes na ASM em animais sob privação hídrica. O antagonista dos receptores 5HT₃, ondansetrona foi administrado na dose de 160 nmol bem como o agonista *m*-CPBG no grupo experimental e os animais controles receberam salina isotônica. A análise dos dados com o uso da ANOVA One-Way mostrou que não houve qualquer alteração no comportamento de ingestão de água em animais privados por 24h tratados com ondansetrona ou *m*-CPBG quando comparado com os animais controle.

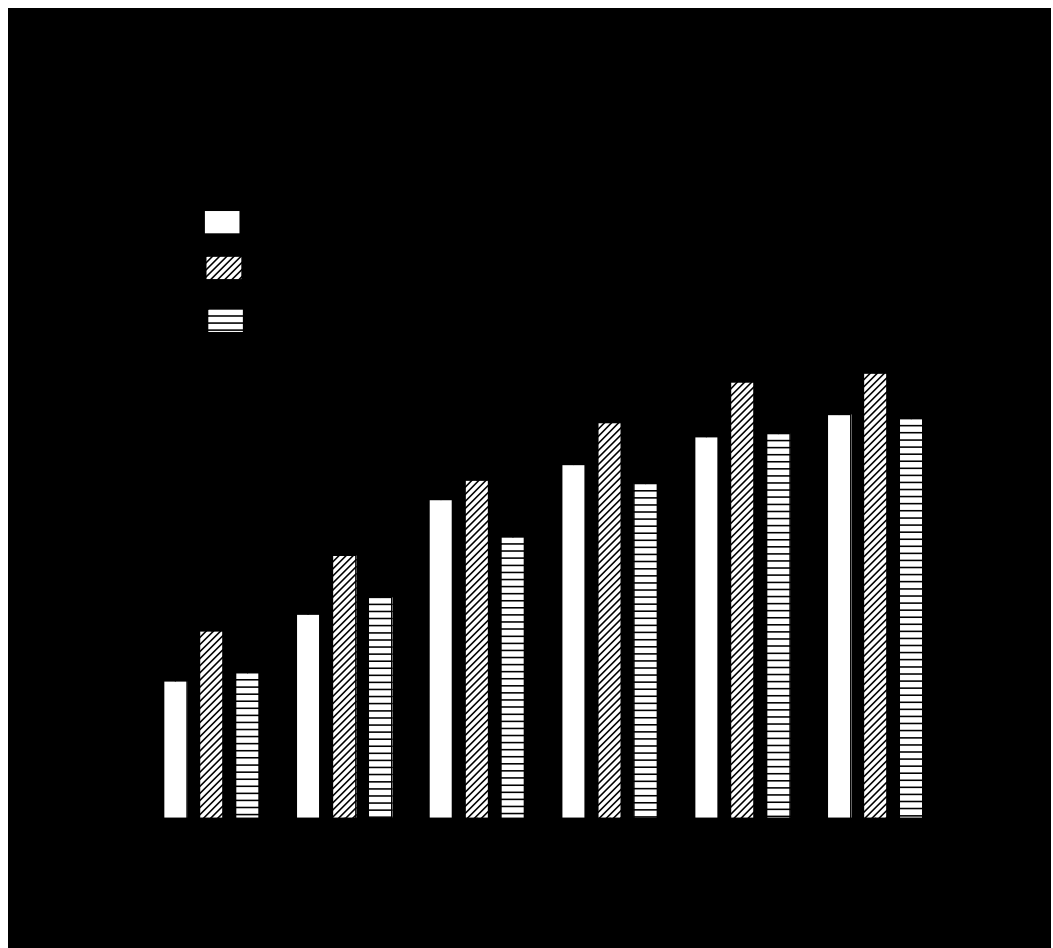
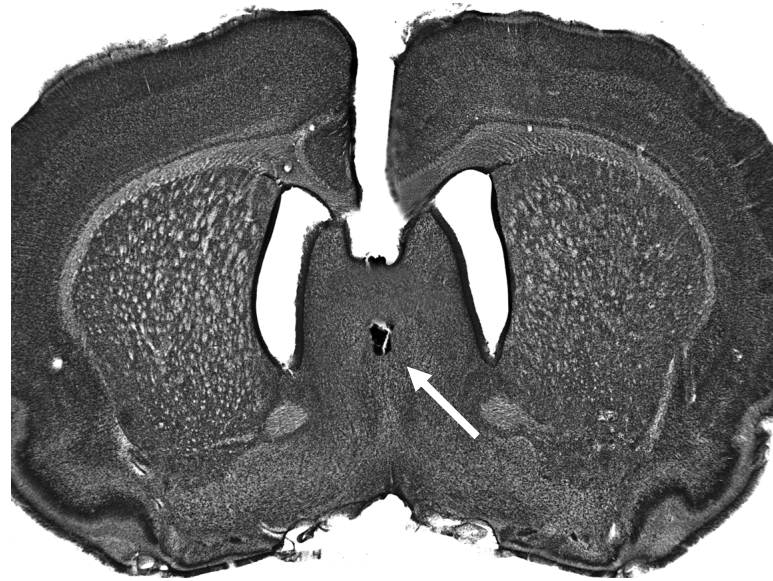


Figura 9. Papel dos receptores do tipo 5HT₃ presentes na ASM em animais sob privação sobre a ingestão de água. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

A



B

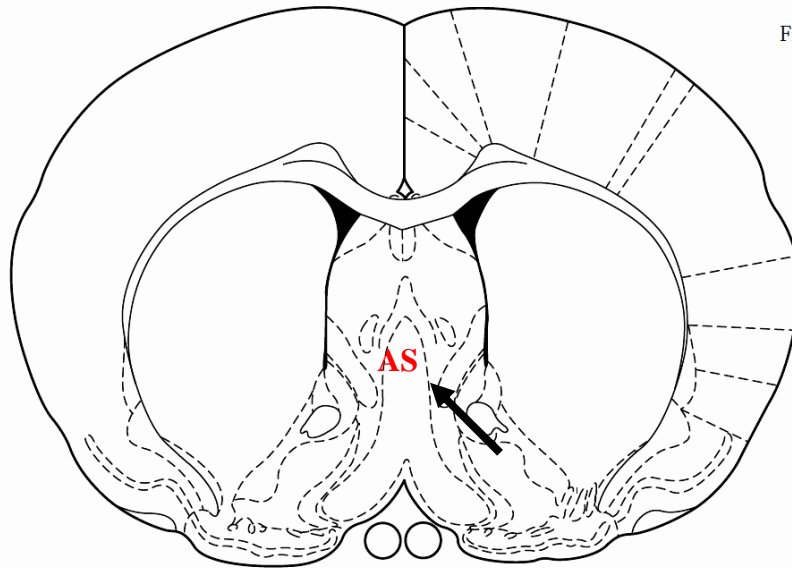


Figure 17

Bregma: 0.2 mm

Figura 10. Fotomicrografia (A) e diagrama (B) mostrando a localização do sítio de injeção na ASM (Atlas Paxinos and Watson 1998)

VIII- DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que a injeção de *m*-CPBG na ASM (Figura 10) inibe a resposta hipertensiva característica do estresse de contenção. Além disso, verificamos que a elevação da pressão sanguínea induzida pelo bloqueio dos receptores 5-HT₃, presentes na ASM, depende da integridade funcional dos receptores muscarínicos. Observamos também que a ondansetrona é incapaz de causar qualquer efeito na PAM ou FC quando injetada na ASL. Por outro lado, o bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃, na ASM, não altera o apetite por sódio em animais depletados deste íon bem como não modifica o comportamento de ingestão de água em animais submetidos à privação hídrica.

As consequências psicológicas e comportamentais da exposição ao estresse têm sido foco de intensa pesquisa desde o século passado. O estresse prolongado tem sido mostrado como a principal causa do desenvolvimento de ansiedade e depressão (FLÜGGE, 1995). Embora o cérebro como um todo responda a estímulos estressores, estudos têm demonstrado que algumas áreas apresentam papel mais relevante nos mecanismos regulatórios que visem restabelecer a homeostasia em resposta às perturbações do meio externo e/ou interno do indivíduo. Entre elas podemos destacar o núcleo paraventricular, estruturas límbicas, substância cinzenta periaquedutal, o hipotálamo e o tronco cerebral.

Dados recentes do nosso grupo mostraram que a ativação dos receptores 5-HT₃, presentes na ASM, em animais sob condições basais não causa qualquer alteração da pressão sanguínea ou frequência cardíaca (URZEDO-RODRIGUES et al., 2001). Entretanto, no presente estudo verificamos que o pré-tratamento com *m*-CPBG na dose de 160 nmol em animais estressados inibe o efeito hipertensor decorrente da resposta ao estresse, sendo este efeito bloqueado pelo pré-tratamento com ondansetrona na dose de 160 nmol. Em relação à FC observamos que a ativação dos receptores do tipo 5-HT₃ na ASM pelo *m*-CPBG impede a resposta taquicárdica ao estresse, entretanto, o pré-tratamento com ondansetrona não reverte este efeito inibitório. Este dado sugere que há uma separação no controle da PAM e FC e que outros receptores, além do 5-HT₃, possam participar deste controle. Dados da literatura demonstram haver facilitação na neurotransmissão serotoninérgica durante o estresse psicológico (CHAOULOFF; BERTON; MÓRMEDE, 1999). Assim, sugerimos que a integridade dos receptores 5-HT₃ na ASM em condições de estresse permite a manutenção da pressão sanguínea em níveis adequados ao organismo favorecendo o retorno da homeostasia.

A ASM é parte integrante do sistema límbico e está envolvida na regulação cardiovascular e no balanço do fluido eletrolítico (PAULIN et al., 2009). No presente trabalho verificamos que além da função acima descrita a ASM participa do controle da pressão sanguínea e frequência cardíaca em situações de estresse. Wang, Han e Shi (2009) demonstraram que a administração do antagonista do receptor 5-HT_{1A}, antes de expor os ratos ao estresse prolongado, resulta em diminuição da liberação do CRH e da expressão de receptores para glicocorticóides (WANG; HAN; SHI, 2009). Estudos anteriores já demonstravam haver redução do número de receptores 5-HT_{1A} por ação dos glicocorticóides, no hipocampo, região envolvida na regulação do comportamento emocional e funções autonômicas (FLÜGGE, 1995). Dados anteriores do laboratório mostraram que a microinjeção do antagonista dos receptores 5-HT_{2C} nas doses de 160 e 320 nmol no terceiro ventrículo bloqueou a resposta hipertensiva induzida pelo estresse sem alteração da frequência cardíaca (FERREIRA et al., 2005). Além disso, observou-se também que a microinjeção de *m*-CPBG nas doses de 80, 160 e 320 nmol no 3° ventrículo foram capazes de inibir o efeito hipertensor induzido pelo estresse de contenção (FERREIRA et al., 2004). O que reforça o papel das vias serotoninérgicas no controle cardiovascular em situações de estresse. O presente estudo mostra que a ASM pode ser uma das áreas responsáveis pelas respostas cardiovasculares observadas neste estudo.

Os dados da literatura têm demonstrado haver aumento da atividade dos neurônios serotoninérgicos ao estresse de restrição com base no aumento da expressão de *c-fos* (PACÁK; PALKOVITS, 2001) e em nosso trabalho verificamos que a ativação dos receptores 5-HT₃ mantém os níveis de pressão e frequência cardíaca em seus níveis homeostáticos. A administração do agonista dos receptores do tipo 5-HT_{1A} reverte o déficit comportamental decorrente do estresse, e o aumento dos níveis de ácido 5—hidroxi-indolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, no septo lateral tem efeito protetor ao estresse (PETTY; KRAMER; WILSON, 1992; VERMETTEN; BREMNER, 2002). Pesquisas recentes têm ainda demonstrado haver forte associação entre polimorfismo do transportador de serotonina e a predisposição aumentada ao estresse, isso é justificado pela importância do transportador de serotonina para manter a regulação dos níveis serotoninérgicos endógenos (SCHIPPER et al., 2011; OHIRA, 2011).

Dados recentes do nosso laboratório mostraram que o bloqueio dos receptores 5-HT₃ através da microinjeção de ondansetrona nas doses de 80 e 160 nmol na ASM em animais sob condições basais causa aumento dose-dependente da pressão sanguínea (URZEDO-

RODRIGUES et al., 2011), observou-se também neste trabalho que a resposta hipertensiva decorrente do bloqueio dos receptores 5-HT₃ é dependente da integridade funcional dos receptores angiotensinérgicos do tipo AT1 resposta esta observada pelo pré-tratamento com o antagonista do tipo AT1, losartan, nas doses de 40 e 80 nmol o qual inibiu o efeito hipertensor da ondansetrona (URZEDO-RODRIGUES et al., 2011). Entretanto, a literatura tem demonstrado que a ASM apresenta também receptores colinérgicos, tanto muscarínicos quanto nicotínicos (THINSCHMIDT et al., 2005). No presente estudo verificou-se que após o pré-tratamento com o antagonista muscarínico, atropina, na dose de 5 nmol, houve bloqueio da resposta hipertensora induzida pela ondansetrona (160nmol). O que nos leva a sugerir que a resposta cardiovascular induzida pelo bloqueio dos receptores serotoninérgicos depende da modulação tanto das vias angiotensinérgicas quanto das vias colinérgicas muscarínicas. Como era esperado o bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos na ASM não causou qualquer alteração da PAM e FC. Além disso, a microinjeção de ondansetrona na ASL não causou qualquer variação significativa na PAM ou FC mostrando que os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ tem uma atuação específica sobre a ASM.

Vários estudos têm demonstrado que os receptores serotoninérgicos modulam a atividade do sistema colinérgico nos processos cognitivos, o que pode ser um dos mecanismos envolvidos nas doenças neurodegenerativas tal como, mal de Alzheimer (GIL-BEA et al., 2004; HUH et al., 2008; KUMARI; SREETAMA; MOHANAKUMAR, 2007). Dados da literatura têm demonstrado que o bloqueio dos receptores 5-HT₃ pela ondansetrona estimula a liberação de acetilcolina, sendo este efeito revertido pela ação do agonista 2-metil-5-HT (FINK; GÖTHERT, 2007). Kumari, Sreetama e Mohanakumar (2007) demonstraram que a atropina causa aumento dose-dependente nos níveis de 5-HT no núcleo dorsal da rafe, no cerebelo e nos núcleos caudado/putamem e em nosso trabalho verificamos que na ASM a atividade funcional dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ e dos receptores colinérgicos muscarínicos são importantes para o controle da PA.

Estudos bioquímicos e anatômicos têm mostrado haver interação funcional entre os sistemas colinérgicos e serotoninérgicos (GIL-BEA et al., 2004). O uso do antagonista dos receptores 5-HT₃, ondansetrona, no córtex cerebral de ratos causa aumento na liberação de acetilcolina, sendo esse efeito potencializado pelo uso dos antagonistas dos receptores GABA_A, bicuculina e flumazenil, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (GIL-BEA et al., 2004). Diversas regiões cerebrais mostram que há efeito inibitório mútuo entre os sistemas colinérgicos e serotoninérgicos. Rada, Mark e Hoebel (1993) mostraram que a liberação de

acetilcolina no estriado é inibida pela ação da serotonina, através dos receptores 5-HT₁. Da mesma forma, Maura et al. (1992) e Giovannini et al. (1998) mostraram que a liberação de acetilcolina no córtex é diminuída pela serotonina agindo sobre os receptores 5-HT₃ (SETH et al., 2002).

Contudo, apesar dos inúmeros trabalhos que buscam ratificar a interrelação dessas vias neurotransmissoras, a interação entre as vias colinérgicas e serotoninérgicas no que concerne ao controle cardiovascular ainda não é clara, o que justifica a decisão de estudar a modulação do sistema colinérgico nas alterações cardiovasculares induzidas pelo bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM. O único estudo que encontramos mostrando o efeito da 5-HT e da acetilcolina na área septal em relação ao controle cardiovascular foi do grupo de Pirola et al. (1987) na ASL onde foi possível observar que a infusão de acetilcolina na ASL causa aumento dose dependente da pressão arterial e da frequência cardíaca, sendo estas respostas dependentes da integridade do sistema serotoninérgico presente nesta área; desta forma, os dados do presente estudo sugerem que a interação entre as vias serotoninérgicas e colinérgicas na ASM é importante para o controle da PA.

O papel dos receptores colinérgicos presentes em áreas prosencefálicas, em particular a ASM, tem sido bem caracterizado em diversos estudos os quais têm demonstrado que a ativação colinérgica na ASM produz marcante efeito dipsogênico e resposta pressora (PAULIN et al., 2009). Barbosa et al. (1995) demonstraram que o pré-tratamento na ASM com atropina reduz a resposta pressora induzida pela injeção intracerebroventricular com carbacol, agonista muscarínico. Em nosso trabalho demonstramos que a administração de atropina, apenas, na ASM não tem qualquer efeito na PA semelhante ao que foi observado pelo grupo de Paulin (2009). Assim, os dados do presente estudo mostram que os receptores muscarínicos na ASM podem interagir com os receptores do tipo 5HT₃ na modulação cardiovascular, contudo, a atividade independente destas vias parece não ter influência no controle da PA.

O sistema serotoninérgico também pode atuar no comportamento de ingestão de água e de sódio, o qual foi observado através da ativação dos receptores do tipo 5-HT_{1A}, no LPBN, que induziu aumento da ingestão de sódio em animais depletados deste íon (GOBBI et al., 2001). Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que a administração do agonista dos receptores 5-HT_{2C} no 3º ventrículo nas doses de 80, 160 e 240nmol promoveu redução dose-dependente no comportamento de ingestão de sódio em animais sódio-depletados sendo essa resposta inibitória abolida pela administração do antagonista dos receptores 5-HT_{2C} SDZ SER

082 (CASTRO et al., 2003). Posteriormente, os dados do laboratório mostraram que a ativação farmacológica dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala central (CeA) com o *m*-CPBG resultou em significativa redução da ingestão de sódio em animais sódio-depletados (LUZ et al., 2007). No presente trabalho mostramos que, tanto ativação dos receptores 5-HT₃, pelo *m*-CPBG, quanto o bloqueio, pela ondansetrona, na ASM não causaram qualquer alteração no comportamento de ingestão de sódio em animais sódio-depletados. Esses dados sugerem que o papel dos receptores serotoninérgicos em relação ao apetite por sódio depende do tipo de receptor e da área em estudo.

A ingestão de sódio pode ser desencadeada em experimentos onde é oferecido ao animal solução de cloreto de sódio hipertônica em associação com solução isotônica e H₂O destilada (GODINO et al., 2007). Experimentalmente, o apetite por sódio é induzido pelo uso do diurético furosemida, que age na porção espessa da alça de Henle inibindo o co-transporte de Na⁺/K⁺/2Cl⁻ induzindo a perda de sódio através da urina (KOHLMANN et al., 2006), o que gera avidez pelo sódio em ratos sódio-depletados. Durante o período de reposição do Na⁺ diversos trabalhos têm demonstrado haver recrutamento de neurônios serotoninérgicos provenientes do núcleo dorsal da rafe (DRN) (MAGALHAES-NUNES et al., 2007) e o aumento na expressão de c-fos tem sido observado no NTS, DRN e estruturas prosencefálicas envolvidas na regulação hidroeletrólítica após depleção de sódio induzida por diálise peritoneal (LIMA et al., 2003).

Dados da literatura mostram que regiões prosencefálicas envolvidas na regulação hidrossalina que apresentam deficiência na transmissão serotoninérgica após lesão eletrolítica no DRN estão associadas com retenção de sódio e aumento na ingestão de água (BADAUÊ-PASSOS et al., 2003). Diversos estudos têm demonstrado a importância da ASM na regulação da ingestão de sódio em ratos (CAMARGO et al., 2007; SAAD et al., 2004; CAMARGO et al., 2002). Observa-se que a ASM apresenta conexões com estruturas envolvidas com a regulação hidrossalina como o PVN. Isso foi determinado após observar-se que a administração de losartan no PVN aboliu o comportamento de ingestão de sódio induzido pela administração de ANG II na ASM (CAMARGO et al., 2002). Posteriormente, este mesmo grupo demonstrou que a administração de vassopressina na ASM em animais sódio-depletados leva ao aumento na ingestão de sódio (CAMARGO et al., 2007). Apesar de alguns estudos da literatura mostrar a atuação dos receptores serotoninérgicos no comportamento de ingestão de sódio, os nossos resultados mostraram que os receptores

serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM parecem não estar envolvidos com os mecanismos centrais do apetite por sódio.

Dados da literatura têm demonstrado que a hipovolemia induzida por polietilenoglicol (PEG) causa aumento significativo dos níveis de Ach no SFO sendo esta resposta atenuada após microinjeção de lidocaína na ASM (TANAKA, 2003). Em um estudo com a estimulação elétrica da área septal, observou-se supressão prolongada da ingestão de água em animais sob condições de privação hídrica. Com base nessa resposta, os autores deste trabalho levantaram a hipótese de que a área septal poderia estar envolvida na regulação da sede (GORDON; JOHNSON, 1981). A literatura tem demonstrado que o processo de privação hídrica modifica o balanço, tanto da água, quanto de eletrólitos levando a desidratação dos compartimentos intracelular e extracelular o que poderia levar alteração do sistema serotoninérgico central (ELGOT; El HIBA; GAMRANI, 2011).

Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT₂ com injeção do agonista *m*CPP no terceiro ventrículo, reduz de forma significativa a ingestão de água em animais sob condições de privação hídrica, sendo esta resposta abolida após o tratamento com o antagonista SDZ SER 082 (CASTRO et al., 2002). Posteriormente verificou-se também que a ativação dos receptores 5-HT₃ com a injeção do agonista *m*-CPBG no terceiro ventrículo reduz a ingestão de água em animais sob privação hídrica (CASTRO et al., 2002) porém, a avaliação dos receptores do tipo 5-HT₄ no comportamento de ingestão de água não causou qualquer mudança significativa neste comportamento (CASTRO et al., 2000). Buscamos então no presente estudo, avaliar o papel dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ em uma área específica do cérebro, a ASM, para compreender a possível ação desses receptores no controle da ingestão hídrica. Verificamos que tanto a ativação quanto o bloqueio farmacológico dos receptores do tipo 5-HT₃ pela não causou qualquer alteração significativa na ingestão de água após privação. Com base nesses resultados verificamos que o comportamento de ingestão de água depende do tipo de receptor serotoninérgico envolvido e da área em estudo, sendo que, outros estudos são necessários para verificar se os demais subtipos de receptores serotoninérgicos na ASM não estão envolvidos no controle da ingestão de água.

Em síntese, os nossos resultados demonstram que a ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃ presentes na ASM impede a resposta pressora e taquicárdica características do estresse de contenção, além disso, observamos que a resposta hipertensiva decorrente do bloqueio dos receptores do tipo 5-HT₃ é dependente da atividade funcional dos

receptores colinérgicos muscarínicos presentes na ASM. Apesar de esta estrutura límbica estar envolvida na regulação cardiovascular e hidrossalina, os receptores serotoninérgicos 5-HT₃ presentes na ASM não parecem estar envolvidos no comportamento de ingestão de sódio em animais sódio-depletados e também parecem não estar envolvidos no comportamento de ingestão de água em animais sob privação hídrica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Em síntese nossos resultados nos levam a sugerir que:

- 1) A ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃, presentes na ASM, inibe a resposta pressora e taquicárdica decorrentes do estresse de contenção.
- 2) A resposta hipertensora após o bloqueio dos receptores do tipo 5-HT₃, presentes na ASM, depende da integridade funcional dos receptores colinérgicos muscarínicos presentes nesta área.
- 3) Os receptores 5-HT₃ presentes na ASM parecem não mediar o apetite por sódio em animais sódio depletados.
- 4) Os receptores 5-HT₃ presentes na ASM parecem não estar envolvidos no comportamento de ingestão de água em animais sob privação hídrica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGO, Y.; NAKAMURA, S.; BABA, A.; MATSUDA, T. Neuropsychotoxicity of abused drugs: effects of serotonin receptor ligands on methamphetamine and cocaine-induced behavioral sensitization in mice. **Journal of Pharmacological Science**, v.106, p.15-21, 2008.

ALREJA, M. Excitatory actions of serotonin on GABAergic neurons of the medial septum and diagonal band of Broca. **Synapse**, v. 22, p. 15-27, 1996.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; REIS, L.C. Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. **Experimental Physiology**, v. 92.5, p. 913-922, 2007.

BADAUÊ-PASSOS Jr, D.; VENTURA, R.R.; SILVA, L.F.S.; OLIVARES, E.L.; REIS, L.C. Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite of euthyroid and hypothyroid rats. **Experimental Physiology**, v.88.2, p. 251-260, 2003.

BALACHANDRAN, K.; HUSSAIN, S.; YAP, C-H.; PADALA, M.; CHESTER, A. H.; YOGANATHAN, A.P. Elevated cyclic stretch and serotonin result in altered aortic valve remodeling via a mechanosensitive 5-HT_{2A} receptor-dependent pathway. **Cardiovascular Pathology**, v.21, p. 206-213, 2012.

BARBOSA, S. P.; GOBBI, J. I.F. De.; ZILIOLI, L.; CAMARGO, L.A. de A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; JR. L. A. De L.; MENANI, J. W. Role cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II carbachol in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 37, p. 463-465, 1995.

BARKER, K.G.; HALLIDAY, G.M.; TORK, I. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 30, p. 147-161, 1990.

BERGER, M.; GRAY, J.A.; ROTH, B.L. The expanded biology of serotonin. **The Annual Review of Medicine**, v. 60, 9. 355- 360, 2009.

BONAGAMBA, L.G.H.; SÉVOZ-COUCHE, C.; N` DIAYE, A.; UYGUN-LOUVET, J-C.; MACHADO, B.H.; HAMON, M.; LAGUZZI, R. Bradycardic responses to microinjection of *N*-methyl-d-aspartate into the nucleus tractus solitarius are inhibited by local activation of 5-HT₃ receptors. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2336-2345, 2000.

CALARESU, F.R.; CIRIELLO, J.; MOGENSEN, G.J. Identification of pathways mediating cardiovascular responses elicited by stimulation of the septum in the rat. **Journal Physiology**, v. 260, p. 515-530, 1976.

CAMARGO, L. A.A.; SAAD, W. A.; SIMOES, S.; SANTOS, T.A.B.; SAAD, W.A. Interaction between paraventricular nucleus and septal area in the control of physiological responses induced by angiotensin II. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1017-1023, 2002.

CAMARGO, G. M. P de A.; CAMARGO, L. A. de A.; 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, p. 393-399, 2007.

CASTRO, L.; CASTRO-E-SILVA, E. De.; SOUZA, F.S.; MALDONADO, I.; MACEDO, D.F.; FERREIRA, M.G.; SANTAMARIA, G.F.; BANDEIRA, I.P.V.; AMOR, A.L.M.; CARVALHO, F.L.Q.; ROCHA, M.A.; OLIVEIRA, I.R.; FREGONEZE, J.B. Central 5-HT₄ receptors and drinking behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.66, p. 443-448, 2000.

CASTRO, L.; MALDONADO, CAMPOS, I.; VARJAO, B.; ANGELO, A.L.; ATHANAZIO, R.A.; BARBETTA, M.C.; RAMOS, A.C.; FREGONEZE, J.B.; CASTRO-E-SILVA, E. De. Central administration of mCPP, a serotonin 5-HT_{2B/2C} agonist, decreases water intake in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 891-898, 2002.

CASTRO, L; VARJÃO, B.; MALDONADO, I.; CAMPOS, I.; DUQUE, B.; FREGONEZE, J.B.; OLIVEIRA, I. R. de.; CASTRO-E-SILVA, E. De. Central 5-HT₃ receptors and water intake. **Physiology & Behavior**, v. 77, p. 349-359, 2002.

CASTRO, L. ATHANAZIO, R.; BARBETTA, M.; RAMOS, A.C.; ANGELO, A.L.; CAMPOS, I.; VARJAO, B.; FERREIRA, H. FREGONEZE, J.; CASTRO-E- SILVA, E De. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v. 981, p. 151-159, 2003.

CHAOULOFF, F.; BERTON, O.; MORMÈDE, P. Serotonin and stress. **Neuropsychopharmacology**, v.21, p. 29S- 32S, 1999.

COLOMBARI, D. S. De A.; HAIBARA, A. S.; CAMARGO, L.A. De A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; DELUCA, L.A.; MENANI, J. V. Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid, electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into subfornical organ in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 33, p. 249-254, 1994.

CÔTE, F.; FLIGNY, C.; FROMES, Y.; MALLET, J.; VODJDANI, G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. **Trends in Molecular Medicine**, v.10, p.232-238, 2004.

- DAVID- JELTSCH, H.; KOENIG, J.; CASSEL, J-C. Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: general data and focus on 5-HT_{1A} receptors of the medial septum. **Behavioural Brain Research**, v.195, p. 85-97, 2008.
- DAVIES, P.A. Allosteric modulation of the 5-HT₃ receptor. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, p. 75-80, 2011.
- DIMICCO, J. A.; SARKAR, S.; ZARETSKAIA, M.V.; ZARETSKY, D. V. Stress-induced cardiac stimulation and fever: Common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 126-127, p. 106-119, 2006.
- DIKSIC, M.; YOUNG, S. N. Study of the brain serotonergic system with labeled □□methyl-L-tryptophan. **Journal of Neurochemistry**, v.78, p. 1185-1200, 2001.
- DUCY, P.; KARSENTY, G. The two faces of serotonin in bone biology. **Journal of Cell Biology**, v. 191, p. 7-13, 2010.
- ELGOT, A.; EL HIBA, O.; GAMRANI, H. The angiogenic-like effects of dehydration in a semi-desert rodent *Meriones shawi* indicating the possible involvement of the serotonergic system. **Acta Histochemica**, v.26, p.561-566, 1987.
- ENGLEMAN, E.A.; RODD, Z.A.; BELL, R.L.; MURPHY, J.M. The role of 5-HT₃ receptors in drug abuse and as a target for pharmacotherapy. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, v. 7, p. 454-467, 2008.
- FERREIRA, H. S.; CASTRO-E-SILVA, E De.; COINTEIRO, C.; OLIVEIRA, E.; FAUSTINO, T.N.; FREGONEZE, J.B. Role of central 5-HT₃ receptors in the control of blood pressure in stressed and non-stressed rats. **Brain Research**, v. 1028, p. 48-58, 2004.
- FERREIRA, H.S.; OLIVEIRA, E.; FAUSTINO, T. N.; CASTRO-E-SILVA, E De.; FREGONEZE, J.B. Effect of the activation of central 5-HT_{2C} receptors by the 5-HT_{2C} agonist mCPP on blood pressure and heart rate in rats. **Brain Research**, v. 1040, p. 64-72, 2005.
- FILIP, M.; BADER, M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v.61, p.761-777, 2009.
- FINK, K. B.; GÖTHER, M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. **Pharmacological reviews**, v.59, p. 360-417, 2007.
- FLUGGE, G. Dynamics of central nervous 5-HT_{1A} receptors under psychosocial stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 7132-7140, 1995.
- FRANCHINI, L. F.; JOHNSON, A.K.; OLMOS DE J.; VIVAS, L. Sodium appetite and FOS activation in serotonergic neurons. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, p. 235-243, 2002.

GARDNER, K.L.; HALE, M. W.; LIGHTMAN, S.L.; PLOTSKY, P.M.; LOWRY, C.A. Adverse early life experience and social stress during adulthood interact to increase serotonin transporter mRNA expression. **Brain Research**, v. 1305, p. 47-63, 2009.

GERHARDT, C. C.; HEERIKHUIZEN, H. van. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.344, p.1-23, 1997.

GIL-BEA, F. J.; DOMINGUEZ, J.; GARCIA-ALOZZA, M.; MARCOS, B.; LASHERAS, B.; RAMIREZ, M. Facilitation of cholinergic transmission by combined treatment of ondansetron with flumazenil after cortical cholinergic deafferentation. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 225-232, 2004.

GIOVANNINI, M. G.; CECCARELLI, I.; MOLINARI, B.; CECCHI, M.; GOLDFARB, J. BLANDINA, P. Serotonergic modulation of acetylcholine release from cortex of freely moving rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 285, p. 1219-1225, 1998.

GOBBI, de J. I. F.; DE LUCA, L.A. Jr.; JHONSON, A.K.; MENANI, J.V. Interaction of serotonin and cholecystinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, p. R1301-R1307, 2001.

GODINO, A.; De LUCA, L.A., Jr.; RODRIGUES, A.; VIVAS, L. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. 1027-1036, 2007.

GORDON, F.J.; JOHNSON, A. K. Electrical stimulation of the septal area in the rat: prolonged suppression of water intake and correlation with self-stimulation. **Brain Research**, v. 206, p. 421-430, 1981.

HAGHDOOST-YAZD, J.H.; PASBAKHS, P.; VATANPARAST, J. RAJAEI, F.; BEHZADI, G. Topographical and quantitative distribution of the projecting neurons to main divisions of the septal area. **Neurological Research**, v. 31, p. 503-513, 2009.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 195, p. 198-213, 2008.

HELLEWEG, R.; THOMAS, H.; AMSWALD, A.; RICHTHOFEN, S von; KAY, S.; FINK, H.; MORGENSTERN, R.; HORTNAGL, H. H. Serotonergic lesion of median raphe nucleus alters nerve growth factor content and vulnerability of cholinergic septohippocampal neurons in rat. **Brain Research**, v. 907, p. 100-108, 2001.

HUH, C. Y.L.; DANIK, M.; MANSEAU, F.; TRUDEAU, L-E.; WILLIAMS, S. Chronic exposure to nerve growth factor increases acetylcholine and glutamate release from cholinergic neurons of the rat medial septum and diagonal band of Broca via mechanisms mediated by p^{75NTR}. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1404-1409, 2008.

JACOBS, B.L.; AZMITIA, E.F. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 165-229, 1992.

JOHNSON, B.A.; ROACHE, J. D.; JAVORS, M.A.; DICLEMENTE, C.C.; CLONINGER, C.R.; PRIHODA, T.J.; BORDINCK, P.S.; AIT-DAOUD, N.; HENSLER, J. Ondansetron for reduction of drinking among biologically predisposed alcoholic patients. **The Journal of The American Medical Association**, v.284, p. 23-30, 2000.

JONNAKUTY, C.; GRAGNOLI, C. What do we know about serotonin? **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, p. 301-306, 2008.

JOVANOVIC, H.; PERSKI, A.; BERGLUND, H.; SAVIC, I. Chronic stress is linked to 5-HT_{1A} receptor changes and functional disintegration of the limbic networks. **NeuroImage**, v. 55, p. 1178-1188, 2011.

Jr. LUNDY, R. F.; BLAIR, M.; HORVATH, N.; NORGREN, R. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. **Physiology & Behavior**, v.78, p. 449-458, 2003.

KOHLMANN, O. Jr.; TOFOLLETO, O.; TAVARES, A.; ZANELLA, M.T.; FILHO, J. M.; RIBEIRO, A.B. Estudo dos efeitos diurético, natriurético e sobre a calemia e caliurese da combinação fixa de furosemida e amilorida em voluntários sadios. **Revista Brasileira de Medicina**, v.63, p. 79-88, 2006.

KUBO, T.; HAGIWARA, Y.; ENDO, S.; FUKUMORI, R. Activation of hypothalamic angiotensin receptors pressor responses via cholinergic inputs to the rostral ventrolateral medula in normotensive and hypertensive rats. **Brain Research**, v. 953, p. 232-245, 2002.

KUMARI, A.; SREETAMA, S. MOHANAKUMAR, K. P. Atropine, a muscarinic cholinergic receptor antagonist increases serotonin, but not dopamine levels in discrete brain regions of . **Neuroscience Letters**, v. 423, p. 100-103, 2007.

KUNH, D. M.; WOLF, W. A.; LOVENBERG, W. Review of the role of the central serotonergic neuronal system in blood pressure regulation. **Hypertension**, v. 2, p. 243-255, 1980.

LAURACHE, M.; MULAK, A.; TACHÉ, Y. Stress and visceral pain: From animals models to clinical therapies. **Experimental Neurology**, v. 233, p.49-67, 2011.

LIMA, H. R.C.; CAVALCANTE-LIMA, H.R.; CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; COSTA-E-SOUZA, R.H.; OLIVARES, E.L.; BADAUE-PASSOS, D. Jr.; MEDEIROS, M. A.; CORTEZ, W. S.; REIS, L.C. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 76, p. 85-92, 2003.

LIMA, H. R.C.; CAVALCANTE-LIMA, H.R.; CEDRAZ-MERCES, P.L.; COSTA-E-SOUZA, R.H.; OLIVARES, E.L.; BADAUE-PASSOS, D. Jr.; MEDEIROS, M.A.; CÔRTEZ, W. S.; REIS, L.C. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by

depletion or beta-adrenergic stimulation. **Annals of the Brazilian Academy of Science**, v. 76, p. 85-92, 2004.

LÓPEZ, J.F.; LIBERZON, I.; VÁZQUEZ, D.M.; YOUNG, E.A.; WATSON, S.J. Serotonin 1A receptor messenger RNA regulation in the hippocampus after acute stress. **Biological Psychiatry**, v. 45, p. 934-937, 1999.

LUZ, C.; SOUZA, A.; REIS, R.; FREGONEZE, J. B. CASTRO e SILVA, E. Role of 5HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v.1099, p. 121-132, 2006.

LUZ, C.; SOUZA, A.; REIS, R.; MINEIRO, P.; FERREIRA, H.S.; FREGONEZE, J.B.; CASTRO e SILVA, E. 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, 2007.

MACHU, T, K. Therapeutics of 5-HT₃ receptor antagonist: currents uses and future directions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, p.338- 347, 2011.

MASSON, J.; EMERIT, M.B.; HAMON, M.; DARMON, M. Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, 2012, doi: 10. 1002/wmts.50.

MAURA, G.; ANDRIOLI, G.C.; CAVAZZANI, P.; RAITERI, M. 5- Hydroxytryptamine 3 receptors sited on cholinergic axon terminals of human cerebral córtex mediate inhibition of acetylcholine release. **Journal Neurochemical**, v. 28, p. 2334-2337, 1992.

MCCALL, R. B.; CLEMENT, M.E. Role of serotonin_{1A} and serotonin₂ receptors in the central regulation of the cardiovascular system. **Pharmacological Reviews**, v. 46, p. 231-243, 1994.

MOCHIZUKI, S.; WATANABE, T.; MIYAKE, A.; SAITO, M.; FURUICHI, K.; Cloning, expression, and characterization of ferret 5-HT₃ receptor subunit. **European Journal of Pharmacology**, v. 399, p. 97-106, 2000.

MONTI, J.M. Serotonin control of sleep-wake behavior. **Sleep Medicine Reviews**, v. 15, p. 269-281, 2010.

MORRIS, M. J.; NA, E.S.; JOHNSON, A.K. Salt craving: The psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiology Behavioral**. v. 94, p. 709-721, 2008.

NAKAGAWA, Y.; ISHIMA, T.; TAKASHIMA, T. The 5-HT receptor agonist attenuates the action of antidepressants in the forced swim test in rats. **Brain Research**, v. 786, p. 189-193, 1998.

NALIVAICO, E.; SGOIFO, A. Central 5-HT receptors in cardiovascular control during stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 95-106, 2009.

NI, W.; WATTS, S.W. 5- hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33, p. 575-583, 2006.

NIETZER, S.L.; BONN, M.; JANSEN, F.; HEIMING, R.S.; LEWEJOHANN, L.; SACHESER, N.; ASAN, E.S.; LESCH, K.P.; SHMITT, A.G. Serotonin transporter knockout and repeated social defeat stress: Impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brains areas. **Behavioral Brain Research**, v.220, p. 42-54, 2011.

NUNES-MAGALHAES, A.P. de.; BADUÊ-PASSOS, D. Jr.; VENTURA, R. R.; GUEDES, D. da S.; ARAUJO, J. P.; GRANADEIRO, P. C.; MILANEZ-BARBOSA, H. K.; COSTA-E-SOUZA, R. H. da.; MEDEIROS, M.A. de; OHIRA, H. Modulation os stress reactivity in brain and body by serotonin transporter promoter polymorphism. **Japanese Psychological Research**, v. 53, p. 193-210, 2011.

OHIRA, H. Modulation of stress reactivity in brain and body by serotonin transporter promoter polymorphism. **Japanese Psychological Association**, v. 53, p. 193-210, 2011.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M.; Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 502-548, 2001.

PAULIN, R.F.; MENANI, J.V.; COLOMBARI, E.; De PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S. A. Role of the medial septal área on pilocarpine-induced salivar secretion and water intake. **Brain Research**, v. 1298, p. 145-152, 2009.

PAXINOS, G. WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, 3° ed. 1997.

PETTY, F.; KRAMER, G.; WILSON, L. Prevention of learned helplessness: in vivo correlation with cortical serotonin. **Pharmacology Biochemical Behavioral**. v. 43, p. 361-370, 1992.

PIROLA, C.J.; SCHEUCHER, A.; BALDA, M.S.; DABSYS, S.M.; FINKIELMAN, S.; NAHMOD, V.E. Serotonin mediates cardiovascular responses to acetylcholine, bradykinin, angiotensin II and norepinephrine in the lateral septal area of the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 561-566, 1987.

PYTLLIAK, M.; VARGOVA, V.; MECHIROVÁ, V.; FELSOCI, M. Serotonin receptors – from molecular biology to clinical applications. **Physiology Research**, v. 60, p.15-25, 201.

RADA, P. V.; MARK, G. P.; HOEBEL, B.G. In vivo modulation of acetylcholine in the nucleus accumbens of freely moving rats: I. Inhibition by serotonin. **Brain Research**, v. 619, p. 98-104, 1993.

RAMAGE, A. G. Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 56, p. 425-439, 2001.

RAMAGE, A. G.; VILLALÓN, C.M. 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.29, p. 472-481, 2008.

RAMMES G.; HOSP, C.; EISENSAMER, B.; TANASIC, S.; NOTHDURFTER, C. Identification of a domain which affects kinetics and antagonist potency of clozapine at 5-HT₃ receptors. **Plos One**, v.4, p. e6715, 2009.

REIS, L.C.; RAMALHO, M.J.; FAVARETTO, A. L.V.; GUTKOWSKA, J.; McCANN, S. M. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 12022-12026, 1994.

RISOLD, P.Y.; SWANSON, L.W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Research Reviews**, v. 24, p. 115-195, 1997.

RODRIGUEZ-NARANJO,M.I.; GIL-IZQUIERDO, A.; TRONCOSO, A.M.; CANTOS-VILLAR, E.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. **Food chemistry**, v. 126, p. 1608-1613, 2011.

RUSCH, D.; MUSSER, B.; WULF, H.; SCHUSTER, A.; RAINES, D.E. Subunit-dependent modulation of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor open-close equilibrium by n-alcohols. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, p. 1069-1074, 2007.

SAAD, W. A.; CAMARGO, L.A. de A.; GUARDA, I. F. M.S.; SANTOS, T. A. F. B. dos.; GUARDA, R. S.; SAAD, W. A.; SIMOES, S.; RODRIGUES, J. A. Interaction between supraoptic nucleus and septal area in the control of water, sodium intake and arterial blood pressure induced by injection of angiotensin II. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 667-674, 2004.

SCHIPPER, P.; NONKES, L. J. P.; KAREL, P.; KILIAAN, A. J.; HOMBERG, J. R. Serotonin transporter genotype X construction stress interaction in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 223, p. 169-175, 2011.

SETH, P.; CHEETA, S.; TUCCI, S.; FILE, S.E. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 795-805, 2002.

SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W. Molecular, cellular and medical aspects. **Serotonin. Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**, 6^o ed, 1999.

SINGEWALD, N.; SALCHNER, P.; SHARP, T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. **Society of Biological Psychiatry**, v. 53, p. 275-283, 2003.

SRIVIDYA, R.; MALLICK, H. N.; KUMAR, V. M. The medial septum acts through the medial preoptic area for thermoregulation and works with it for sleep regulation. **Indian Journal Physiology Pharmacol**, v. 51, p. 261-273, 2007.

SZABÓ, A.; BUTZ, B.L.; ALPER, R. H. Further characterization of forebrain serotonin receptors mediating tachycardia in conscious rats. **Brain Research Bulletin**, vol. 45, p. 583-588, 1998.

TANAKA, J. Activation of cholinergic pathways from the septum to the subfornical organ area under hypovolemic condition in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 497-504, 2003.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Trace elements in human physiology and pathology- Copper. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 386-398, 2003.

THINSCHIMIDT, J. S.; FRAZIER, C. J.; KING, M.A. MEYER, E.M.; PAPKE, R.L. Medial septal/diagonal band cells express multiple functional nicotinic receptor subtypes that are correlated with firing frequency. **Neuroscience Letters**, v. 389, p. 163-168, 2005.

THOMPSON, A.J.; CHAU, P.L.; CHAN, S.L; LUMMIS, S.C.R. Unbinding pathways of an agonist and an antagonist from the 5-HT₃ receptor. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 1979-1991, 2006.

VERMETTEN, E.; BREMNER, D. Circuits and systems in stress. I preclinical studies. **Depression and anxiety**, v. 15, p. 126-147, 2002.

VILLALÓN, C. M.; CENTURION, D.; LUJAN-ESTRADA, M.; TERRON, J.A.; SANCHEZ-LOPEZ, A. Mediation of 5-HT- induced external carotid vasodilatation in GR 127935- pretreated vagosympathectomized dogs by the putative 5-HT₇ receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, p. 1319-1327, 1997.

VILLELA, D. C.; da SILVA JR. L.G.; FONTES, M. A. P. Activation of 5-HT receptors in the periaqueductal gray attenuates the tachycardia evoked from dorsomedial hypothalamus. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 148, p. 36-43, 2009.

UPHOUSE, L. Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.21, p. 679-698, 1997.

URZEDO-RODRIGUES, L.; FERREIRA, H. S.; ALMEIDA, D.O. MEDEIROS, J.P.; BATISTA, A.; CASTRO e SILVA, E. FREGONEZE, J. Blockade of 5-HT₃ receptors at septal área increase blood pressure in unanaesthetized rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.159, p. 51-61, 2011.

WANG, H-T.; HAN, F.; SHI, Y-X. Activity of the 5-HT_{1A} receptors is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 24, p. 227-231, 2009.

WALSTAB, J.; RAPPOLD, G.; NIESLER, B. 5-HT₃ receptors: role in disease and target of drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, p. 146-169, 2010.

WALEBUS, M.; GALVEZ, J.P.; VALENTINO, R.J.; BOCKSTAELE, E.J.V. Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 31, p. 233-242, 2006.

YAZD-HAGHDOOST, J. H.; PASBAKHS, P.; VATANPARAST, J.; RAJAEI, F.; BEHZADI, G. Topographical and quantitative distribution of the projecting neurons. **Neurological Research**, v. 31, p.503-513, 2009.

YOO, J-H.; CHO, J-H.; YU, H-S.; LEE, K-W.; LEE, B-H.; JEONG, S, M.; NAH, S-Y.; KIM, H-C.; LEE, S-Y.; JANG, C-G. Involvement of 5-HT₃ receptors in the development and expression of methamphetamine-induced behavioral sensitization: 5-HT_{3A} receptor channel and binding study. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, p. 976-988, 2006.