

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

“Participação de mecanismos serotoninérgicos do núcleo parabraquial lateral na modulação das respostas neuroendócrinas e renais envolvidas no controle da homeostase dos líquidos corporais”.

Lisandra Oliveira Margatho

Orientador: Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues

Ribeirão Preto – SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agradecimentos

DEDICO ESTA TESE À MEMÓRIA DO MEU PAI **PEDRO**

CÁSSIA E RAFAEL

AOS FAMILIARES

MAUD, CLEIDE, PITI, FÁBIO, DONA ANA, TIO JOÃO

OBRIGADA PELO APOIO E AMOR CONSTANTES.

Agradeço ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, pela orientação, confiança, apoio e dedicação a este trabalho.

Meus agradecimentos especiais à Lucila Elias e Laura Vivas, pela amizade, orientação, apoio e dedicação na participação deste trabalho.

Meus agradecimentos aos professores da banca: Prof. Vanderlei Menani, Prof. Luís Carlos Reis, Profa. Laura Vivas, Prof. Benedito H. Machado e ao Prof. Norberto Cairasco (banca qualificação).

Meus agradecimentos aos professores suplentes: Profa. Adelina Reis, Profa. Maria José Rocha, Prof. João Callera e Prof. Celso Franci.

Meus agradecimentos à Andrea Godino e Alex Giusti pela amizade e boa vontade em participar deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório, e em especial aos funcionários: Elisa, Cláudia, Fernando, Carlos, Roger, Rubinho, Lô, Dú e Eduardo. Particularmente agradeço à Val e Marina pela ajuda nos experimentos e radioimunoensaios.

Aos meus amigos: Jana, Carla, Siang e Domingos, Theresa, Simone (pelas Fotos!), Silvia, Wagner, Rodrigo, Eduardo, Maurício, Ernane, Dani, Rosana, Cléo, Tiks, Telma, Evelin, Josi, Fernanda, Cláudia, Lys, Dayane, Ana, Zima, Vivi, Nat, Buquim, Fabinho, Adri, Nádia, Mirian, Álvaro, Jussara e demais pessoas do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade de São Paulo, obrigada pelo apoio e atenção.

Minha gratidão a todos os professores e amigos(as) e familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP, FAEPA, CAPES e CNPq, sem os quais, muito não seria concretizado. Especialmente à FAPESP pela concessão da bolsa.

INDICE

ÍNDICE DE ABRAVIATURAS E SÍMBOLOS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
- Animais.....	26
- Habituação dos animais aos procedimentos experimentais.....	26
- Cânulas no NPBL.....	26
- Injeções de fármacos no cérebro.....	27
- Análise histológica.....	27
- Cânula na veia da jugular.....	27
- Expansão do volume do líquido extracelular (EVEC).....	28
- Análise urinária.....	28
- Coleta de sangue.....	28
- Dosagens dos peptídeos: peptídeo natriurético atrial, ocitocina e vasopressina.....	29
- Procedimento imunohistoquímico.....	30
- Injeção de Fluorogold no NPBL.....	32
- Fármacos utilizados.....	33
- Análise estatística.....	34
PROCOLOS EXPERIMENTAIS.....	35
RESULTADOS	39

- Localização histológica das cânulas no NPBL.....	39
- Efeitos de microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a excreção cumulativa de Na ⁺ , K ⁺ , volume e osmolalidade urinária em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC.....	40
- Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a concentração plasmática de ANP, AVP e OT em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC.....	45
- Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida ou do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a ativação neuronal avaliada pela expressão da proteína c-Fos em neurônios serotoninérgicos (ir-c-Fos-5HT) do núcleo dorsal da rafe e catecolaminérgicos (ir-c-Fos-TH) do núcleo do trato solitário em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15M).....	47
- Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida ou do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a ativação neuronal avaliada pela expressão da proteína c-Fos em neurônios ocitocinérgicos (ir-c-Fos-OT) e vasopressinérgicos (ir-c-Fos-AVP) do NSO e NPV do hipotálamo em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15M).....	52
- Identificação dos grupos neuronais do sistema nervoso central imunorreativos à proteína c-Fos em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15 M) e que se conectam diretamente com o NPBL.....	64
DISCUSSÃO.....	77
SUMÁRIO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICE.....	105

INDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC- núcleo acessório comissural anterior

ACe – amígdala central

ANG I – angiotensina I

ANG II – angiotensina II

ANP - peptídeo natriurético atrial

AP – área postrema

AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo

AVP – vasopressina ou hormônio anti-diurético (ADH)

BST – núcleo da estria terminal

CAP - captopril

DBB – banda diagonal de Broca

DOI - 2,5 dimetoxi-4-iodoanfetamina-hidrobromide (agonista serotoninérgico)

ECA – enzima conversora de angiotensina

EVEC – expansão de volume do líquido extracelular

FURO – furosemida (diurético)

g - gramas

h – hora (s)

ICV – intracerebroventricular

Ip - intraperitoneal

kg – quilograma

LC – locus coeruleus

M - molar

Meti- metisergida (antagonista serotoninérgico)

mg – miligrama(s)

ml - mililitro(s)

min – minutos

MnPO – núcleo preóptico medial

NaCl – cloreto de sódio

NDR – núcleo dorsal da rafe

NPBL – núcleo parabraquial lateral

NPV – núcleo paraventricular

NSO – núcleo supraóptico

NTS – núcleo do trato solitário
OCVs – órgãos circumventriculares
OSF – órgão subfornical
OT - ocitocina
OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal
PaDC – subdivisão capsular dorsal do núcleo paraventricular
PaLM – subdivisão magnocelular lateral do núcleo paraventricular
PaMM - subdivisão magnocelular medial do núcleo paraventricular
PaMP - subdivisão parvocelular medial do núcleo paraventricular
PaV - subdivisão parvocelular ventral do núcleo paraventricular
PeM - subdivisão magnocelular periventricular do núcleo paraventricular
PZ – zona parinuclear do núcleo supraóptico
PCA- para-cloroanfetamina
PCPA – para-clorofenilalanina
sal - salina
sc – subcutâneo
SNC – sistema nervoso central
VL – ventrículo lateral
 α - alfa
 β - beta
 μg – micrograma(s)
 μl – microlitro(s)
 μm – micrometro(s)
5HT – serotonina
 \pm - mais ou menos
< - menor
> - maior
% - por cento

RESUMO

Neste estudo investigamos os efeitos de microinjeções bilaterais do agonista serotoninérgico 5HT_{2a}/HT_{2c} DOI (hidroclorato de dimetoxi-4-iodoanfetamina) ou antagonista serotoninérgico metisergida no núcleo parabraquial lateral (NPBL), sobre a excreção cumulativa de sódio, potássio, volume, osmolalidade urinária em resposta à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) em ratos.

Sete dias antes dos experimentos, cânulas de aço inoxidável foram colocadas bilateralmente no NPBL. Os resultados obtidos indicaram que os ratos pré-tratados com metisergida (2,0 ou 8,2 nmol) no NPBL, apresentaram, em resposta à EVEC (NaCl 0,15M, 2ml/ 100g peso corporal), uma atenuação do aumento na excreção de sódio, potássio e volume urinário, normalmente observada em resposta à EVEC nos primeiros 20 min do início da coleta de urina. Os ratos pré-tratados com DOI (2,8 ou 14,0 nmol) no NPBL, apresentaram, em resposta à EVEC, um incremento na excreção de sódio, potássio e volume urinário nos primeiros 20 min da coleta de urina.

Esses resultados sugerem que a metisergida reduz o aumento na excreção de água e eletrólitos em resposta à EVEC, no entanto, estes resultados também apresentam uma informação adicional sobre o papel dos mecanismos serotoninérgicos do NPBL no controle da homeostase dos líquidos corporais, como mostrado previamente pela facilitação da ingestão de sódio após o bloqueio dos mecanismos serotoninérgicos do NPBL (Menani e cols, 1996; 1998).

Paralelamente, foram conduzidos experimentos com o objetivo de se avaliar a participação do NPBL na mediação das alterações da concentração plasmática do peptídeo natriurético atrial (ANP), vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), normalmente observados em resposta à EVEC. Os resultados obtidos a partir da dosagem de OT e ANP plasmáticos sugeriram que em animais que receberam injeções de metisergida (8,2 nmol) no NPBL houve uma atenuação na concentração plasmática de OT e ANP, normalmente observada em resposta à EVEC e um aumento da concentração plasmática da AVP, em comparação aos valores obtidos nos animais controles. DOI (14,0 nmol) no NPBL induziu um incremento na concentração plasmática de OT e ANP e a concentração plasmática de AVP não foi modificada em resposta à EVEC, em comparação aos valores obtidos nos animais controles.

Em adição, avaliamos a imunorreatividade a proteína c-Fos e a marcação

citoplasmática para a ocitocina, vasopressina, serotonina (5HT) e tirosina hidroxilase (TH) em diferentes regiões do sistema nervoso central. Os resultados demonstraram a participação de grupos celulares específicos (vasopressinérgicos-ocitocinérgicos) do núcleo paraventricular (NPV) e supraóptico (NSO), grupos celulares serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe (NDR) e catecolaminérgicos do núcleo do trato solitário (NTS) em resposta ao mesmo paradigma experimental descrito anteriormente. Os ratos que receberam injeções de DOI (14,0 nmol) no NPBL e submetidos à EVEC, apresentaram aumento significativo no número de neurônios imunorreativos (ir) à proteína c-Fos-OT na subdivisão medial magnocelular do NPV (PaMM) e no núcleo acessório comissural anterior (AC) em comparação aos ratos controles. Os resultados também mostraram aumento no número de neurônios ir-c-Fos-AVP em ratos que receberam injeções de metisergida (8,2 nmol) no NPBL na subdivisão lateral magnocelular do NPV (PaLM) e no NSO em comparação aos ratos controles em resposta à EVEC. Além disso, os ratos que receberam injeções de DOI no NPBL e submetidos à EVEC, apresentaram redução no número de neurônios ir-c-Fos-5HT no NDR em comparação aos animais tratados com veículo. Os ratos que receberam injeções de metisergida, apresentaram, em resposta à EVEC, aumento significativo no número de neurônios ir-c-Fos-TH no NTS, em comparação ao veículo.

Nesse estudo identificamos também os grupos neuronais que apresentaram aumento na imunorreatividade à proteína c-Fos em resposta ao estímulo agudo da EVEC isotônica e que se projetam diretamente ao NPBL, utilizando para isso o marcador retrógrado de vias, Fluorogold (FG). As áreas prosencefálicas que foram ativadas em resposta à EVEC e projetaram-se para o NPBL foram: amígdala central (ACe), PVN e o núcleo da estria terminal (BST) em comparação aos seus respectivos controles. As estruturas do tronco cerebral ir-c-Fos-FG em resposta à EVEC foram: NTS, NDR e locus coeruleus (LC). Nossos resultados também mostraram o padrão de imunorreatividade tripla no NDR: proteína c-Fos-FG-5HT. Os resultados obtidos mostraram que os neurônios serotoninérgicos do NDR são ativados pela EVEC e conectam-se diretamente ao NPBL. Concluindo, os presentes resultados sugerem que o sistema serotoninérgico presente no NPBL constitui um dos responsáveis pela regulação neuroendócrina do volume dos líquidos orgânicos modulando a excreção de água e eletrólitos, bem como a liberação de AVP, OT e ANP em resposta à EVEC isotônica.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of bilateral injections of serotonergic 5HT_{2a}/HT_{2c} receptor agonist (DOI, 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrobromide) and the serotonergic receptor antagonist methysergide into the lateral parabrachial nucleus (LPBN) on sodium/potassium excretion and urinary volume in response to acute blood volume expansion (BVE) in rats.

Seven days before the experiments a stainless steel cannula was placed bilaterally into the LPBN. Bilateral injections of methysergide (2.0 or 8.2 nmol/0,2 µl) into the LPBN in rats submitted to isotonic BVE (0.15 M NaCl, 2ml/ 100g body weight) reduced the increase in sodium/potassium excretion and urinary volume at 20 min normally observed in response to BVE, when compared to control rats. On the other hand, previous injection of DOI (2.8 or 14.0 nmol/0,2 µl) into the LPBN enhance the increase normally observed in sodium/potassium excretion and urinary volume at 20 min compared to control rats.

It was observed that methysergide into the LPBN decreases sodium excretion following BVE, therefore, these data give an additional support to the role of serotonergic mechanism in the LPBN in the control of body fluid homeostasis, as shown previously by facilitation of sodium intake after the blockade of the serotonergic mechanism in the LPBN (Menani et al, 1996; 1998).

It was also examined the changes in oxytocin (OT), atrial natriuretic peptide (ANP) and vasopressin (AVP) plasma levels after BVE in rats pre-treated with methysergide (8.2 nmol) or DOI (14.0 nmol) injections into the LPBN. The pre-treatment with methysergide reduced the normally BVE-induced increase in ANP and OT plasma levels, with an increase in AVP plasma levels. The pre-treatment with DOI into the LPBN potentiate the normally BVE-induced increase in ANP and OT plasma levels, with no changes in AVP plasma levels. These results suggest that LPBN serotonergic mechanisms modulate central pathways implicated in the control of AVP, OT and ANP release in response to BVE. In addition, we analyzed Fos immunoreactivity and the double immunohistochemical labeling for oxytocin, vasopressin, serotonin (5HT) and tyrosine hydroxylase (TH) in response to acute BVE, in different nervous system regions. The results demonstrated the participation of

specific paraventricular (NPV) and supraoptic (SON) nuclei groups of cells (oxytocinergic-vasopressinergic), serotonergic dorsal raphé nucleus (DRN) and catecholaminergic nucleus of the solitary tract (NTS) cells in the experimental protocol described above. BVE performed in rats previously submitted to injections of DOI into the LPBN produced a significant increase in the c-Fos-OT double-immunoreactivity in medial magnocellular subdivision of the PVN and accessory nuclei (AC) when compared to control group. Previous injection of methysergide into the LPBN induced a significant increase in the c-Fos-AVP double-immunoreactivity in the lateral magnocellular subdivision of the PVN and SON. DOI into the LPBN followed by BVE induced a significant decrease in the c-Fos-5HT double-immunoreactivity in the DRN compared to control rats. The injection of methysergide into the LPBN followed by BVE induced a significant increase in the c-Fos-TH double-immunoreactivity in the NTS compared to control rats.

Using the Fluorogold retrograde tracer, we also identified the pattern of c-Fos-labeling neurons activated by BVE, which project to the LPBN. The forebrain areas activated by BVE that project to the LPBN showed a significant increase in the c-Fos immunoreactivity in the central amygdala (ACe), PVN and bed nucleus of the stria terminalis (BST), compared to control rats. The hindbrain areas activated by BVE that project to the LPBN showed a significant increase in c-Fos-labeling neurons in the NTS, DRN and locus coeruleus (LC). In addition, we observed that the serotonergic DRN neurons are activated by BVE and they project to the LPBN.

In conclusion, the present data confirm the participation of serotonergic pathways in the LPBN in the neural regulation of hydromineral homeostasis modulating water and electrolyte excretion, as well the release of hormones (AVP, OT and ANP) in response to isotonic BVE.

INTRODUÇÃO

Regulação neuroendócrina do equilíbrio hidroeletrólítico

Para o perfeito funcionamento das células é essencial que a osmolalidade dos líquidos orgânicos seja controlada dentro de estreitos limites de variação. Não apenas a manutenção da osmolalidade, mas também a existência de um volume adequado de líquidos no organismo é importante para esta regulação homeostática, pois só assim pode ser mantida uma pressão sanguínea e uma pressão efetiva de perfusão em nível adequado para a perfeita irrigação dos tecidos.

A manutenção do volume e osmolalidade dos líquidos depende dos mecanismos de controle da ingestão de água e eletrólitos associados aos mecanismos renais de excreção. Essa inter-relação entre ingestão e excreção de água e eletrólitos, osmolalidade, volemia e respostas cardiovasculares, faz com que muitos mecanismos comuns participem da regulação cardiovascular e do controle do equilíbrio hidroeletrólítico (Johnson e Edwards, 1990; Thunhorst e Johnson, 1993; Thunhorst e Johnson, 1994_A; Thunhorst e cols, 1994_B; Johnson e Thunhorst, 1995;).

As variações de volume do compartimento extracelular constituem um dos sinais que permitem que a excreção urinária de sódio varie apropriadamente de acordo com as flutuações de sua ingestão. As áreas do sistema nervoso central (SNC) envolvidas especificamente no controle dos mecanismos de saciedade, regulação da osmolalidade plasmática, ingestão/excreção de água e eletrólitos recebem estímulos provenientes dos compartimentos líquidos intra e extracelular. Esses estímulos ativam dois tipos de receptores: osmorreceptores- Na^+ receptores (sensíveis a variações na osmolalidade ou $[\text{Na}^+]$ plasmática) e receptores de volume e/ou pressão. A ativação de receptores cardiopulmonares (localizados nos átrios, pulmões, grandes veias e ventrículos) induzida pela expansão de volume do líquido extracelular (EVEC) sinaliza diversos ajustes vegetativos em resposta às variações de volume do compartimento extracelular que operam sinergicamente modulando a excreção renal de água e sódio. Essas informações são conduzidas a áreas específicas do SNC responsáveis pela integração das informações e geração de respostas que dependem da integridade da região anteroventral do terceiro ventrículo, (AV3V) que compreende o órgão vascular da lâmina terminal (OVLТ) e a parte ventral do núcleo préóptico mediano (MnPO). Em

adição, o núcleo paraventricular (NPV) e supraóptico (NSO) do hipotálamo; locus coeruleus (LC); núcleo dorsal da rafe (NDR) e o núcleo parabraquial lateral (NPBL), entre outros, representam importantes estruturas envolvidas no balanço hidromineral (Antunes-Rodrigues e cols, 2004). Essas áreas cerebrais responsáveis por receber, integrar informações e gerar respostas frente às variações de volume do compartimento extracelular incluem: vasodilatação renal (Kahl e cols, 1974, Mason e Ledson, 1974; Lloyd Jr. e Friedman, 1977; Thames e Abboud, 1979; Karim e cols, 1989; Lovick e cols, 1993), redução na atividade simpática do nervo renal (DiBona e Sawin, 1985; Morita e Vatner, 1985; Higuchi e cols, 1988; Haselton e cols, 1994), inibição da secreção de renina e vasopressina (Brennan Jr. e cols, 1971); secreção do peptídeo natriurético atrial (ANP) que induz natriurese e diurese (Schultz e cols, 1982; Petersson e cols, 1986; Lang e cols, 1987; Kaufman, 1990), redução da frequência cardíaca (FC) e uma pequena redução na resistência periférica total durante a expansão de volume (Ricksten e cols, 1979; Anderson e cols, 1986; Petterson e cols, 1988). Os resultados de Godino e cols, (2005), demonstraram que em resposta à EVEC ocorre uma rápida redução na FC e na pressão arterial (PA) que poderia ser mediada por uma rápida e pronunciada liberação de OT e ANP. Ambos hormônios tem sido implicados no controle barorreflexo da FC, aumentando a atividade eferente vagal, facilitando a resposta bradicárdica e a atividade reflexa durante a ativação dos barorreceptores em resposta à EVEC (Thomas e cols, 1997, 2002; Higa e cols, 2002; Michelini e cols, 2003; Godino e cols, 2005).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal que participa da regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, diretamente ou pela modulação da liberação de aldosterona. A renina é uma aspartil protease que agindo sobre o seu substrato, o angiotensinogênio, forma a angiotensina I, um decapeptídeo inativo que após sofrer ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), transforma-se no octapeptídeo angiotensina II (ANG II), um potente vasopressor e secretagogo da aldosterona. A maior parte da ANG II é formada logo na primeira passagem pelo pulmão, local de grande concentração da ECA. A retirada enzimática do aminoácido N-terminal da molécula da ANG II dá origem a um heptapeptídeo, angiotensina III, que compartilha com o seu precursor a afinidade para os receptores do tipo AT1 das células glomerulosas da adrenal e com isto a propriedade de estimular a liberação de aldosterona, embora seja desprovido de atividade vasopressora (Blair-West, 1980). Situações de diminuição da perfusão renal seja por hipovolemia ou hipotensão, aumento

da atividade β -adrenérgica renal (Ganong, 1972), hipercalemia (Boyd e cols, 1973), redução da carga de sódio na mácula densa (Tuck e cols, 1974) e liberação de prostaglandinas (Seymour e cols, 1979) são capazes de sensibilizar células do aparelho justaglomerular dos rins que respondem com aumento na secreção de renina.

A angiotensina II (ANG II) é um peptídeo que tem um importante papel no controle da ingestão/excreção de água e sódio, bem como na regulação da pressão arterial, tanto por suas ações periféricas (vasoconstrição, controle da secreção de aldosterona, ação tubular renal), como pela ação em algumas áreas do SNC. A aldosterona é o principal mineralocorticoide secretado pela zona glomerulosa das adrenais atuando tanto nos rins quanto no cólon e nas glândulas salivares induzindo o aumento da reabsorção de sódio, excreção/secreção de potássio e íons hidrogênio. A concentração plasmática de aldosterona varia inversamente com a quantidade de sódio da dieta e com a osmolalidade plasmática, o que está de acordo com a sua função fisiológica. A aldosterona age, nas células principais do ductos coletores, ativando os canais de sódio da membrana luminal e aumentando a síntese de Na^+/K^+ ATPase da membrana basolateral, a qual é ativada pela entrada de sódio na célula através dos canais de sódio. Ela ativa também algumas enzimas mitocondriais, aumentando o teor de ATP necessário para o transporte ativo de sódio para fora da célula através da membrana basolateral (O'Neill, 1990). Estas ações induzem ao aumento da reabsorção de sódio.

A vasopressina (AVP) também conhecida como hormônio antidiurético (ADH) desempenha importante função na homeostase hídrica, uma vez que atua diretamente no controle da absorção ou excreção renal de água. O principal fator regulador da secreção de AVP é a osmolalidade do líquido extracelular. Pequenas elevações na osmolalidade plasmática (em torno de 1%) são capazes de alterar em até 1 pg/ml as concentrações plasmáticas de AVP. Além da secreção de AVP, elevações da osmolalidade plasmática também desencadeiam sede. O limiar osmótico que desencadeia a sede é muito próximo ao que induz a secreção da AVP e, dessa forma, em situações de hiperosmolalidade os mecanismos que induzem a sede e a liberação de vasopressina agirão sinergicamente para diminuir a tonicidade plasmática. A hipovolemia é um outro importante estímulo que induz liberação de AVP dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos, aumentando a reabsorção de água livre nos ductos distais do néfron através da aquaporina 2 (canais de água presentes na membrana luminal). Na hipovolemia, o limiar para a liberação de AVP está em torno de 10 a 20% de redução do volume sanguíneo (Share, 1988). Dessa

forma, a secreção de vasopressina pela neuro-hipófise induzida pela queda da PA também é regulada por barorreceptores periféricos, receptores de volume cardiopulmonares e variações na concentração plasmática de ANG II. Em situações de aumento da pressão arterial, a secreção da AVP é inibida, através da sinalização dos barorreceptores ao SNC (Bisset and Choedrey, 1988). Os receptores V1a da vasopressina estão relacionados ao controle da pressão arterial e estão presentes em estruturas do sistema nervoso central como núcleo supraquiasmático, túbero dorsal, amígdala, OVLT, eminência mediana, sugerindo que estes receptores têm função importante como mediadores das ações fisiológicas centrais da AVP (Hernando e cols, 2001). Os receptores V2 são os responsáveis pelo efeito antidiurético da AVP, sendo expressos nos ductos coletores renais e tem como segundo mensageiro o AMP cíclico (Thibonnier e cols, 1994; Lolait e cols, 1995).

Há várias décadas já se sabia que os miócitos dos átrios cardíacos continham grânulos (Kisch, 1956; Palade, 1961) e que alterações do equilíbrio hidroeletrólítico tais como a sobrecarga de sódio ou privação hídrica e depleção de sódio eram capazes de promover alteração no número de grânulos no átrio (Marie e cols, 1976; De Bold, 1979; Atlas e Maak, 1992). A confirmação destes resultados, e a determinação dos efeitos fisiológicos do produto armazenado nos grânulos secretórios cardíacos, o ANP foi feita por De Bold e cols (1981). Estes autores mostraram que a administração de extratos dos átrios em ratos, mas não dos ventrículos, promovia uma potente resposta natriurética. Uma vez demonstrado o papel fisiológico do ANP nos átrios cardíacos, posteriormente, foi verificado que a expansão de volume era um dos estímulos fisiológicos que promovia a liberação de ANP (Lang e cols, 1985; Petersson e cols, 1986). Samson (1985), demonstrou a presença de ANP em extratos provenientes de várias regiões hipotalâmicas. Phillips (1987), publicou uma revisão mostrando a presença de receptores para o ANP no hipotálamo e evidenciou a presença de neurônios ANPérgicos no cérebro. Estes neurônios ANPérgicos estavam localizados nas mesmas regiões do SNC que continham neurônios angiotensinérgicos e estavam associados à regulação da pressão arterial e do balanço hidroeletrólítico.

Neurônios ANPérgicos cerebrais são essenciais em condições de repouso e para a liberação de ANP induzida pela expansão de volume sanguíneo, uma vez que foi demonstrado que a lesão de corpos celulares ou axônios destes neurônios reduzem os níveis plasmáticos de ANP e bloqueiam a liberação de ANP induzida pela EVEC (Antunes-Rodrigues e cols, 1991). O ANP tem um importante papel no controle da

homeostase dos líquidos corporais atuando diretamente no cérebro reduzindo a ingestão de água e sódio (Masotto e Negro-Villar, 1985; Nakamura e cols, 1985; Antunes-Rodrigues e cols, 1985; 1986). Além disso, o ANP apresenta efeitos natriuréticos e diuréticos (Gutkowska e cols, 1984; Adams 1987; Genest e Cantin, 1988). Este peptídeo é liberado na circulação depois da expansão de volume sanguíneo e produz natriurese, em parte, por ação renal direta (Huang e cols, 1985; Cogan, 1986). O ANP atua também inibindo a liberação de renina das células justaglomerulares dos rins (Phillips, 1987; Atlas e Maak, 1992), a produção de ANG II, bem como a liberação de aldosterona das glândulas adrenais, o que promove excreção de sódio (Genest e Cantin, 1988).

A região AV3V e o NPV são duas estruturas profundamente envolvidas na regulação da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico (Badoer, 1966; Brody e Johnson, 1980; Saper e cols, 1985; Palkovits e cols, 1987), e parecem estar intimamente relacionadas à secreção de ANP. Microinjeção de ANP no terceiro ventrículo (3V) pode inibir rapidamente a ingestão de água e sódio (Antunes-Rodrigues e cols, 1985; 1986). A estimulação colinérgica da região AV3V determina elevação acentuada da concentração plasmática e do conteúdo de ANP em várias estruturas neurais (hipotálamo médio basal, eminência mediana, neuro e adenohipófise), sugerindo que a natriurese resultante dessa estimulação seja, em parte, devida à liberação do ANP de origem central (Antunes-Rodrigues e cols, 1996). Baldissera e cols (1989), observaram uma redução nas concentrações plasmáticas de ANP até 5 dias após a lesão da região AV3V. A lesão eletrolítica da região AV3V, assim como lesões localizadas em partes mais caudais do sistema neuronal contendo ANP, como a eminência mediana e a neurohipófise, reduzem de forma acentuada a secreção de ANP após a expansão de volume.

Baldissera e cols (1989), demonstraram ainda que a quantidade de ANP encontrada na neurohipófise é cerca de 1000 vezes menor do que a encontrada no coração, esses dados levaram alguns autores como, por exemplo, Haanwinkel e cols (1995), a proporem a hipótese de que axônios dos neurônios contendo ANP na neurohipófise liberariam outro peptídeo (a ocitocina), a qual uma vez na circulação promoveria a secreção de ANP pelos miócitos cardíacos. Haanwinkel e cols (1995), observaram ainda que, concomitante com a natriurese, a ocitocina também promovia um aumento nas concentrações plasmáticas de ANP.

Já está bem estabelecido que a OT aumenta a excreção renal de eletrólitos em várias espécies, sendo que seus efeitos natriuréticos e caliuréticos são independentes da

AVP. Ocitocina e vasopressina são secretadas, simultaneamente, em resposta à hiperosmolalidade e hipovolemia (Balment e cols, 1980; Stricker e Verbalis, 1987; Haanwinckel e cols, 1995). A OT é um hormônio natriurético mais potente que a AVP. Esses efeitos podem ser explicados por uma ação direta de ambos os peptídeos sobre receptores específicos presentes nas células tubulares renais (Stoeckel e cols, 1987; Tribollet e cols, 1988). A ocitocina liga-se ao receptor V2 da AVP por causa de sua semelhança com a AVP. A excreção urinária de sódio induzida pela OT é completamente bloqueada pelo pré-tratamento com um antagonista da OT, mas não é afetada por antagonistas de receptores V1 da AVP. No entanto, esse efeito foi parcialmente bloqueado pela combinação de tratamentos com antagonistas de receptores V1 e V2 (Verbalis e cols, 1991). As ações renais agudas da OT incluem aumento da taxa de filtração glomerular e da excreção de sódio sem afetar a excreção de potássio (Conrad e cols, 1993; Soares e cols, 1999). A administração sistêmica de doses elevadas de OT aumenta acentuadamente as concentrações de ANP no plasma. Esses dados sugerem que o efeito natriurético da OT ocorre através de um mecanismo dual: a geração de óxido nítrico conduz a um aumento de cGMP e, em doses elevadas, induz liberação de ANP, que por sua vez, também aumenta a produção de cGMP. A natriurese induzida por OT ocorre principalmente através da diminuição da reabsorção de sódio tubular mediada por cGMP (Soares e cols, 1999).

Estudos mostraram que ocitocina injetada por via intraperitoneal ou endovenosa induz aumento, relacionado com a dose aplicada, de ANP plasmático e este é acompanhado por aumento na excreção de sódio e potássio (Haanwinckel e cols, 1995). Resultados de Blackburn e cols, 1992, demonstraram que a inibição do apetite ao sódio induzido pelo antagonista opióide, naloxone foi mediada pela OT. Esses resultados demonstram que a OT apresenta uma modulação inibitória sobre o comportamento ingestivo. Blackburn e cols, 1995, também demonstraram que a ação central da OT produzindo a inibição do apetite o apetite específico para o sódio parece ser regulada por osmorreceptores centrais. Em primatas, humanos e ratos a administração de ocitocina é frequentemente associada com diminuição da pressão arterial (Petersson e cols, 1996; 1998). Em resposta ao estímulo fisiológico apropriado como por exemplo a queda da pressão arterial e do volume sanguíneo, ocorre ativação seletiva de neurônios vasopressinérgicos que induzem à liberação de AVP com pequenas alterações na concentração plasmática de OT. Por outro lado, a EVEC provocada por injeções intra-atriais de solução salina isotônica induz um rápido aumento da concentração de OT e

ANP no plasma e concomitante diminuição na concentração plasmática de AVP (Haanwinckel e cols, 1995). Quando se realiza expansão de volume hipertônica através da injeção endovenosa de NaCl 0,3 M há ativação de osmorreceptores ou Na⁺-receptores e somando-se à ativação de barorreceptores, ocorre aumento na liberação de OT e ANP semelhante àquela produzida pela EVEC isotônica.

Distribuição e conexões dos neurônios magnocelulares e parvocelulares do núcleo paraventricular e supraóptico do hipotálamo envolvidos na secreção de vasopressina e ocitocina.

Estudos da literatura mostraram que os neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos dos NPV e NSO podem apresentar diferenças na sensibilidade de resposta frente aos mesmos estímulos (Rhodes e cols, 1981; Robert e cols, 1991; Roberts e cols, 1993). Diante disto, propuseram a existência de uma heterogeneidade funcional entre eles. Os hormônios neurohipofisários AVP e OT são sintetizados em neurônios magnocelulares dos NPV e NSO do hipotálamo e transportados através de axônios para a neurohipófise onde são armazenados ou liberados para a circulação periférica (Bargmann e Scharrer, 1951). Vários estímulos podem ativar a liberação de AVP ou OT a partir da neurohipófise: lactação, parto e náusea/distensão gástrica (seletivos para a OT), além de perturbações no equilíbrio hídrico e pressão arterial (envolvem tanto a AVP quanto a OT), (Poulain e Wakerley, 1982; Renaud e Bourque, 1991; Armstrong, 1995). Em relação a distribuição dos neurônios magnocelulares no NPV, podemos considerar que a maioria dos axônios desses neurônios se projetam para a neuro-hipófise e se organizam em dois grupos adjacentes: um grupo medial magnocelular (PaMM) que apresenta predomínio de neurônios ocitocinérgicos e localiza-se na porção antero-medial do NPV e um outro grupo lateral magnocelular (PaLM), primariamente vasopressinérgico com formato globular, localizado posterior e dorso-lateral ao PaMM (Hatton e cols, 1976). Além disso, na porção externa do PaLM (ao redor dos neurônios vasopressinérgicos), tem sido descrita a presença de neurônios ocitocinérgicos densamente distribuídos. Dois grupos acessórios de neurônios ocitocinérgicos que também se projetam para a neurohipófise estão incluídos como parte do NPV: um grupo magnocelular periventricular (PeM) e o núcleo acessório comissural anterior (AC), (Swanson e Kuypers, 1980; Swanson e cols, 1986). Os neurônios do PeM estão intimamente associados com a AC, iniciando ao mesmo nível

mas estendendo-se mais caudalmente (Armstrong e cols, 1980; Ju e cols, 1986). Todas essas subdivisões do NPV estão descritas na Fig. 1.

Um terceiro grupo de neurônios presentes no NPV apresentam projeções não endócrinas e suas projeções se estendem para o tronco cerebral (Hosoya e Matsushita, 1979; Armstrong e cols, 1980; Swanson e Kuypers, 1980). Esse grupo inclui a porção dorsomedial cap (PaDC) que apresenta projeções para o sistema nervoso simpático, uma subdivisão parvocelular ventral (PaV) e uma subdivisão parvocelular posterior (PaPo), descritos na Fig. 1. Estas estruturas enviam projeções para regiões do sistema nervoso central como o núcleo motor dorsal do vago, núcleo do trato solitário (NTS), área postrema (AP), substância cinzenta periaquedutal, NDR, LC, NPBL e núcleo reticular ventrolateral (neurônios noradrenérgicos da região A1) (Saper e cols, 1976; Luiten e cols, 1985; Shapiro e Miselis, 1985; Hosoya e cols, 1991; Shafton e cols, 1998 e Pyner e Coote, 2000).

Os neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgico do NSO se projetam para a neurohipófise. Dentro do NSO, os neurônios ocitocinérgicos estão dispostos na porção antero-dorsal e os vasopressinérgicos na porção postero-ventral (Fig. 1) Porém, existe a possibilidade de colocalização (15 a 20%) dos neurônios magnocelulares da vasopressina e ocitocina em ratas lactantes (Mezey e Kiss, 1991) sugerindo que a distribuição desses peptídeos pode ser estímulo-dependente.

Vários estudos tem demonstrado que neurônios gabaérgicos podem modular a atividade dos neurônios vasopressinérgicos na hipertensão (Nissen e cols, 1993; Grindstaff e Cunningham, 2001a; 2001b). Dentre as regiões prosencefálicas que se conectam com o NSO podemos destacar o OSF, MnPO, núcleo da estria terminal (BST), zona perinuclear (PZN) e a banda diagonal de Broca (DBB) (Camacho e Phillips, 1981; Sawchenko e Swanson, 1983; Oldfield cols, 1985; Tribollet e cols, 1985; Jhamandas e cols, 1989). Dentre algumas áreas do tronco cerebral que se projetam para o NSO, destacam-se o núcleo dorsal da rafe (projeta-se para a porção dorsal ocitocinérgica) e o NPBL se projeta para a PZN, podendo modular a porção ocitocinérgica e vasopressinérgica do NSO (Jhamandas e cols, 1992).

Neurônios provenientes de vários núcleos hipotalâmicos formam o sistema neurosecretório parvocelular, também chamado sistema túbero-hipofisário, porque apresenta o envolvimento do núcleo arqueado e está localizado no assoalho do hipotálamo. Ao contrário do sistema magnocelular, os axônios do sistema parvocelular neurosecretório se projetam para a camada externa da eminência mediana (Lechan e

cols, 1982; Wiegand e Price, 1980). Além do núcleo arqueado (responsável pela maior parte da dopamina presente na eminência mediana), a principal origem dos neurônios parvocelulares é proveniente da porção medial do NPV (PaMP). Na porção medial do NPV são encontrados neurônios parvocelulares secretores de AVP e OT (Vandesande e cols, 1977). Outros neurônios parvocelulares neurosecretórios são encontrados na região preóptica periventricular (contendo dopamina e somatostatina), núcleo medial septal e banda diagonal de Broca (contendo hormônio liberador do hormônio luteinizante, LHRH). Neurônios parvocelulares também influenciam a secreção dos hormônios da hipófise anterior (como o hormônio de crescimento, adrenocorticotrófico, luteinizante e tireo-estimulante), sendo liberados através dos terminais dos axônios na zona externa da eminência mediana por fatores hipotalâmicos estimulatórios ou inibitórios.

Dentre as regiões do tronco cerebral, uma que apresenta projeção significativa para o NPV é o NDR (Sawchenko e cols, 1983) e, na ponte, podemos destacar o NPBL (Saper e Loewy, 1980). Quanto as regiões prosencefálicas que se conectam com o PVN podemos destacar o MnPO, núcleo arqueado, hipotálamo lateral, BST, amígdala central (ACe) e medial. Além disso, outras projeções neuronais partem da PaMP para os órgãos circumventriculares, como o OSF e OVLT, bem como para a glândula pineal (Larsen e cols, 1991).

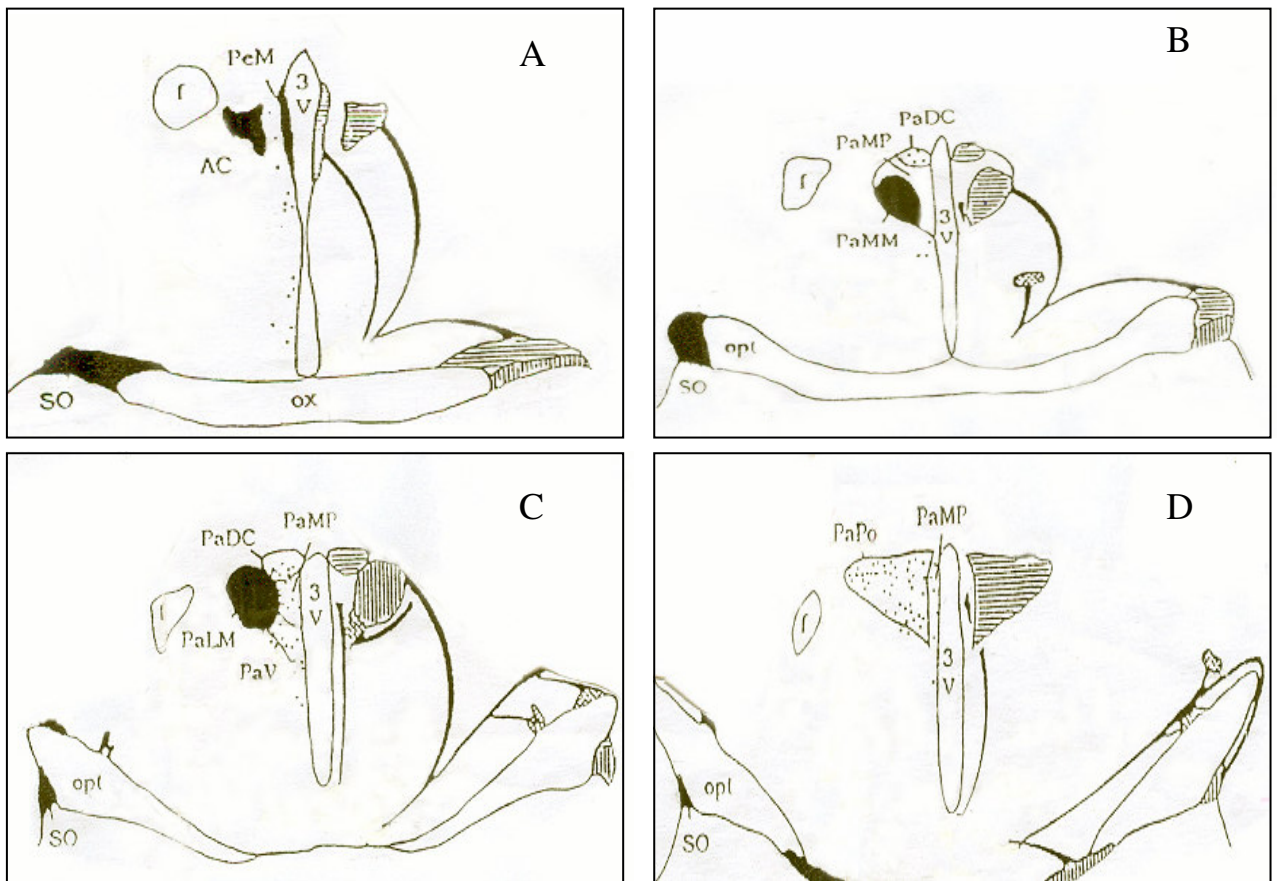


Fig. 1. Distribuição de neurônios magnocelulares e parvocelulares neurosecretórios em diferentes subdivisões do núcleo paraventricular (Pa) e núcleo supra-óptico (SO) contendo vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). Áreas solidas representam neurônios reativos. Linhas horizontais indicam predomínio de neurônios ocitocinérgicos e linhas verticais representam predomínio de neurônios vasopressinérgicos nas diferentes subdivisões do Pa e SO. A foto (A) evidencia o núcleo comissural anterior (AC), a porção periventricular (PeM) e o SO em sua porção anterior. A foto (B) mostra a subdivisão magnocelular medial (PaMM), parvocelular medial (PaMP), a subdivisão dorsal cap (PaDC) e o SO medial. A foto (C) mostra a subdivisão magnocelular lateral (PaLM), parvocelular lateral (PaV), e o SO posterior. Em (D) visualizamos a subdivisão parvocelular posterior do Pa. 3V, terceiro ventrículo; ox, quiasma óptico; opt, trato óptico; f, fórnix. Fotomicrografias de secções coronais do Pa e SO adaptadas do capítulo 15 (Figura 3) do livro: PAXINOS, G. *The Rat Nervous System*. Third edition, Elsevier Academic Press, 2004.

Vias serotoninérgicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), é derivada do aminoácido triptofano da dieta, sendo seu principal metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético. No ser humano, 90% da 5HT encontra-se distribuída na mucosa do trato gastrointestinal, sendo a maioria das células enterocromafins do intestino, 8% encontra-se nas plaquetas sanguíneas e 2% no sistema nervoso central. A 5HT é distribuída em pericários da linha mediana (rafe) do tronco encefálico – mesencéfalo, ponte e bulbo - concentrando-se em maior densidade nos núcleos mediano e dorsal (NDR e NMR) (Azmitia e Segal, 1978; Steinbusch, 1981; Garrison, 1991; Feldman e cols, 1996).

Reis e cols (1991) mostraram que a injeção intraperitoneal de triptofano em ratos induziu natriurese, caliurese e aumento no volume urinário. Estes dados evidenciam uma forte participação do sistema serotoninérgico no controle do volume urinário e excreção de eletrólitos, uma vez que o aumento da disponibilidade central de triptofano sugere que as respostas excretórias estão associadas com um aumento na síntese ou liberação de serotonina e, conseqüentemente, com aumento na transmissão central de serotonina. Estes resultados sugerem ainda que estas vias serotoninérgicas centrais seriam responsáveis pela indução da excreção de eletrólitos estão associadas a um sistema neural envolvendo o NDR responsável pela liberação de ANP. Uma via serotoninérgica proveniente do NDR com projeções para a região AV3V foi identificada (Bosler e Descarries, 1987) sugerindo que essa via serotoninérgica apresenta atividade tônico-estimulatória sobre a liberação de ANP. O NDR podem ser estimulados por aferências neurais de barorreceptores via NTS e pode contribuir para a estimulação da liberação de ANP em resposta à EVEC (Reis e cols, 1991 e 1994).

Entre as áreas cerebrais envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico uma que tem se destacado é o NPBL (Ohman e Johnson, 1986; 1989; Johnson e Edwards, 1990; Edwards e Johnson, 1991; Ohman e Johnson, 1995). O NPBL é um núcleo localizado dorsalmente ao pedúnculo cerebelar superior, na ponte. O NPBL foi inicialmente identificado como uma importante estrutura do tronco cerebral envolvida no controle da ingestão de água (Edwards e Johnson, 1991; Menani e Johnson, 1995; Ohman e Johnson, 1995). Estudos de Lança e Van der Kooy (1985) utilizando técnicas de imunofluorescência combinadas a injeções no NPBL de marcadores retrógrados identificaram neurônios serotoninérgicos da área postrema (AP) que apresentavam conexões diretas com o NPBL. Nesse sentido, a serotonina tem sido identificada como um componente neuroquímico de uma via ascendente da AP para o NPBL .

Estudos em ratos e hamsters sobre o papel núcleo parabraquial medial (NPBm) mostraram que esta subdivisão do núcleo parabraquial apresenta funções relacionadas às respostas comportamentais para sensações gustativas e outras sensações viscerais. O NPBm provê informações relacionadas às vias gustatórias para o hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, complexo amigdalóide, tálamo sensorio visceral e o córtex. Por sua vez, o NPBm recebe conexões descendentes dessas regiões (Bernard e cols, 1993). Dentre as diferentes regiões do NPB procuramos estudar neste

trabalho o NPBL pois vários estudos da literatura tem destacado sua participação no controle do equilíbrio hidroeletrólítico (Ohman e Johnson, 1986, 1989; Colombari e cols, 1996; Johnson e Thunhorst , 1997; Menani e cols, 2000).

O NPBL recebe muitas fibras provenientes da área postrema e porção subpostremal do núcleo do trato solitário medial (AP/NTSm), (Norgren, 1981; Shapiro e Miselis, 1985) e envia projeções para as áreas prosencefálicas envolvidas no controle hidroeletrólítico como núcleos hipotalâmicos, órgão subfornical e amígdala (Ciriello e cols, 1984; Jhamandas e cols, 1992; Krukoff e cols, 1993). Estudos sugerem que o NPBL desempenha um importante papel numa variedade de funções viscerais participando também do controle dos mecanismos da sede (Norgren, 1973; 1976), respiração (Bertrand e Hugelin, 1971), controle cardiovascular (Wang e Ranson, 1939; Coote e cols, 1973), sono (Saito e cols, 1977), bem como na regulação de algumas funções neuroendócrinas (Ward e cols, 1976). Ratos com lesão eletrolítica do NPBL ou lesão neurotóxica (com injeção de ácido ibotênico) aumentaram a ingestão de água induzida pela administração central ou periférica de ANG II ou isoproterenol periférico (Ohman e Johnson, 1986; 1989; Johnson e Edwards, 1990; Edwards e Johnson, 1991; Ohman e Johnson, 1995). Aumentos similares tem sido descritos na ingestão de água em resposta aos tratamentos com isoproterenol e ANG II em ratos com lesão AP/NTSm (Edwards e Ritter, 1982; Ohman e Johnson, 1989). Estudos demonstraram que a distensão atrial reduziu a ingestão de água em resposta à privação hídrica de 24 h ou pelas ações de polietilenoglicol ou isoproterenol (Kaufman, 1990). No entanto, a ingestão de água em ratos submetidos à distensão atrial permaneceu inalterada em ratos apresentando lesão eletrolítica bilateral da porção ventrolateral do NPBL (Ohman e Johnson, 1995).

Estudos de Menani e Johnson (1995), relataram a participação dos mecanismos serotoninérgicos ao nível do NPBL no controle da ingestão de água. Neste estudo, o aumento da ingestão de água em ratos foi induzido pela injeção intracerebroventricular (icv) de ANG II associada a injeções bilaterais do antagonista inespecífico de receptores serotoninérgicos metisergida no NPBL. Esse resultado foi muito importante para esclarecer de que modo os mecanismos excitatórios de áreas prosencefálicas respondem ao bloqueio dos mecanismos serotoninérgicos inibitórios do NPBL. Foi verificado que na ausência do mecanismo serotoninérgico inibitório do NPBL a ação dipsogênica da ANG II é potenciada. É possível que a metisergida microinjetada no NPBL module as vias centrais relacionadas às informações aferentes de receptores cardiopulmonares e/ou

barorreceptores que têm um papel inibitório no controle da ingestão de sal (Toth e cols, 1987; Thunhorst e Johnson, 1994a). A modulação do processo da integração central destas informações pela injeção de metisergida no NPBL pode facilitar a ingestão de sódio induzida não só pela ação da ANG II central, mas também pela depleção de sódio de 24 h (Menani e cols, 1996). Por outro lado, a injeção do agonista serotoninérgico DOI (hidroclorato de dimetoxi-4-iodoanfetamina) ou serotonina no NPBL reduz a ingestão de água induzida por ANG II icv em ratos (Menani e Johnson, 1995). Esses resultados sugerem que a serotonina tem um papel inibitório ao nível do NPBL sobre a ingestão de água induzida pela ANG II.

Estudos de Ohman e Johnson (1995), mostraram que a lesão eletrolítica da porção ventrolateral do NPBL (VLNPBL) abole a inibição da ingestão de água durante a distensão de um balão no átrio direito. Dessa forma, ratos com lesão do NPBL não respondem adequadamente à ativação de um sistema de detecção do aumento do volume sanguíneo (Kaufman, 1984). A natureza do estímulo que sinaliza ao SNC a resposta à expansão de volume sanguíneo não está clara, mas o efeito antidipsogênico da distensão do balão atrial ou da expansão isotônica do volume sanguíneo poderia ser ocasionado pela ativação de mecanismos neurais ou humorais que envolvam o NPBL. A inibição da ingestão de água pela distensão do balão atrial, possivelmente se deve à ativação dos receptores atriais que enviam informações para AP/NTSm que enviariam projeções para o NPBL. Portanto, o NPBL receberia aferências da AP/NTSm que conduziriam informações da atividade de pressorreceptores arteriais e/ou cardiopulmonares que poderiam modular a ingestão de água e de sódio (Johnson e Edwards, 1990; Thunhorst e Johnson, 1994a; Thunhorst e cols, 1994b). Por outro lado, mecanismos humorais podem estar associados à liberação do ANP induzida pela distensão atrial. E isto pode ser evidenciado pelos dados da literatura que mostram que administração central ou periférica de ANP reduz as respostas dipsogênicas (Antunes-Rodrigues e cols, 1985; Kaufman e Monckton, 1988).

Estudos utilizando o emprego de técnicas de imunocitoquímica através da expressão da proteína c-Fos em ratos tratados com dexafenfluramina, um liberador de serotonina, identificaram o NPBL como um dos sítios de ação para esta droga (Li e Rowland, 1994). Esse estudo também mostrou que a lesão do NPBL com ácido ibotênico atenua a imunorreatividade para c-Fos induzida por dexafenfluramina em regiões como o BST e a ACe, sugerindo a participação do NPBL na ativação destas áreas (Li e Rowland, 1994). Também foi relatado que a injeção periférica de

dexafenfluramina é capaz de reduzir a ingestão de NaCl hipertônico em ratos (Neill e Cooper, 1989; Rouah-Rosilio e cols, 1994), e que injeções periféricas de metergolina, antagonista não específico da 5HT, aumentam esta ingestão (Rouah-Rosilio e cols, 1994).

Nesse sentido, torna-se importante avaliar a participação do NPBL, como via inibitória serotoninérgica, no controle da liberação de ANP, OT e AVP e na excreção de água e eletrólitos, em resposta às alterações do volume do líquido extracelular.

OBJETIVOS

Este estudo tem como **objetivo geral** avaliar a participação do NPBL na regulação neuroendócrina da homeostase dos líquidos corporais.

Especificamente, nos propusemos a avaliar:

- 1) Os efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI) serotoninérgicos no NPBL sobre a excreção cumulativa de sódio, potássio, volume urinário e osmolalidade urinária em animais submetidos a sobrecarga hídrica oral (SHO) ou em resposta à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC - NaCl 0,15 M);
- 2) Os efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a liberação do ANP, AVP e OT em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC (NaCl 0,15 M);
- 3) Avaliar os efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a ativação de neurônios do sistema nervoso central envolvidos no controle da homeostase hidromineral por meio de técnicas imunohistoquímica de marcação dupla em resposta à EVEC (NaCl 0,15 M): a) proteína c-Fos/ocitocina (OT), b) proteína c-Fos/vasopressina (AVP) c) proteína c-Fos/tirosina hidroxilase (TH) e d) proteína c-Fos/serotonina (5HT) em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC (NaCl 0,15 M);
- 4) Identificar os grupos neuronais de áreas prosencefálicas e do tronco cerebral imunorreativos à proteína c-Fos em resposta ao estímulo agudo da EVEC e que se conectam ao NPBL. Para isso utilizamos técnicas de imunomarcção dupla: proteína c-Fos/marcador retrogrado de vias (Fluorogold) em animais previamente microinjetados com Fluorogold no NPBL e submetidos à EVEC isotônica (NaCl 0,15 M). Além disso, propomos investigar se os neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe enviam projeções ao NPBL e são ativados em resposta à EVEC isotônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250 a 330 g, mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, aclimatados à temperatura ambiental controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h (luz 7:00-19:00 h). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração normal e água "ad libitum". Todos os experimentos foram realizados entre 8:00 e 13:00 h. Os procedimentos experimentais aos quais os ratos foram submetidos foram aprovados na reunião de 05/09/2005 pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Processo número: 052/2005).

2- Habituação dos animais aos procedimentos experimentais

Para diminuir a influência de fatores que promovam o estresse no momento dos experimentos, os ratos foram manipulados e treinados, diariamente, com as manobras utilizadas no procedimento experimental, tais como: sondagem orogástrica, leve massagem na região supra-púbica, por pelo menos uma semana antes do experimento.

3- Cânulas no NPBL

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (200 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho esterotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referências para nivelar a cabeça dos animais no plano horizontal. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas no NPBL dos ratos. Nesses pontos foram feitas trepanações dos ossos do crânio com uma broca esférica, abrindo-se dois orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. No NPBL, cânulas de aço inoxidável (12 x 0.6 mm d.i) foram posicionadas bilateralmente no cérebro conforme as coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,0 mm lateral à linha mediana e 4,4 mm abaixo da dura-máter de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). As cânulas foram posicionadas 2 mm acima do NPBL e fixadas ao crânio através de parafusos e resina acrílica dental. Mandris metálicos (0.3 mm d.i) foram utilizados para obliteração das cânulas. Os ratos receberam injeções profiláticas de penicilina (20.000 unidades, intramuscular). Na semana seguinte à

realização das cirurgias, os ratos foram manipulados e treinados diariamente para os procedimentos de sondagem orogástrica e limpeza do mandril. Essas manipulações animais visam diminuir as influências de fatores de estresse no momento do experimento. Os experimentos foram realizados 5-7 dias após a cirurgia para o implante de cânulas no NPBL.

4 - Injeções de fármacos no cérebro

Os fármacos utilizados foram dissolvidos em solvente adequado conforme o caso (solução salina fisiológica ou uma mistura de propilenoglicol/água) e foram injetados no NPBL dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A cânula injetora (0,3 mm d.i.) foi 2,0 mm mais longa do que a cânula guia. No NPBL, o volume de injeção foi 0,2 µl bilateralmente.

5 – Análise histológica

Terminados os experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com tribromoetanol injetando-se, a seguir, corante azul de Evans (2 mg/200 nl) no NPBL. Posteriormente, foram submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção intracardíaca (com a aorta torácica clampada) de solução salina tamponada (50 ml), seguida de solução de formalina 10%. Imediatamente após, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (40 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção do NPBL com o auxílio de um micrótomo de congelamento (MICROM, modelo HM 5000M). Os cortes histológicos, montados em lâminas, foram corados pelo Método Nissl e analisados para se localizar os pontos das injeções no NPBL de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986).

6- Cânula na veia jugular

No dia anterior ao experimento, os animais foram anestesiados e submetidos à dissecação da veia jugular externa direita e à colocação de uma cânula de silastic (Dow Corning Corp. Med. Prod. 0,20 mm x 0,37 mm), segundo técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). A cânula foi introduzida 2,3 cm em direção ao átrio direito posicionada na região dorsal ao pescoço através de um túnel subcutâneo. Para evitar a obstrução da cânula, logo após a cirurgia e 4 e 5 horas antes do experimento, a cânula foi lavada com

0,2 ml de salina heparinizada (125 UI/ml). Por meio desta cânula, foi realizada a expansão aguda do volume do LEC.

7- Expansão do volume do líquido extracelular (EVEC)

Inicialmente, para testar o funcionamento das cânulas jugulares, estas foram lavadas com 0,2 ml de solução de salina heparinizada (1:40). Sessenta minutos após, os animais foram submetidos ou não à expansão do volume sanguíneo (EVEC). A EVEC foi realizada por meio da infusão intravenosa (veia jugular) de uma solução de NaCl isotônica (0,15 M), em volume de 2 ml/100 g de peso corporal, durante 60 segundos.

8 - Análise urinária

Os animais foram transferidos das caixas individuais para gaiolas metabólicas após a realização da segunda SHO (ver protocolo experimental) e foram mantidos sem acesso a água ou ração. As amostras de urina foram coletadas para análise do volume urinário e dosagem fotométrica de sódio e potássio (Fotômetro de Chama, Micronal – Modelo b 262). A osmolalidade urinária foi medida por um osmômetro (The Fiske® Osmometer - OS 5M OSA.G60), baseando-se no método do ponto de congelamento. Para uniformizar os resultados, para efeito de comparação entre médias dos diferentes grupos, os dados obtidos foram expressos em ml/100 g de peso corporal para volume urinário e em $\mu\text{Eq}/100$ g de peso corporal para excreção cumulativa de Na^+ e K^+ .

9- Coleta de sangue

Para as dosagens de ANP, os animais foram sacrificados por decapitação e, logo em seguida, o sangue do tronco foi coletado em tubos de polipropileno, mantidos sob gelo, contendo EDTA e inibidores de enzimas proteolíticas [EDTA 10% (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de sangue), Pepstatin A 500 μM (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de sangue), (PMSF) (fenil-metil-sulfonil-fluoreto), 1 mM (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de sangue)]. O plasma foi separado por centrifugação (centrífuga Hitachi) a 1940 g, a 4°C, durante 20 min, e em seguida estocado a - 70°C, em alíquotas de 1 ml, apropriadas para a extração do peptídeo. Para as dosagens de AVP ou OT, as amostras de sangue foram colhidas apenas com anticoagulante (EDTA), sem inibidores de enzimas proteolíticas.

10- Extração e dosagem do peptídeo natriurético atrial

A- Extração do ANP plasmático

A extração do ANP plasmático foi realizada utilizando-se vycor {Corning glass Works, NY, 140 mesh (NO 7930)} de acordo com a técnica descrita anteriormente por Gutkowska e cols (1984).

Controle da extração

Para determinar a eficiência da extração do peptídeo pelo método utilizado, uma quantidade de (± 25.000 cpm) do peptídeo marcado (^{125}I -ANP) foi adicionada a 1ml de plasma, o qual foi submetido à extração, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador gama e, a partir dos valores de suas radioatividades, a proporção do peptídeo recuperado no final do processo de extração foi calculada.

B- Radioimunoensaio do ANP

A determinação da concentração plasmática do ANP foi realizada através de RIE de duplo-anticorpo, segundo a técnica descrita por Gutkowska e cols (1984) e padronizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

11- Extração e dosagem da vasopressina e da ocitocina

A extração da vasopressina e da ocitocina em amostras de plasma foi realizada com éter de petróleo e acetona. A determinação da concentração plasmática foi realizada através de radioimunoensaio específico, segundo técnica implantada em nosso laboratório, modificada de Husain e cols (1973). Todas as amostras de um determinado experimento foram dosadas em um mesmo ensaio.

A- Radioimunoensaio da vasopressina

Para o radioimunoensaio da vasopressina foram utilizados: a) primeiro anticorpo, anti-soro de coelho anti-AVP (RAS 8103), obtido do Peninsula Laboratories, INC. (Belmont, California, USA); b) hormônio marcado, ^{125}I -[Arg 8]-vasopressina; e c) segundo anticorpo, anti-soro de cabra anti-IgG de coelho, desenvolvido no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia-FMRP.

B- *Radioimunoensaio da ocitocina*

A concentração plasmática de ocitocina foi determinada segundo metodologia corrente implantada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia - FMRP: o primeiro anticorpo foi gentilmente cedido por M. Morris (Wright State University, Dayton, Ohio); o peptídeo utilizado para marcação e como padrão (OT # 8152) fornecido por Peninsula Laboratories, INC. (Belmont, California, USA). A especificidade do método para a ocitocina é alta, com uma reação cruzada de 100% para a ocitocina, menos de 0,01% para [Lis8] vasopressina e de 0% para a [Arg8] vasopressina e para o α -ANP. Todas as amostras de um determinado experimento foram analisadas em um único ensaio.

12-Procedimento imunohistoquímico

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (200 mg/Kg de peso corporal) e perfundidos intracardiacamente com salina e fixador (4% paraformaldeído). Após a extração dos cérebros dos ratos, estes foram mantidos em fixador durante 4 horas e logo após em uma solução de sacarose a 30% em tampão fosfato a 4°C um a dois dias. Posteriormente, os cérebros foram seccionados em cortes de 30 μ m de espessura por meio de um micrótomo de congelamento. Imediatamente depois foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (solução 10% metanol e H₂O₂) e das uniões inespecíficas com albumina a 5%. Os cortes foram incubados a temperatura ambiente, durante toda a noite com os anticorpos primários: anti c-Fos (Oncogen Science), anti-Fluorogold (Chemicon International). Para o procedimento de imunomarcação nuclear de c-Fos, a reação foi amplificada pela utilização do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector), empregando Diaminobenzidina (DAB) intensificada através da adição de cloreto de cobalto e sulfato de níquel ao meio. A imunomarcação nuclear para a proteína c-Fos resultou em um produto de reação nuclear de cor violeta escuro.

Na seqüência, para a imunocolocalização citoplasmática foi utilizada uma solução de anticorpo primário para serotonina (Diasorin), ocitocina ou vasopressina (Peninsula laboratories) e tirosina hidroxilase (Chemicon International Inc) e as secções cerebrais foram incubadas overnight. No dia seguinte, os tecidos cerebrais foram incubados por 1 h a temperatura ambiente em solução contendo anticorpo secundário biotilado anti-rabbit (Vector) para AVP, OT e 5HT ou anti-mouse (Vector) para TH. A reação foi amplificada com a utilização do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector), empregando Diaminobenzidina (DAB) não intensificado como cromógeno

(sem a adição de cloreto de cobalto e sulfato de níquel ao meio) produzindo uma coloração marron, característica da peroxidase citoplasmática. O terceiro anticorpo (serotonina) revelou-se utilizando um anticorpo secundário (FITC) complexado com fluoresceína. Por último, as secções flutuantes foram montadas utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%), secadas a temperatura ambiente, submergidas em xileno por 1 h e cobertas com meio de montagem.

A seleção dos tecidos cerebrais para o NPV e NSO, NDR e NTS (em que os animais foram submetidos a microinjeções de metisergida, DOI, veículo no NPBL) e para o FG injetado NPBL que foram utilizados nos procedimentos imunohistoquímicos foram selecionados a partir da análise histológica de cortes transversais (40 µm de espessura) do NPBL de cada rato. A partir da análise histológica, foram selecionados 4 animais de cada tratamento apresentando os pontos das injeções bilateralmente no NPBL de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Portanto, animais que apresentaram injeções fora do NPBL foram descartados.

Análise das imagens

As análises das imunomarcações ir-c- Fos ou duplas (ir-c-Fos-AVP ou ir-c-Fos-OT) no NPV e NSO do hipotálamo de animais que receberam injeções de veículo, metisergida ou DOI no NPBL e submetidos à EVEC nos permitiram identificar a quais subdivisões do NPV esses grupos neuronais pertencem: a) em neurônios magnocelulares: subdivisão medial (PaMM), lateral (PaLM), núcleo comissural anterior (AC) e no NSO do hipotálamo; b) em neurônios parvocelulares: subdivisão medial (PaMP) e ventral (PaV). Para maiores detalhes destas subdivisões do NPV ver Paxinos (2004). Fora do hipotálamo os grupos neuronais serotoninérgicos do NDR, subdivisão dorsal foram ir-c-Fos ou ir-c-Fos-5HT e os grupos e catecolaminérgicos do NTS (adjacente à área postrema) foram ir-c-Fos ou ir-c-Fos-TH.

As áreas cerebrais foram selecionadas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1997) e adquiridas em níveis semelhantes para animais experimentais e controles. Para o PVN, na porção AC (-0.92 atrás do bregma), lateral e medial (-1.8 mm); NSO (-1,3 mm), NDR (-7,64 mm) e NTS (-13,68 mm) contando para isto com um sistema computadorizado (sistema de microscopia Axioskop 35M (Zeiss), acoplado a uma câmara digital para comparar as imagens).

Para cada subdivisão do NPV, NSO, NDR e NTS a contagem de c-Fos foi realizada utilizando o programa Scion Image PC, baseado na versão do NIH, 1997. A

contagem de c-Fos foi também realizada manualmente para confirmar a similaridade das contagens. A quantificação dos neurônios duplamente marcados foi feita manualmente empregando o sistema de microscopia Axioskop 35M (Zeiss), provido de óptica para campo claro e para fluorescência. A contagem manual das duplas marcações nos permitiu obter uma comparação relativa (e não absoluta) das imunomarcas, tendo em vista que foram considerados (contados) os objetos (núcleos) de coloração negra intensa para os grupos controles e experimentais. Fotomicrografias das secções representativas dos grupos controles e experimentais foram adquiridas em níveis semelhantes, com auxílio do programa Adobe Photoshop Image Analysis Program, versão 5.5, onde apenas o balanço das cores, brilho e o contraste foram ajustados.

13- Injeção do marcador retrógrado de vias (Fluorogold) no NPBL

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (200 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho esterotáxico (modelo Kopf 900). Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução de uma pipeta de vidro cuja extremidade apresentou o diâmetro de 10-20 μm bilateralmente no NPBL dos ratos. A administração iontoforética do marcador retrógrado de vias, Fluorogold (FG, Fluorochrome, Inc. Englewood, CO) foi realizada utilizando-se as seguintes coordenadas: 9,6 mm caudal ao bregma, 2,0 mm lateral à linha mediana e 7,5 mm abaixo da dura-máter. Nesses pontos foram feitas trepanações do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se dois orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Após a colocação da pipeta no local desejado foi aplicada uma corrente positiva pulsátil de 10 μA (0.5 s on e 0.5 s off) por 5 minutos para a administração iontoforética do marcador. A pipeta de vidro foi mantida no sítio da injeção por 10 minutos adicionais para evitar a dispersão do marcador. Após um período de 7-10 dias de recuperação cirúrgica dos animais e para a migração do marcador, os animais foram submetidos à expansão isotônica do volume do LEC. Uma vez realizada a injeção do FG, este é captado pelas terminações dos axônios e caminha por via retrógrada até o corpo celular do neurônio. Desta forma, em nossos experimentos, quando a área mantém conexões com o NPBL verifica-se o FG no seu corpo celular, bem como nos axônios e dendritos. Esta marcação é citoplasmática. Na dupla marcação (c-Fos-FG) nota-se marcações tanto no núcleo (c-Fos) quanto no citoplasma (FG). O procedimento imunohistoquímico está descrito no item anterior.

Análise das imagens

A análise das imunomarcações duplas nos permitiram identificar os diferentes grupos neuronais que se projetam anterogradamente para o NPBL. As áreas cerebrais que se apresentaram imunorreativas à proteína c-Fos (ir-c-Fos) e FG foram selecionadas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1997), e adquiridas em níveis semelhantes para animais experimentais e controles. Para o núcleo da estria terminal (BST, -0,26 mm caudal ao bregma); PVN (-2,12 mm); amígdala central (ACe, -1,80mm); NDR (-7,64 mm); locus coeruleus (LC, -9,16 mm) e NTS (-13,68 mm). As secções foram analisadas através de um sistema computadorizado (sistema de microscopia Axioskop 35M, Zeiss), acoplado a uma câmara digital para comparar as imagens. Para a quantificação dos neurônios ir-c-Fos foi utilizado o programa Scion Image. Para as imunomarcações duplas ir-c-Fos-FG a contagem foi feita manualmente empregando o mesmo sistema de microscopia citado acima. Fotomicrografias das secções representativas dos grupos controles e experimentais foram adquiridas em níveis semelhantes com auxílio do programa Adobe Photoshop Image Analysis Program, versão 5.5, onde apenas o balanço das cores, brilho e o contraste foram ajustados. Os animais controles foram submetidos a injeção de FG no NPBL, porém, sem a EVEC.

14- Fármacos utilizados

Maleato de metisergida, antagonista inespecífico de receptores serotoninérgicos (2,0 ou 8,2 nmol/0,2 µl), foi injetada no NPBL, durante 1 minuto. Para a dissolução da metisergida foi utilizada uma mistura de propilenoglicol/água 2:1 (veículo). Maleato de metisergida foi adquirido do laboratório Tocris, Elisville, MO, USA. Agonista serotoninérgico (hidroclorato de dimetoxi-4-iodoanfetamina, DOI – 2,8 ou 14,0 nmol /0,2 µl) foi adquirido do laboratório Research Biochemicals International, Natick, MA, USA. Os animais controles receberam injeções do mesmo volume de salina isotônica ou veículo em todos os experimentos.

Tribromoetanol (Aldrich, Chem, Company, Inc.) foi injetado intraperitonealmente e pentabiótico veterinário (Fort Dodge) foi injetado subcutaneamente; liquemine foi utilizado como anticoagulante (Heparina, 5000 UI/ml, Roche). Fluorogold (Fluorochrome, Inc. Englewood, CO) foi diluído a 1% em salina isotônica (0,85 %) e injetado no NPBL iontoforicamente por meio de pipeta de vidro. Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector Laboratories); anticorpo primário anti-

tirosina hidroxilase produzido em rato (Chemicon International Inc); kit padrão ABC (Vector Laboratories); fluoresceína avidina (Vector Laboratories); anticorpo primário anti-ocitocina produzido em coelho (Peninsula Laboratories, Inc); anticorpo primário anti-ARG8 vasopressina produzido em coelho (Peninsula Laboratories, Inc); albumina Bovina (Sigma); anticorpo primário anti-serotonina produzido em coelho (Diasorin 1990 Industrial Boulevard, MN 55082 USA); anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Vector Laboratories); paraformaldeído (Sigma).

15- Análise estatística

Os resultados obtidos estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para comparação entre duas médias foi aplicado o teste “t” de student. Para comparação de três ou mais médias foi aplicada a análise de variância (ANOVA de uma via e alguns casos mereceram duas vias) seguida do teste de Newman Keuls para as comparações entre diferentes tratamentos. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS

A) Efeitos das microinjeções do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a excreção cumulativa de sódio, potássio, água e osmolalidade urinária em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0.15 M).

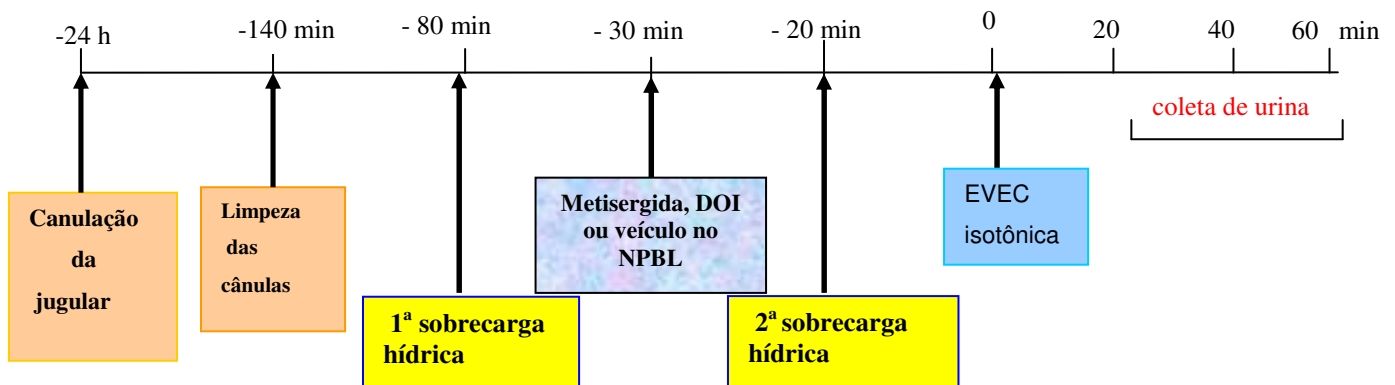
Os animais foram treinados e manipulados uma semana antes dos experimentos, para os procedimentos que envolvem a intubação orogástrica. No dia anterior ao experimento, foi realizada a canulação da veia jugular dos ratos e posteriormente foram privados de alimento, porém, foi permitido o acesso livre à água durante toda a noite. Os ratos foram mantidos em jejum (14 horas) para assegurar um estômago vazio e diminuir a contaminação da urina com as fezes e para obter valores de volume e excreção urinária de sódio e potássio mais uniformes.

No dia do experimento os animais foram pesados e receberam, através de sonda orogástrica, duas sobrecargas hídricas (SHO) equivalentes a 5% do peso corporal, cada uma, com um intervalo de 1 h entre elas. Em seguida, foram colocados em gaiolas metabólicas sem acesso à água ou alimento. Dez minutos antes da segunda SHO, os animais receberam, no NPBL, microinjeções de 0,2 µl de metisergida (2,0 ou 8,2 nmol), DOI (2,8 ou 14,0 nmol) ou os respectivos veículos (propilenoglicol/água) ou salina isotônica. As injeções foram feitas num período de 60 segundos. Trinta minutos após terem sido realizadas as microinjeções, os animais foram submetidos à EVEC (NaCl 0,15 M). A seguir, foram coletadas amostras de urina em tubos graduados, em intervalos de 20 min, por um período de 60 min, para a determinação da concentração urinária de Na⁺, K⁺, volume e osmolalidade urinária. Um completo esvaziamento da bexiga foi induzido manualmente, através de suave massagem na região supra-púbica no final de cada intervalo de coleta. Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, porém, sem a EVEC.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Metisergida (2,0 e 8,2 nmol/0,2 μ l)

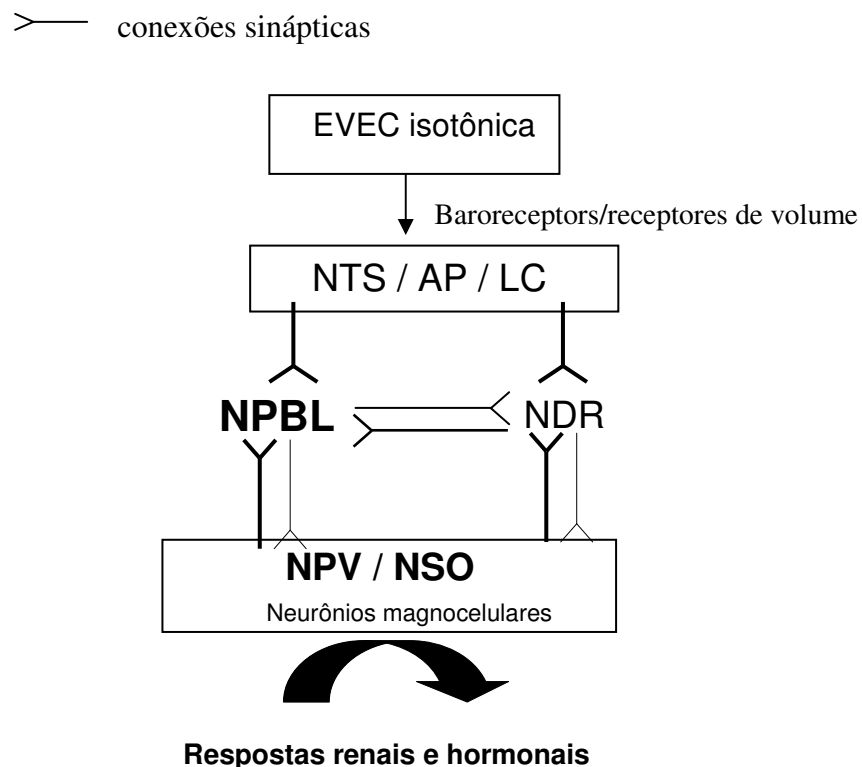
DOI (2,8 e 14,0 nmol/0,2 μ l)



B) Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre as liberações plasmáticas de ANP, AVP e OT em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0.15 M).

O esquema deste experimento foi semelhante ao descrito anteriormente. Em resumo, no dia do experimento, os animais receberam, através de sonda orogástrica, duas sobrecargas hídricas (SHO) equivalentes a 5% do peso corporal, cada uma, com um intervalo de 1 h entre elas. Dez minutos antes da realização da segunda sobrecarga hídrica (SHO) os ratos receberam injeções bilaterais do antagonista serotoninérgico, metisergida, (8,2 nmol), DOI (14,0 nmol) ou veículo no NPBL. Vinte minutos após a segunda SHO os animais foram submetidos a EVEC (NaCl 0,15 M). Cinco minutos após a EVEC os animais foram sacrificados por decapitação e, logo em seguida, o sangue do tronco foi coletado em tubos de polipropileno, mantidos sob gelo, contendo EDTA e inibidores de enzimas proteolíticas. Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, porém, sem EVEC.

C) Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a ativação neuronal avaliada pela expressão da proteína c-Fos em neurônios ocitocinérgicos (ir-c-Fos-OT), vasopressinérgicos (ir-c-Fos-AVP) do NSO e NPV, neurônios serotoninérgicos (ir-c-Fos-5HT) do NDR e catecolaminérgicos (ir-c-Fos-TH) do NTS em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15M).



Para se estudar a participação dos mecanismos serotoninérgicos do NPBL sobre a ativação da proteína c-Fos em neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do NPV e NSO; catecolaminérgicos do NTS e serotoninérgicos do NDR em resposta à EVEC, os animais foram submetidos aos procedimentos imunohistoquímicos de marcação dupla (ver materiais e métodos - item 12).

O esquema deste experimento obedece ao protocolo experimental descrito anteriormente. Em resumo, no dia do experimento os animais receberam, através de sonda orogástrica, duas sobrecargas hídricas (SHO) equivalentes a 5% do peso corporal, cada uma, com um intervalo de 1 h entre elas. Dez minutos antes da segunda SHO os animais receberam injeções bilaterais do antagonista serotoninérgico metisergida (8,2 nmol), DOI (14,0 nmol) ou veículo ou no NPBL. Quinze minutos após a realização da segunda SHO, os ratos foram submetidos à EVEC (NaCl 0,15M). Noventa minutos

após a EVEC, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (200 mg/kg de peso corporal) e, os cérebros perfundidos por via intracardíaca com salina e fixador (4% paraformaldeído) para, em seguida, serem sujeitos ao procedimento imunohistoquímico.

D) Identificar os grupos neuronais de áreas prosencefálicas e do tronco cerebral imunorreativos à proteína c-Fos em resposta ao estímulo agudo da EVEC e que se conectam ao NPBL.

Os animais foram submetidos, como descrito anteriormente (no item 13 dos Materiais e Métodos), à administração iontoforética do marcador retrógrado de vias, Fluorogold (Fluorochrome, Inc. Englewood, CO), por meio de pipeta de vidro cuja extremidade apresentou o diâmetro de 10-20 μm , bilateralmente, no NPBL. Após um período de 7-10 dias de recuperação e para permitir a migração do marcador (Fluorogold), os animais foram submetidos à EVEC (NaCl 0,15M). Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, porém, sem EVEC. Noventa minutos após a EVEC, os animais foram anestesiados com tribromoetanol e os cérebros dos mesmos foram perfundidos por via intracardíaca com salina e fixador (4% paraformaldeído) para, em seguida, serem sujeitos aos procedimentos imunohistoquímicos (item 12 dos Materiais e Métodos). O procedimento imunohistoquímico caracterizou os grupos neuronais de algumas áreas do SNC (que estão envolvidas no controle da homeostase hidromineral e conectam-se ao NPBL) por meio da técnica de imunolocalização nuclear da proteína c-Fos em combinação com a técnica de imunolocalização citoplasmática de FG. Os animais também foram submetidos aos procedimentos imunohistoquímicos de marcação tripla no NDR (proteína c-Fos-FG-5HT) para investigar se os neurônios serotoninérgicos do NDR estão envolvidos nos mecanismos de controle da EVEC.

RESULTADOS

A) Localização histológica das cânulas no NPBL

As injeções foram feitas principalmente nas porções central e dorso-lateral do NPBL (Fulwiler e Saper, 1984). Em alguns animais as injeções alcançaram as porções ventro lateral e externo lateral, assim como o núcleo Kolliker-Fuse (KF). Os resultados destes ratos foram incluídos na análise. As difusões das injeções foram geralmente confinadas acima do pedúnculo cerebelar superior (pcs). Em alguns animais, porém, o limite da difusão esteve dentro do pcs, ou mesmo um pouco abaixo. A Fig. 2A mostra a representação esquemática (unilateral) da localização do NPBL, retirada de Swanson (1992) e as Figs. 2B (unilateral) e C (bilateral) representam secções coronais mostrando um ponto de injeção típico no NPBL e o trajeto das cânulas, respectivamente, em ratos representativos dos animais estudados.

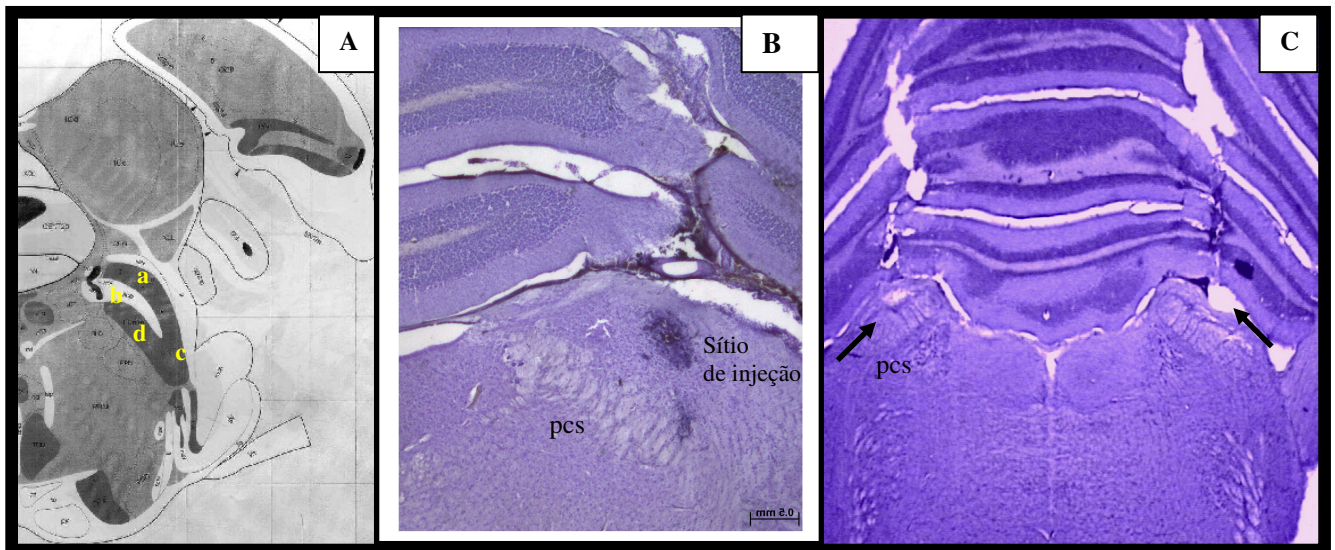


Fig 2. A: Representação esquemática da localização do núcleo parabraquial lateral (NPBL), retirado de Swanson (1992). A: Em (a) está representado o núcleo parabraquial lateral (NPBL); (b) representa o pedúnculo cerebelar superior (pcs); (c) Kolliker-Fuse (KF), considerado funcionalmente parte do NPBL e (d) representa o núcleo parabraquial medial (NPBM). B: corte histológico mostrando um ponto de injeção unilateral no NPBL e C: corte histológico mostrando os pontos das injeções, bilateralmente, no NPBL em ratos representativos dos animais estudados.

B) Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC sobre a excreção cumulativa de Na⁺, K⁺, volume e osmolalidade urinária em ratos.

Em ratos submetidos apenas a sobrecargas hídricas orais (e não submetidos à EVEC), as injeções bilaterais de metisergida (2,0 ou 8,2 nmol) ou DOI (2,8 ou 14,0 nmol) no NPBL não modificaram a UNa⁺V, UK⁺V e o volume urinário (Figs. 3 A e B; 4 A) e (Figs. 5 A e B; 6A).

Em ratos tratados com veículo no NPBL, a EVEC aumentou a UNa⁺ (112,3 ± 11,6 µEq. 100 g pc. 60 min vs. controle: 9,2 ± 1,2 µEq. 100 g pc. 60 min), UK⁺V (43,3 ± 3,0 µEq. 100g pc. 60 min vs. controle: 4,1 ± 0,6 µEq. 100 g pc. 60 min) e volume urinário (4,0 ± 0,5 ml. 100 g pc. 60 min vs. controle: 2,6 ± 0,3 ml. 100 g pc. 60 min), (Figs. 3 A e B; 4A).

As injeções bilaterais de metisergida (2,0 ou 8,2 nmol/0,2 µl) no NPBL atenuaram significativamente o aumento da UNa⁺ (79,0 ± 8,7 e 53,9 ± 6,0 µEq. 100 g pc. 60 min, respectivamente), [F(5,36) = 40,9; p < 0,001]; UK⁺V (28,9 ± 3,0 e 20,2 ± 1,5 µEq. 100 g pc. 60 min, respectivamente), [F(5,36) = 57,6; p < 0,001] e volume urinário (2,8 ± 0,3 e 2,1 ± 0,3 ml. 100 g pc. 60 min, respectivamente), [F(5,36) = 3,5; p < 0,05] normalmente observado em resposta à EVEC nos primeiros 20 min do início da coleta de urina retornando posteriormente aos valores basais (Figs. 3 A e B; 4A).

Por outro lado, as microinjeções de DOI no NPBL (2,8 ou 14,0 nmol/0,2 µl), produziram, em resposta à EVEC, um incremento adicional na UNa⁺ (208,5 ± 17,3 e 306,0 ± 24,0 µEq. 100 g pc. 60 min, respectivamente vs. salina: 112,5 ± 11,7 µEq. 100 g pc. 60 min), [F(5,36) = 87,1; p < 0,001]; UK⁺V (101,0 ± 18,8 e 157,1 ± 20,7 µEq. 100 g pc. 60 min, respectivamente vs. salina: 43,8 ± 4,3 µEq. 100 g pc. 60 min), [F(5,36) = 25,9; p < 0,001] e volume urinário (7,0 ± 0,5 e 9,0 ± 0,6 ml. 100 g pc. 60 min, respectivamente vs. salina: 4,0 ± 0,5 ml. 100 g pc. 60 min), [F(5,36) = 30,0; p < 0,05] no período de 20 min (Figs. 5 A e B; 6A).

Os ratos que foram pré-tratados com DOI (2,8 nmol) no NPBL, quando submetidos à EVEC, apresentam redução significativa na osmolalidade urinária no período de 20-60 min quando comparado ao ratos submetidos à EVEC e que receberam injeções de veículo no NPBL (Fig. 6 C).

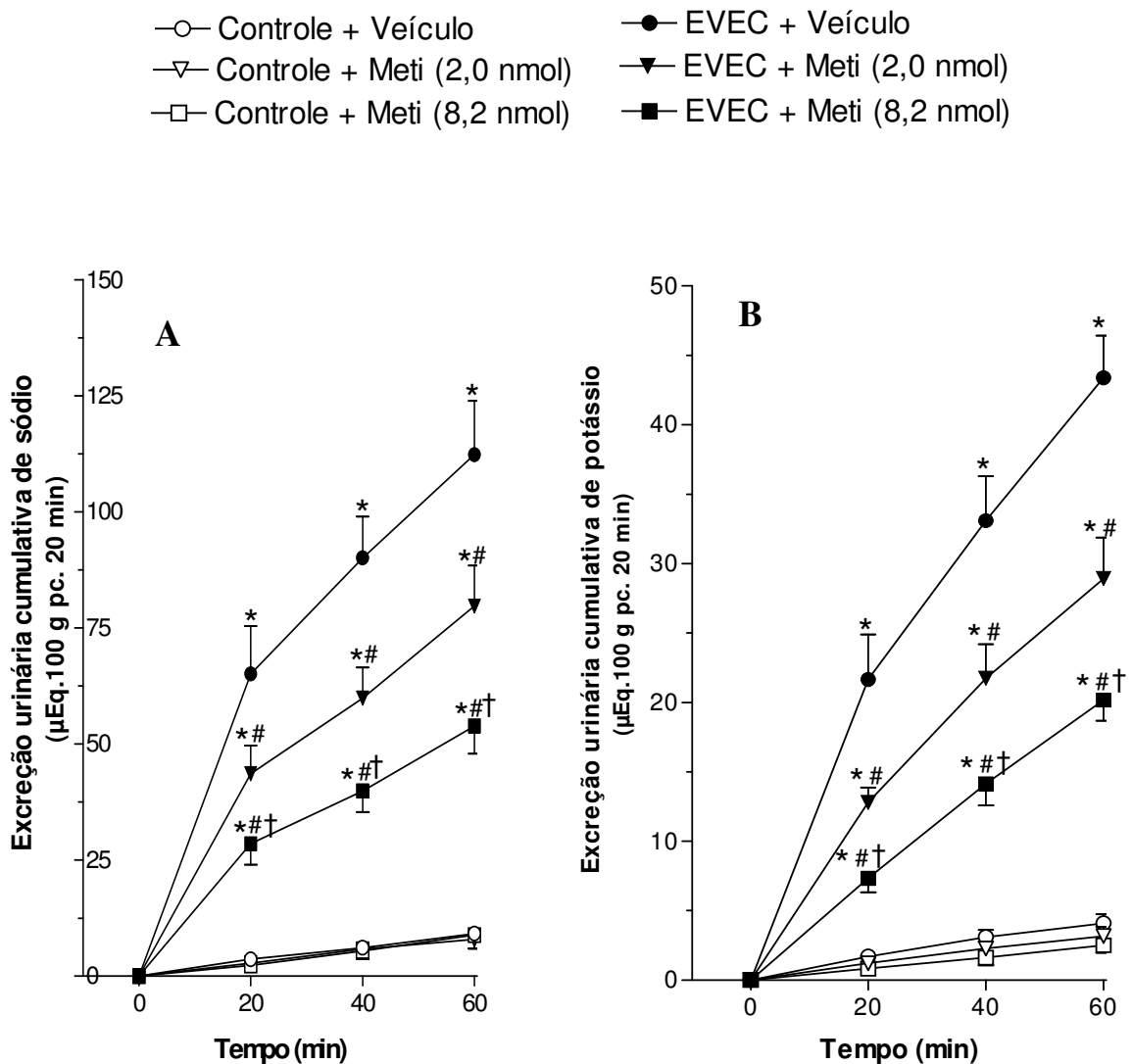


Fig 3. Excreção urinária cumulativa de sódio e potássio em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo ou metisergida (Meti, 2,0 ou 8,2 nmol/0,2 µl). Os gráficos (A) e (B) representam a excreção urinária de sódio e potássio, respectivamente. Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle + Veículo; # $p < 0,05$ vs. EVEC + Veículo; † $p < 0,05$ EVEC + Meti 2,0 (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n=6$ para os grupos sem EVEC e $n = 8$ para os grupos com EVEC. Notar que as escalas da ordenada para a excreção de sódio e potássio em A e B são diferentes. pc, peso corporal.

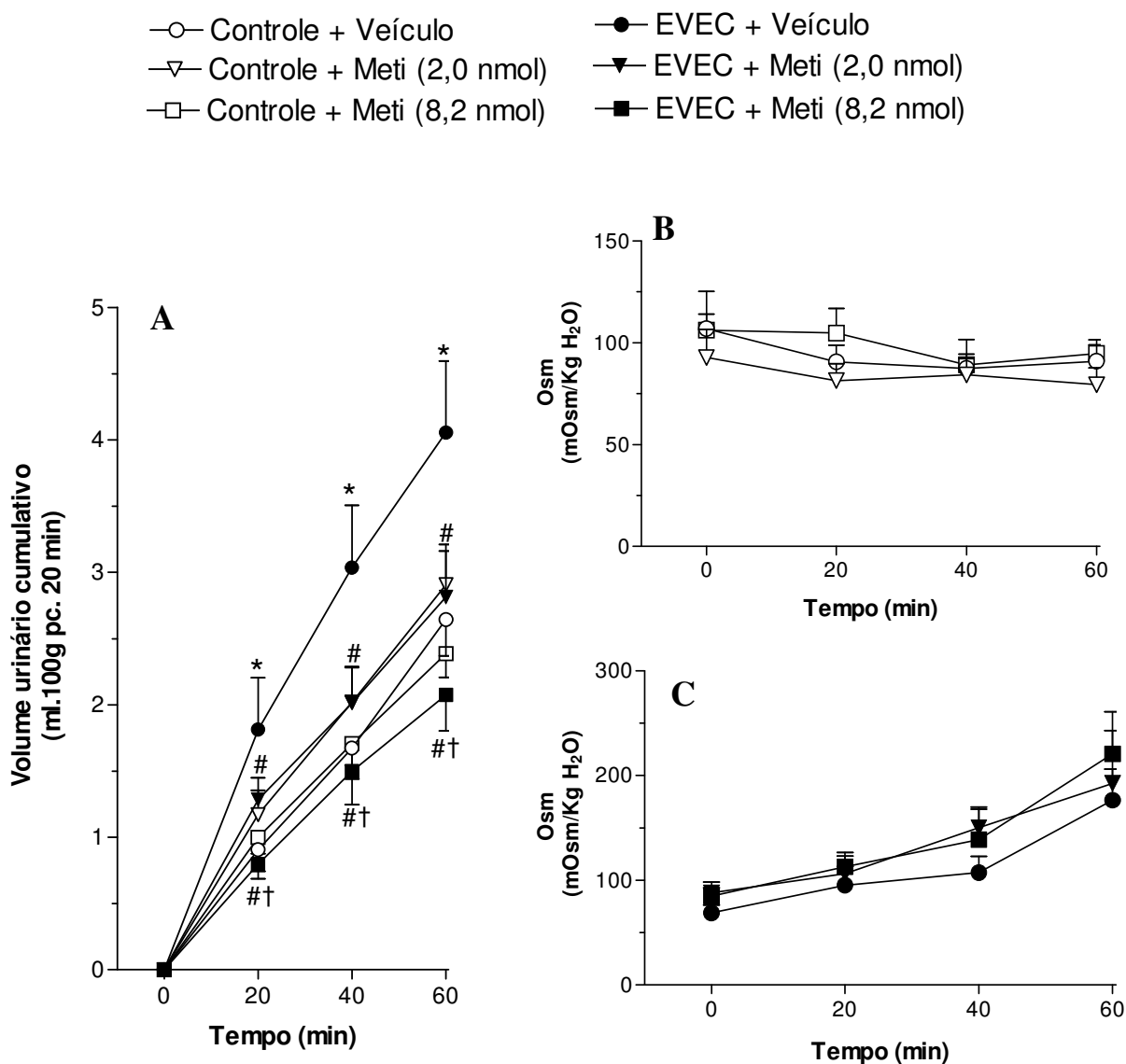


Fig. 4. Volume urinário cumulativo e osmolalidade urinária (Osm) em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo ou metisergida (Meti, 2,0 ou 8,2 nmol/0,2 μ l). O gráfico (A) representa o volume urinário. O gráfico (B) representam a osmolalidade urinária de ratos não submetidos à EVEC e o gráfico (C) a osmolalidade urinária dos ratos submetidos à EVEC. Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle + Veículo; # $p < 0,05$ vs. EVEC + Veículo; † $p < 0,05$ EVEC + Meti 2,0 (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n=6$ para os grupos sem EVEC e $n = 8$ para os grupos com EVEC. pc, peso corporal.

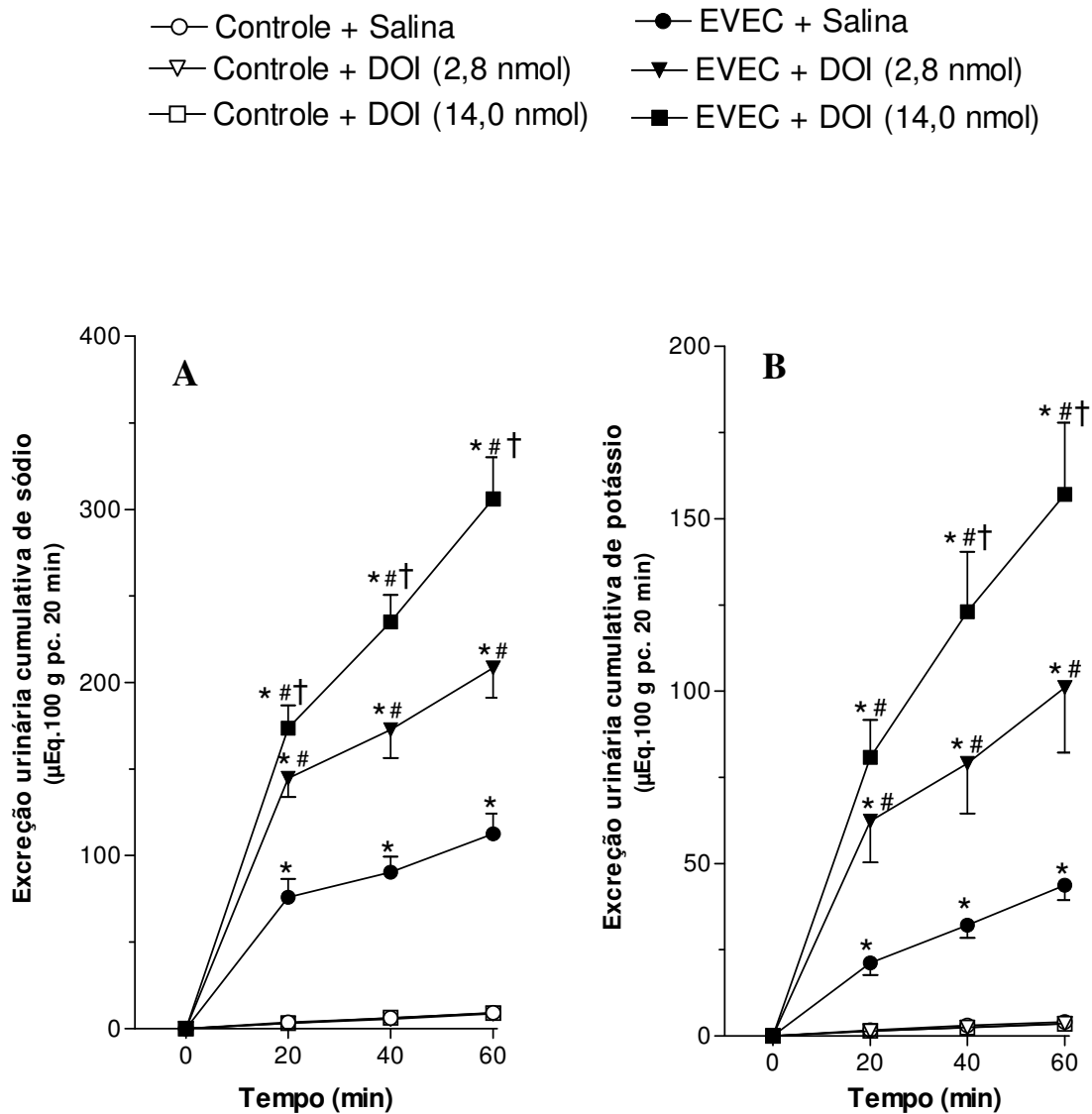


Fig.5. Excreção urinária cumulativa de sódio e potássio em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo ou hidrócloro de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 2,8 ou 14,0 nmol/0,2 µl). Os gráficos (A) e (B) representam a excreção urinária de sódio e potássio, respectivamente. Os resultados estão representados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle + Salina; # $p < 0,05$ vs. EVEC + Salina; † $p < 0,05$ EVEC + DOI 2,8 (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n=6$ para os grupos sem EVEC e $n = 8$ para os grupos com EVEC. Notar que as escalas da ordenada para a excreção de sódio e potássio em A e B são diferentes. pc, peso corporal.

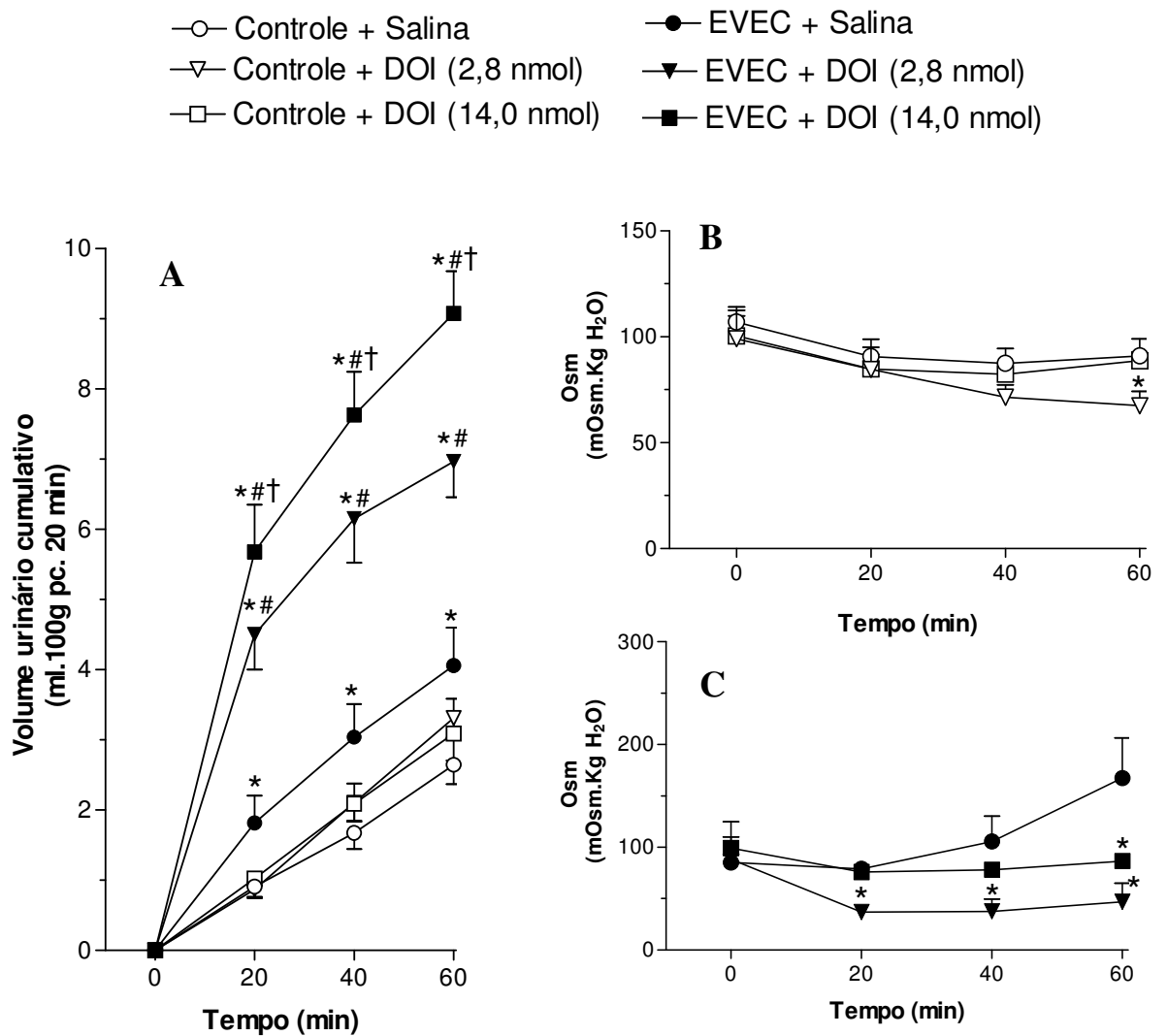


Fig. 6. Volume urinário cumulativo e osmolalidade urinária (Osm) em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo ou hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 2,8 ou 14,0 nmol/0,2 μ l). O gráfico (A) representa o volume urinário. O gráfico (B) representam a osmolalidade urinária de ratos não submetidos à EVEC e o gráfico (C) a osmolalidade urinária dos ratos submetidos à EVEC. Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle + Salina; # $p < 0,05$ vs. EVEC + Salina; † $p < 0,05$ EVEC + DOI 2,8 (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n=6$ para os grupos sem EVEC e $n = 8$ para os grupos com EVEC. pc, peso corporal.

C) Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a liberação plasmática do ANP, AVP e OT em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15M)..

Os animais não submetidos à EVEC e que receberam injeções de metisergida (8,2 nmol) ou DOI (14,0 nmol) no NPBL não apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de OT, AVP e ANP em comparação aos ratos que receberam veículo no NPBL (Figs. 7 A, B e C).

Os animais que receberam injeções de veículo no NPBL apresentaram, em resposta à EVEC, um aumento significativo na concentração plasmática de OT ($55,1 \pm 3,7$ pg/ml vs. sem EVEC + veículo: $8,7 \pm 0,9$ pg/ml), [F(5,36) = 57,3; $p < 0,0001$] e ANP ($258,3 \pm 28,1$ pg/ml vs. sem EVEC + veículo: $65,0 \pm 22,0$ pg/ml), [F(5,36) = 18,7; $p < 0,0001$] sem alterações na concentração plasmática de AVP ($1,1 \pm 0,1$ pg/ml, vs. control: $1,0 \pm 0,1$ pg/ml), (Figs. 7 A, B e C).

Animais que receberam injeções de DOI (14,0 nmol) no NPBL apresentaram um incremento na concentração plasmática de OT ($78,6 \pm 6,7$ pg/ml) e ANP ($348,3 \pm 54,7$ pg/ml) quando submetidos à EVEC em comparação aos valores obtidos nos animais que receberam veículo no NPBL (Figs.7 A e B).

Injeções bilaterais de metisergida (8,2 nmol) no NPBL, atenuaram o aumento da concentração plasmática de OT ($29,2 \pm 2,3$ pg/ml) e aboliram o aumento da concentração de ANP ($80,1 \pm 5,3$ pg/ml), normalmente observado em resposta à EVEC (Figs. 7 A e B). Nos animais submetidos à EVEC e que receberam injeções de metisergida no NPBL ocorreu um aumento na concentração plasmática da AVP ($2,2 \pm 0,2$ pg/ml) em comparação aos ratos tratados com veículo no NPBL ($1,1 \pm 0,1$ pg/ml), [F(5,36) = 8,9; $p < 0,0001$] (Fig. 7 C).

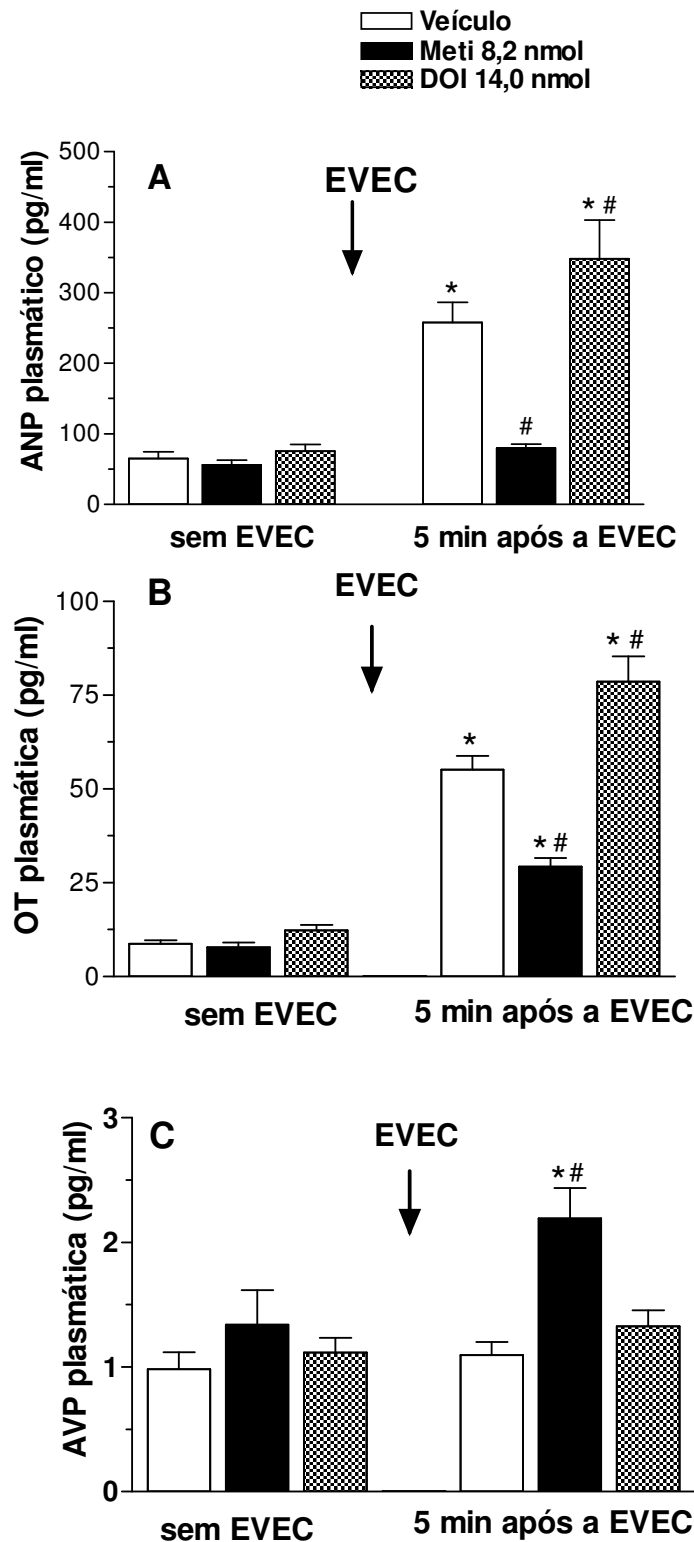


Fig 7. (A): Concentração plasmática do peptídeo natriurético atrial (ANP) (B): ocitocina (OT) e (C) vasopressina (AVP) em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) que receberam microinjeções de hidrócloro de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 14,0 nmol/0,2 μ l), metisergida (Meti, 8,2 nmol/0,2 μ l) ou veículo no núcleo parabraquial lateral (NPBL). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo em ratos sem EVEC, # $p < 0,05$ vs. Veículo em ratos com EVEC (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n = 6$ para o grupo sem EVEC e $n = 8$ para o grupo com EVEC .

D) Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a ativação neuronal avaliada pela expressão da proteína c-Fos em neurônios serotoninérgicos (ir-c-Fos-5HT) do NDR e catecolaminérgicos (ir-c-Fos-TH) do NTS em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15M).

Microinjeções bilaterais de metisergida (8,2 nmol) no NPBL aumentaram o número de neurônios ir-c-Fos ($31,5 \pm 7,7$ vs. veículo: $22,0 \pm 4,0$), [F(2,9) = 7,7; $p < 0,01$] e ir-c-Fos-TH (tirosina hidroxilase, marcador da atividade de neurônios catecolaminérgicos), ($8,2 \pm 1,6$ vs. veículo: $3,0 \pm 0,5$), [F(2,9) = 8,0; $p < 0,001$] no NTS adjacente à AP em ratos submetidos à EVEC (Fig. 8 A, B e 10). A Fig. 10 apresenta fotomicrografias de secções representativas do NTS, evidenciando os neurônios ir-c-Fos-TH em animais que receberam injeções de veículo, metisergida e DOI no NPBL em resposta à EVEC.

Em ratos submetidos à EVEC, as microinjeções de DOI (14,0 nmol) no NPBL reduziram o número de neurônios ir-c-Fos ($10,2 \pm 1,6$ vs. veículo: $21,8 \pm 2,4$), [F(2,9) = 8,0; $p < 0,01$] e ir-c-Fos-5HT ($1,6 \pm 0,7$ vs. veículo: $4,3 \pm 0,4$), [F(2,9) = 10,0; $p < 0,005$] na subdivisão dorsal do NDR (Fig. 9 A, B e 11). A Fig. 11 apresenta fotomicrografias de secções representativas do NDR, evidenciando os neurônios ir-c-Fos-5HT em animais microinjetados com veículo, metisergida e DOI no NPBL em resposta à EVEC.

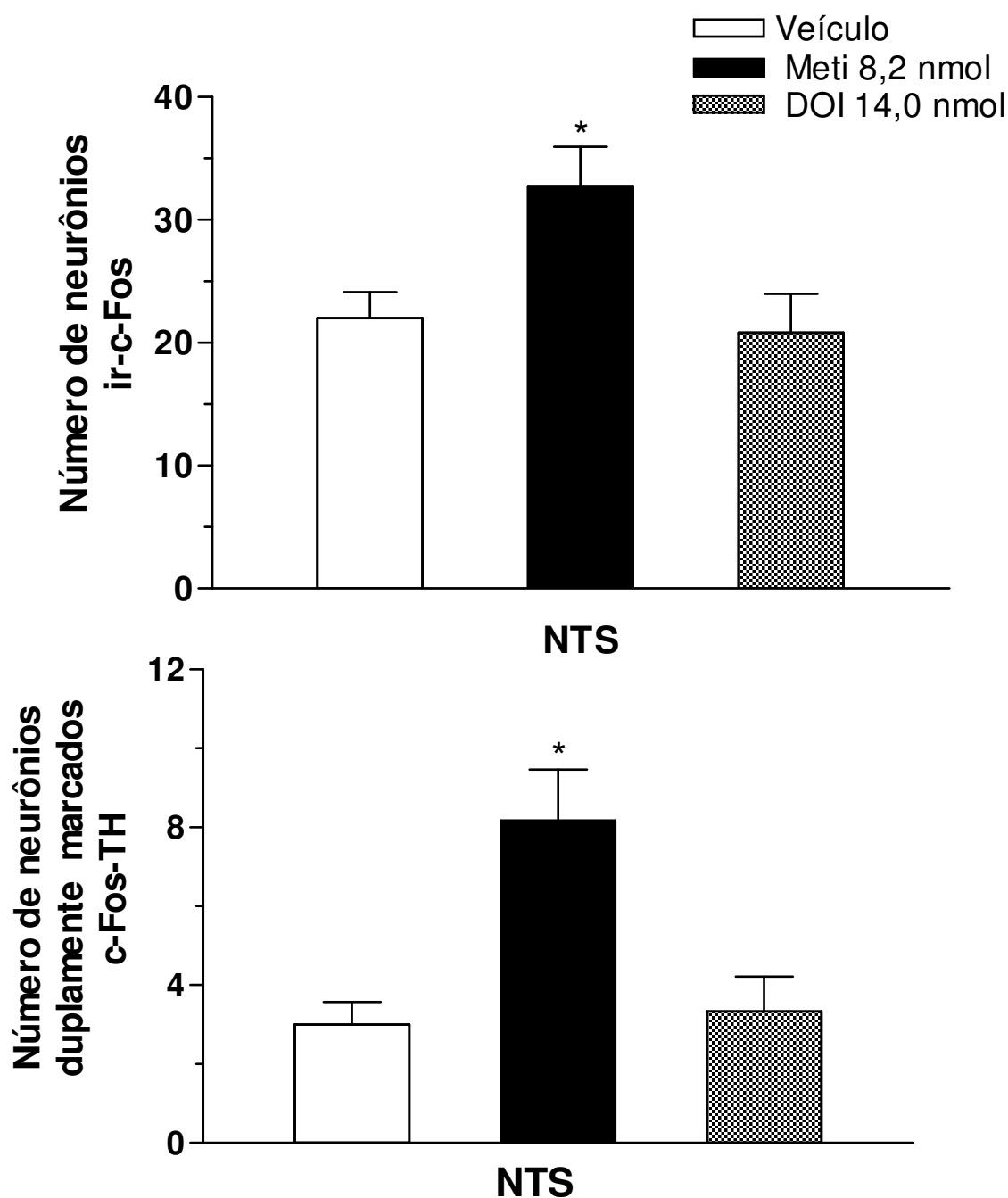


Fig. 8. (A): Número de neurônios imunorreativos (ir-) à proteína c-Fos e (B): número de neurônios ir-c-Fos-TH (tirosina hidroxilase) no núcleo do trato solitário (NTS, adjacente a área postrema) em ratos submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) e que receberam injeções de metisergida (Meti, 8,2 nmol), hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 14,0 nmol) ou veículo no núcleo parabraquial lateral (NPBL). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo; $n = 4$ por grupo.

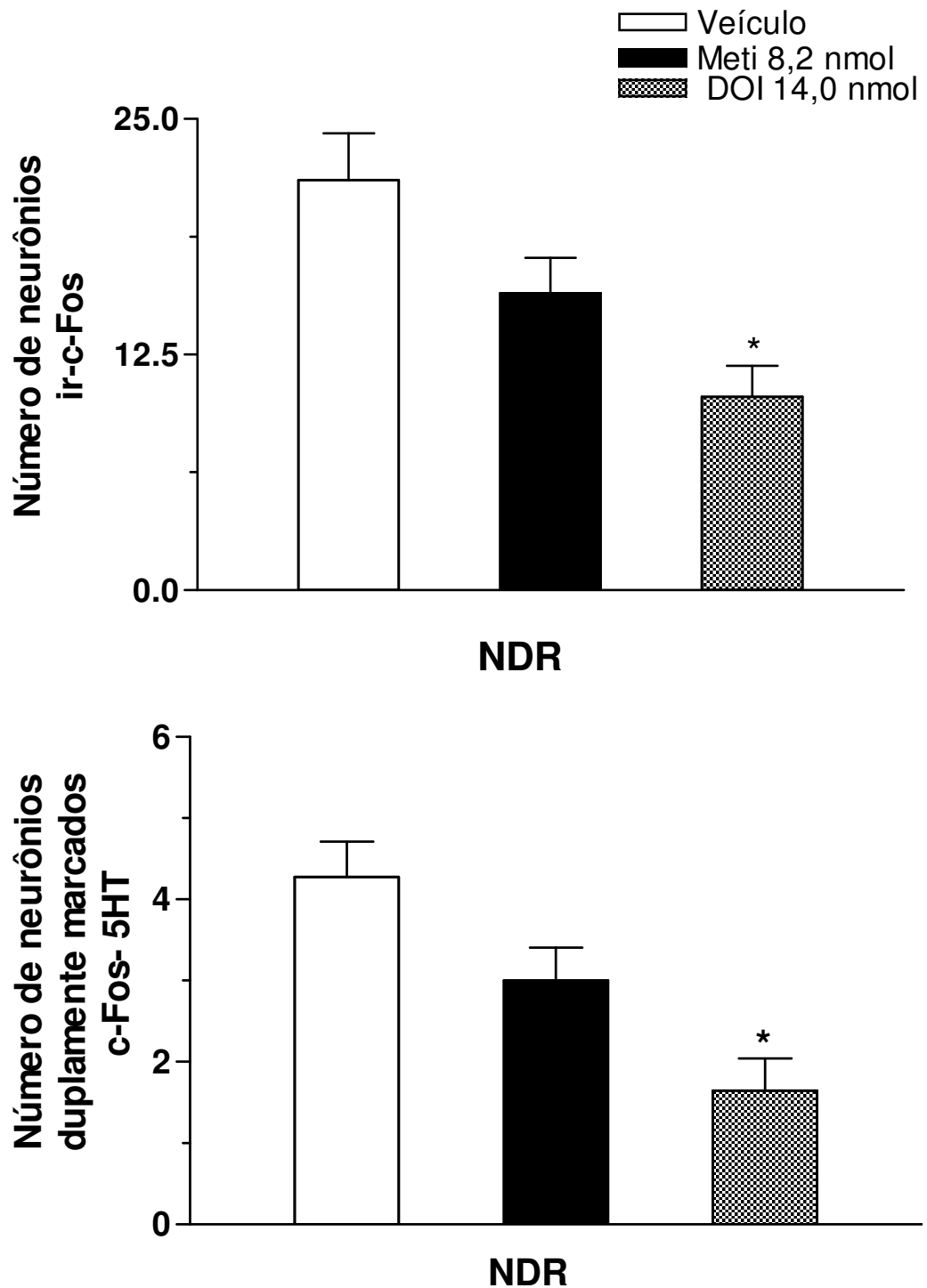


Fig. 9. (A): Número de neurônios imunorreativos (ir-) à proteína c-Fos e (B): número de neurônios ir-c-Fos-5HT (serotonina) no núcleo dorsal da rafe (NDR) em ratos submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) e que receberam micorinjeções de metisergida (Meti, 8,2 nmol), hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 14,0 nmol) ou veículo no núcleo parabraquial lateral (NPBL). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo; $n = 4$ por grupo.

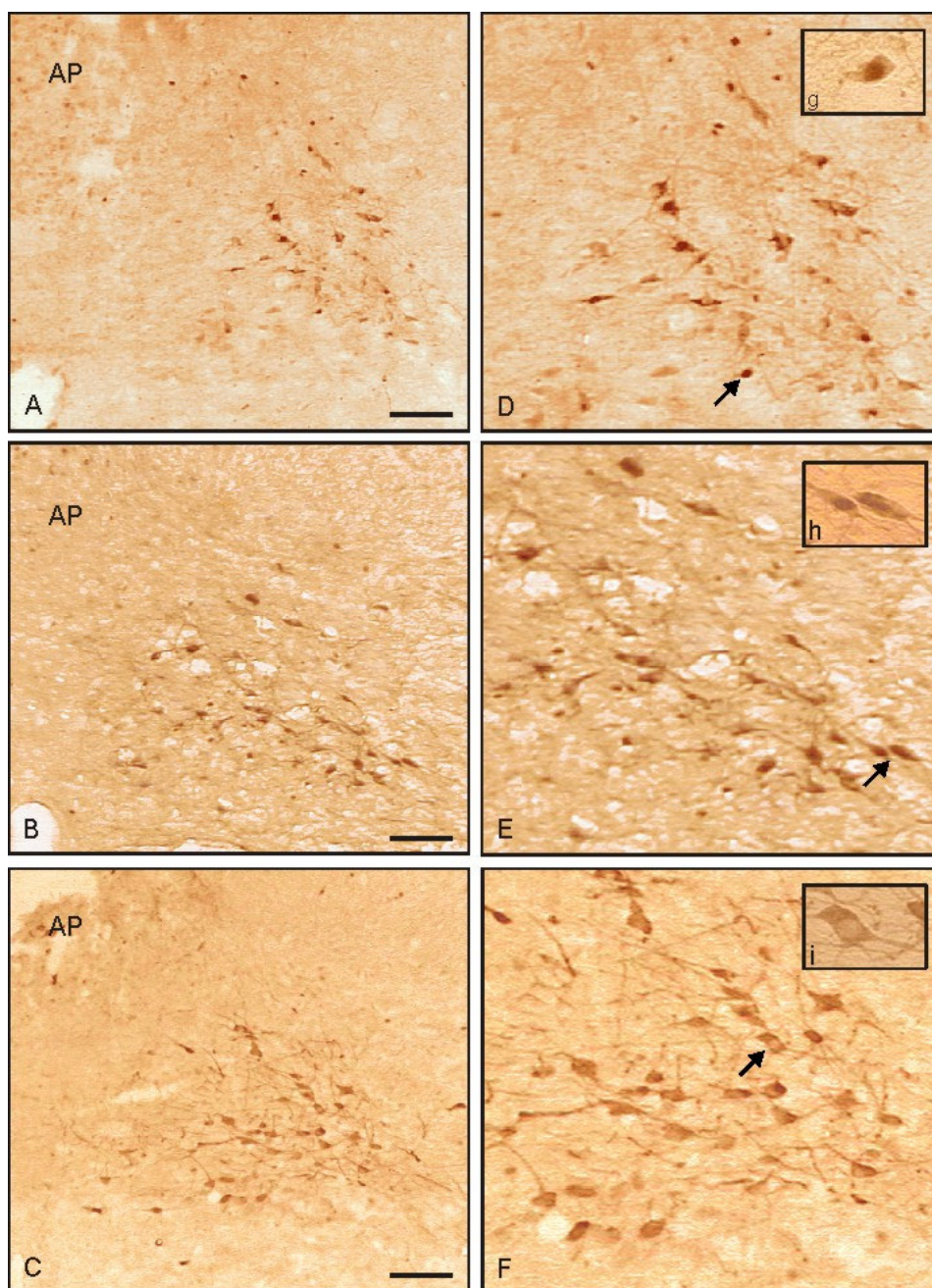


Fig. 10. Fotomicrografias de seções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunoreatividade dupla c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no núcleo do trato solitário (NTS) adjacente à area postrema (AP) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes dos neurônios indicados pelas setas. Escala da barra = 100 μ m.

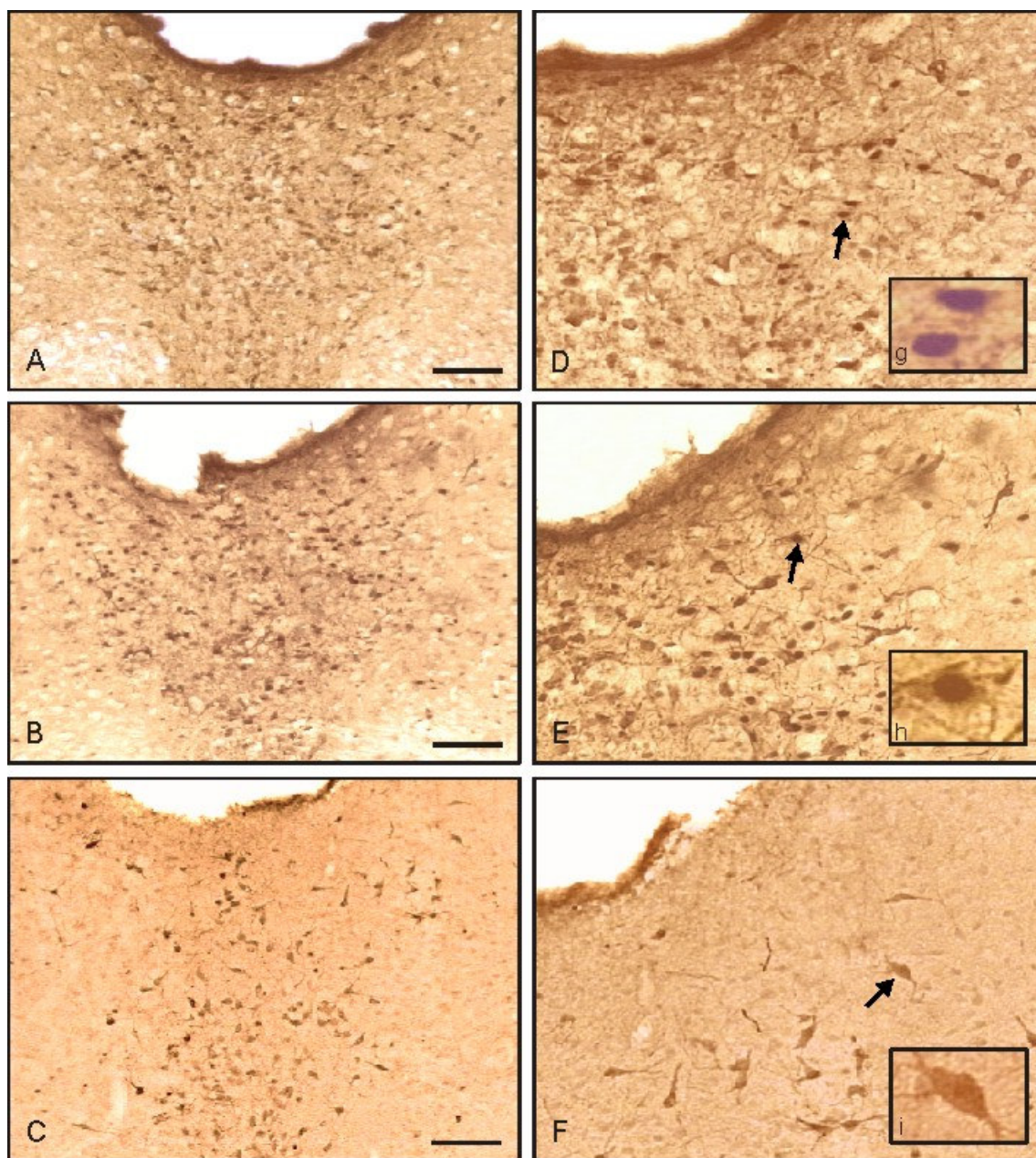


Fig. 11. Fotomicrografias de seções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunorreatividade dupla c-Fos e serotonina (5HT) no núcleo dorsal da rafe (NDR) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes dos neurônios indicados pelas setas. Escala da barra = 100 μ m.

E) Efeitos das microinjeções bilaterais do antagonista metisergida e do agonista DOI serotoninérgicos no NPBL sobre a ativação neuronal avaliada pela expressão da proteína c-Fos em neurônios ocitocinérgicos (ir-c-Fos-OT), vasopressinérgicos (ir-c-Fos-AVP) do NSO e NPV do hipotálamo em animais submetidos a SHO ou em resposta à EVEC isotônica (NaCl 0,15M).

Microinjeções bilaterais de DOI (14,0 nmol) no NPBL em ratos submetidos à EVEC produziram aumento do número de neurônios ir-c-Fos nas subdivisões parvocelular ventral (PaV) do NPV ($43,4 \pm 3,6$ vs. veículo: $26,6 \pm 3,1$), [F(2,12) = 80,0; $p < 0,0001$] (Fig. 12 A), sendo que o número de animais considerados para a análise estatística nesta subdivisão do NPV foi igual a 5. Em ratos que receberam DOI no NPBL também houve aumento no número de neurônios ir-c-Fos na subdivisão medial magnocelular (PaMM) do NPV ($55,5 \pm 3,6$ vs. veículo: $28,8 \pm 3,2$), [F(2,9) = 55,2; $p < 0,0001$] (Fig. 12A). Microinjeções de DOI no NPBL em ratos submetidos à EVEC aumentaram o número de neurônios ir-c-Fos-OT no núcleo acessório comissural anterior (AC) ($10,3 \pm 1,4$ vs. veículo: $6,3 \pm 0,5$), [F(2,9) = 5,4; $p < 0,02$] (Figs. 12B e 17) e na subdivisão PaMM ($24,3 \pm 1,8$ vs. veículo: $10,0 \pm 1,7$), [F(2,9) = 14,8; $p < 0,001$] do NPV (Figs. 12 B e 16).

Os ratos submetidos à EVEC e que receberam microinjeções de metisergida (8,2 nmol) no NPBL apresentaram redução do número de neurônios ir-c-Fos nas subdivisões medial parvocelular (PaMP), ($28,5 \pm 0,6$ vs. veículo: $45,8 \pm 3,5$), [F(2,9) = 9,3; $p < 0,005$]; PaV ($9,5 \pm 1,3$) e PaMM ($9,0 \pm 2,3$) do NPV (Fig. 12A). Ainda, os ratos submetidos à EVEC e que receberam microinjeções de metisergida no NPBL apresentaram redução do número de neurônios ir-c-Fos-OT na PaMM ($5,2 \pm 0,8$) e na PaLM ($2,9 \pm 0,6$ vs. veículo: $6,2 \pm 1,8$), [F(2,9) = 4,7; $p < 0,03$] do NPV (Figs. 12B, 15 e 16). As Figs. 15 a 17 são fotomicrografias representativas das subdivisões do NPV e NSO (Fig. 14) evidenciando os neurônios ir-c-Fos-OT em animais microinjetados com veículo, metisergida e DOI no NPBL em resposta à EVEC.

Os ratos submetidos à EVEC que receberam injeções de metisergida no NPBL apresentaram aumento no número de neurônios ir-c-Fos-AVP na subdivisão PaLM ($9,6 \pm 1,2$ vs. veículo: $2,8 \pm 0,4$), [F(2,9) = 30,3; $p < 0,0001$] do NPV (Fig. 13 e 19) e também no NSO ($13,0 \pm 1,2$ vs. veículo: $5,7 \pm 0,9$), [F(2,9) = 31,4; $p < 0,0001$] em comparação aos animais tratados com veículo (Fig. 13 e 18). Microinjeções de DOI no NPBL em ratos submetidos à EVEC reduziram o número de neurônios ir-c-Fos-AVP no núcleo supraóptico (NSO) ($3,7 \pm 0,3$ vs. veículo: $5,7 \pm 0,9$) (Fig. 13 e 19).

As Figs. 18 e 19 são fotomicrografias representativas da subdivisão LM do NPV e do NSO evidenciando os neurônios ir-c-Fos-AVP em animais microinjetados com veículo, metisergida e DOI no NPBL em resposta à EVEC.

O núcleo AC, a subdivisão PaLM do NPV e o NSO não apresentaram alterações significativas no número de neurônios ir-c-Fos em animais que receberam microinjeções de metisergida, DOI ou veículo no NPBL em resposta à EVEC. Além disso, não foram observadas alterações significativas no número de neurônios ir-c-Fos-OT no NSO de animais que receberam microinjeções de metisergida, DOI ou veículo no NPBL em resposta à EVEC.

Grupos controles para os procedimentos imunohistoquímicos

Foram utilizados como controles para os procedimentos imunohistoquímicos secções cerebrais ao nível do NPV e NSO de ratos submetidos aos seguintes tratamentos: a) somente à anestesia (tribromoetanol, 200 mg/kg de peso corporal); b) após cirurgia para implante de cânulas no NPBL; c) animais portadores de cânulas de silástico na veia jugular (e não submetidos à EVEC), (representados na Fig. 21) e d) animais submetidos às duas sobrecargas hídricas orais (5% peso corporal), (representados na Fig. 20). Os cérebros destes animais foram perfundidos e processados imunohistoquimicamente (para avaliar a imunorreatividade à proteína c-Fos dos neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos do NPV e NSO). A análise qualitativa da expressão de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos e ir-c-Fos-OT/AVP mostrou um baixo número de neurônios ir-c-Fos e semelhante ao encontrado nas imunomarcações para c-Fos obtidas em animais intactos. Além disso, as imunomarcações duplas ir-c-Fos-OT/AVP foram inferiores ou praticamente nulas em relação aos animais submetidos às manipulações farmacológicas do NPBL em resposta à EVEC.

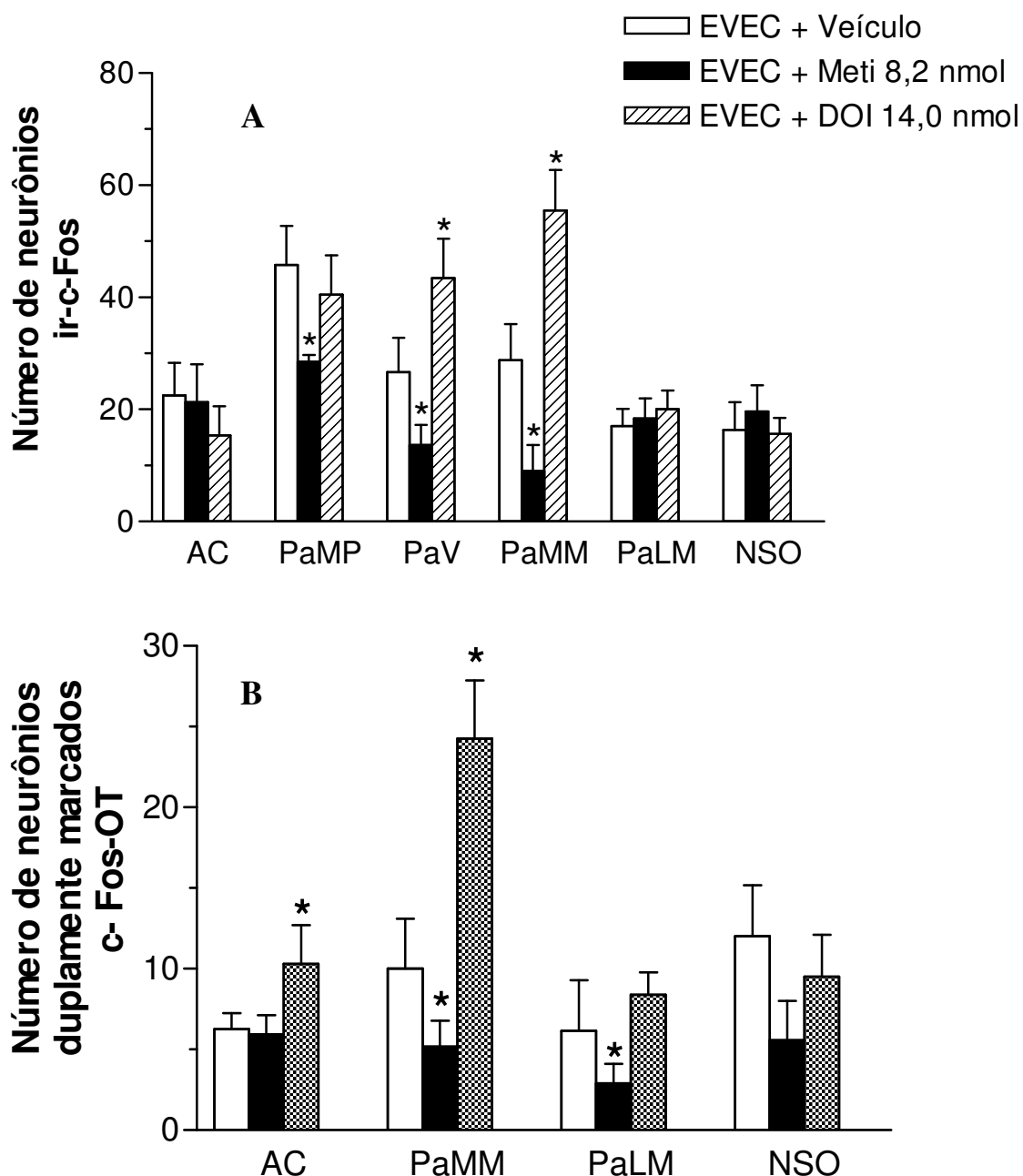


Fig. 12. (A): Número de neurônios imunorreativos (ir-) a proteína c-Fos e (B): número de neurônios ir-c-Fos-OT (ocitocina) nas diferentes subdivisões do núcleo paraventricular (Pa): núcleo comissural anterior (AC), subdivisão medial magnocelular (PaMM), subdivisão lateral magnocelular (PaLM), subdivisão medial parvocelular (PaMP), subdivisão parvocelular ventral (PaV) e núcleo supraóptico (NSO) do hipotálamo em ratos submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) que receberam injeções bilaterais de metisergida (Meti, 8,2 nmol), hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 14,0 nmol) ou veículo no núcleo parabraquial lateral (NPBL). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo; $n = 4$ por grupo.

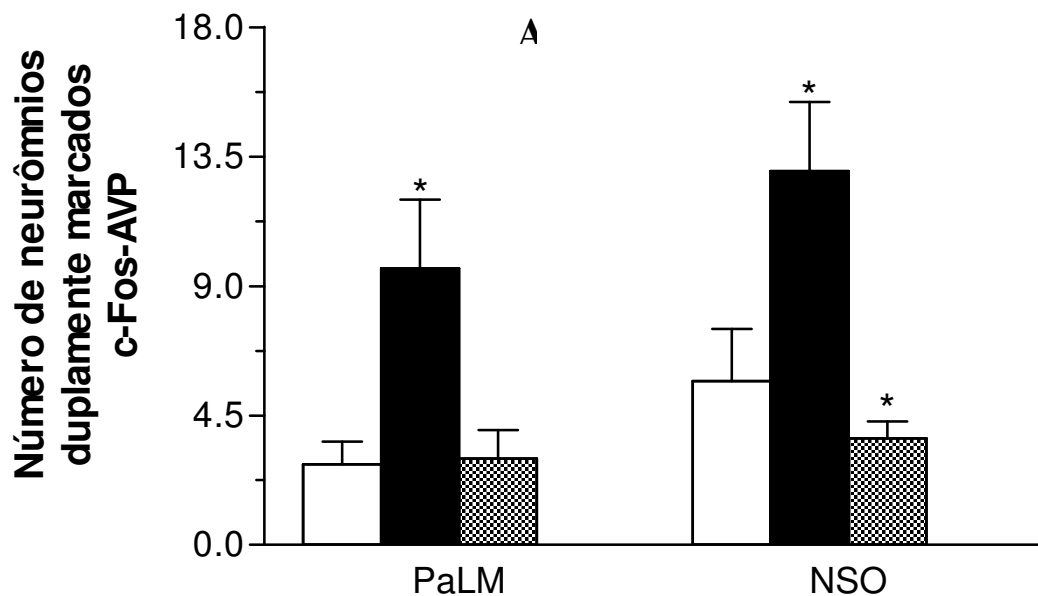


Fig. 13. Número de neurônios imunorreativos (ir-) à proteína c-Fos-AVP (vasopressina) na subdivisão lateral magnocelular (PaLM) do núcleo paraventricular (Pa) e núcleo supra-óptico (NSO) do hipotálamo em ratos submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) e que receberam injeções bilaterais de metisergida (Meti, 8,2 nmol), hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 14,0 nmol) ou veículo no núcleo parabraquial lateral (NPBL). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo; $n = 4$ por grupo.

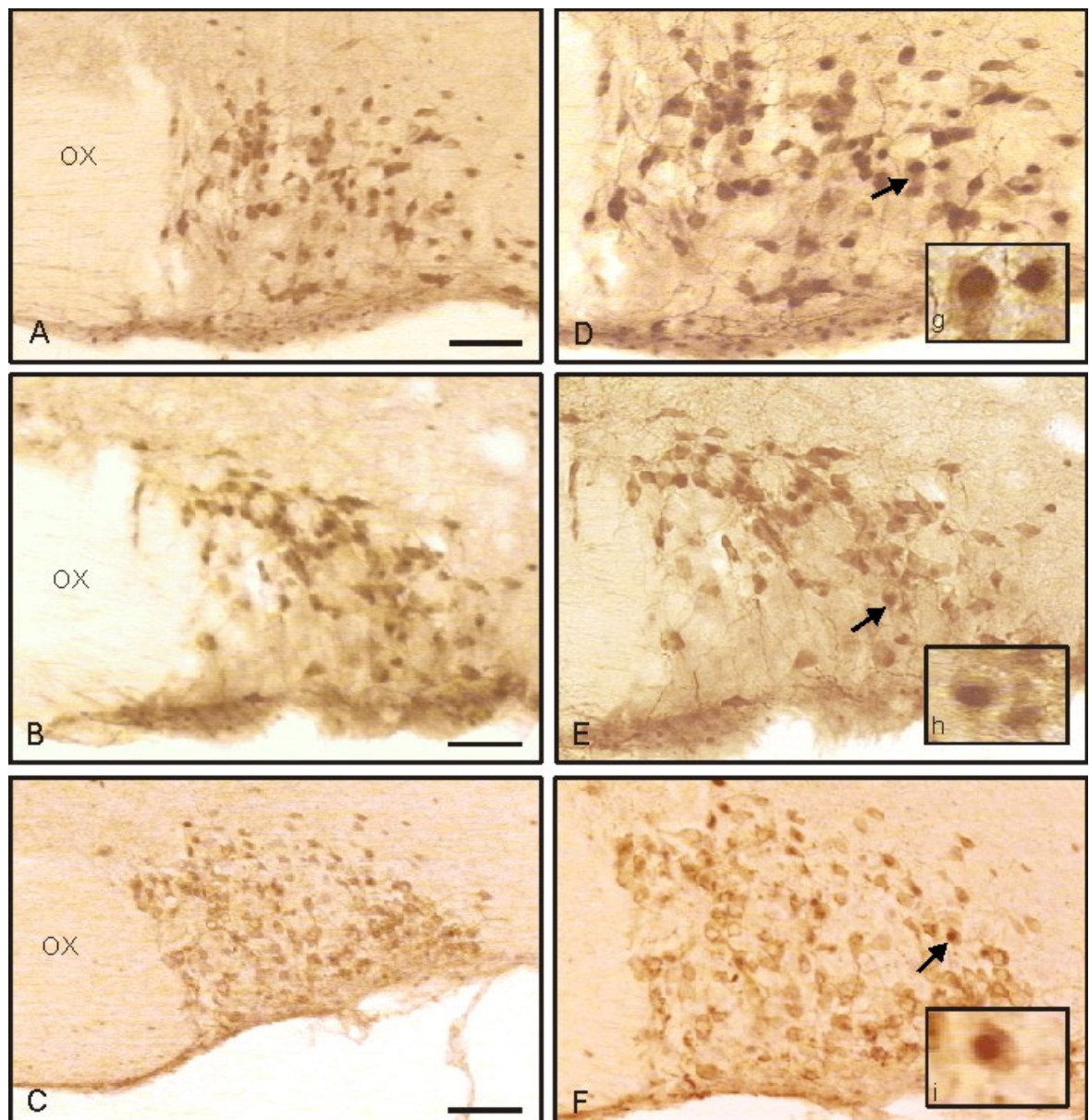


Fig. 14. Fotomicrografias de seções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunoreatividade dupla c-Fos e ocitocina (OT) no núcleo supra-óptico (NSO) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes das duplas marcações indicadas pelas setas. OX, quiasma óptico. Escala da barra = 100 μ m.

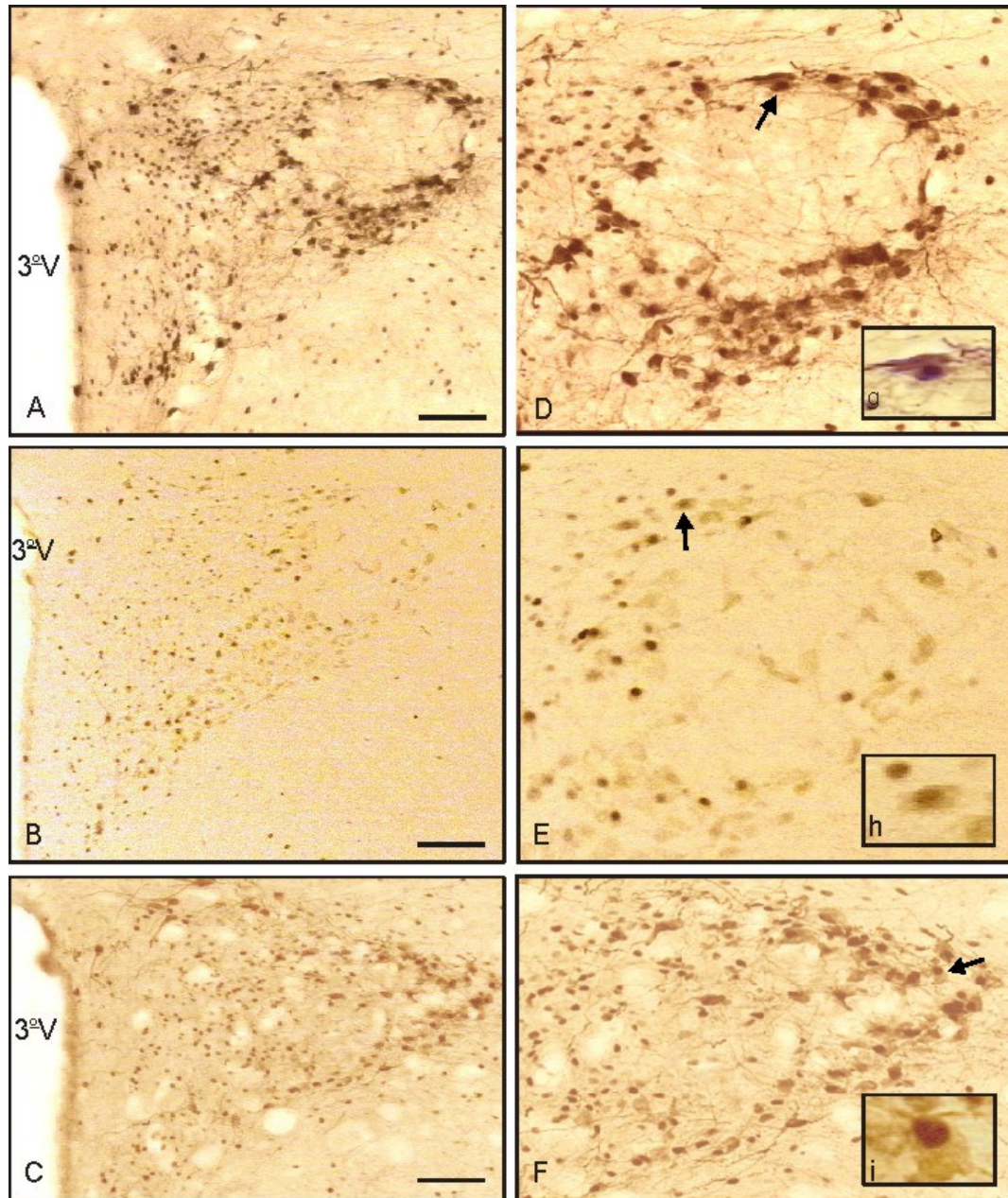


Fig. 15. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunorreatividade dupla c-Fos e ocitocina (OT) na subdivisão lateral magnocelular (PaLM) do núcleo paraventricular (NPV) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes das duplas marcações indicadas pelas setas. 3V, terceiro ventrículo. Escala da barra = 100 μ m.

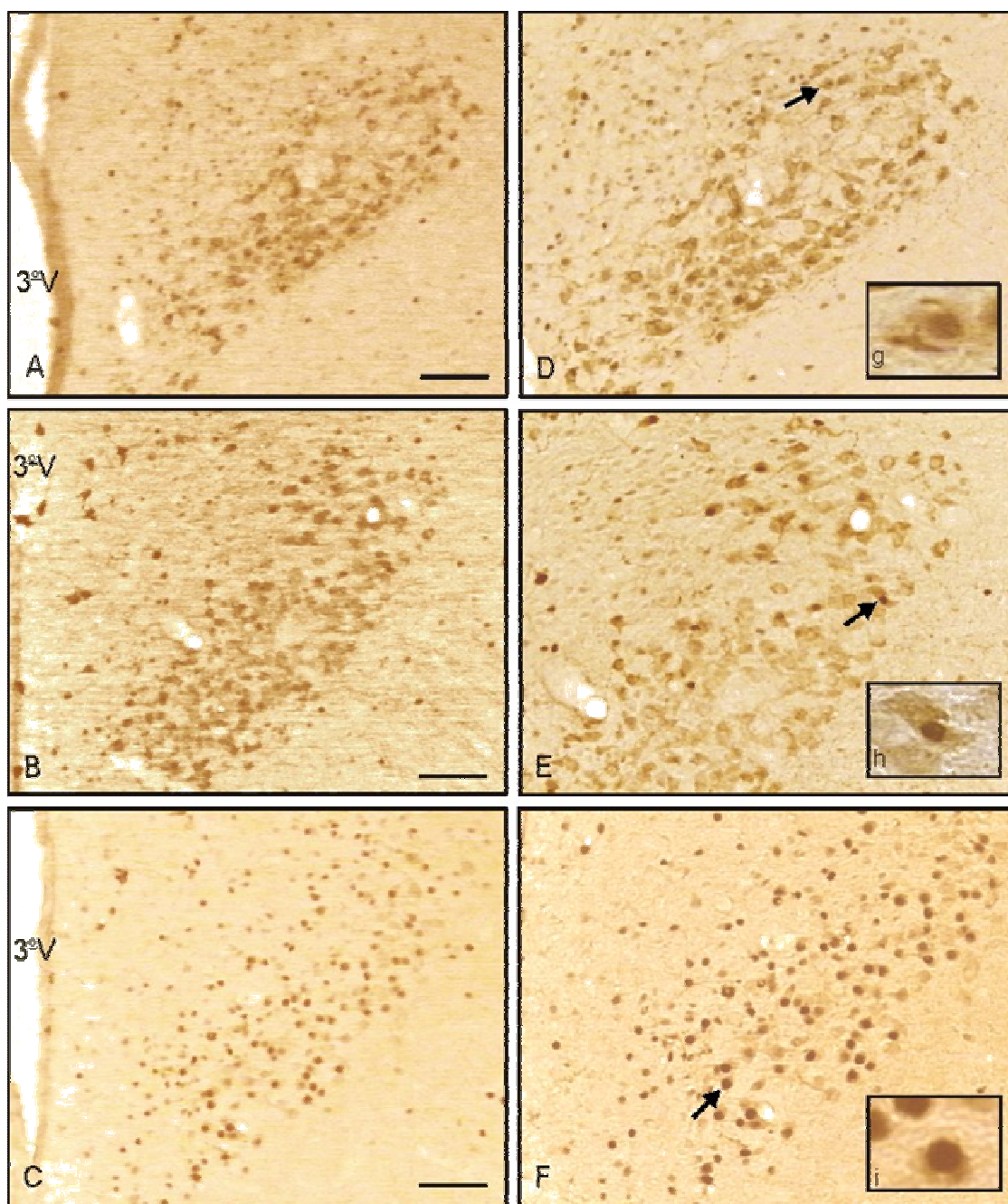


Fig. 16. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunorreatividade dupla c-Fos e ocitocina (OT) na subdivisão medial magnocelular (PaMM) do núcleo paraventricular (NPV) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes das duplas marcações indicadas pelas setas. 3V, terceiro ventrículo. Escala da barra = 100 μ m.

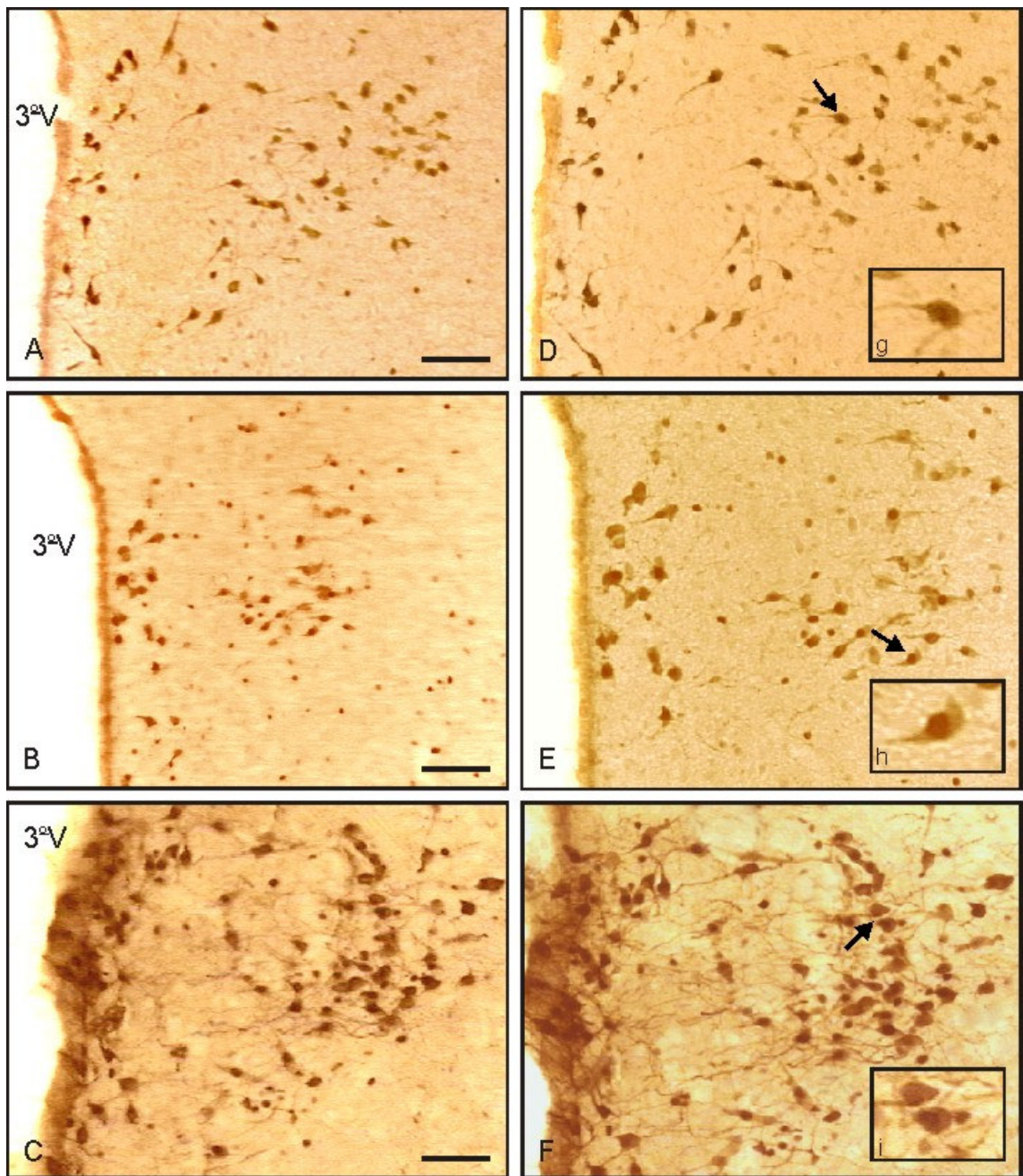


Fig. 17. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunorreatividade dupla c-Fos e ocitocina (OT) no núcleo acessório comissural anterior (AC) do núcleo paraventricular (NPV) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes das duplas marcações indicadas pelas setas. 3V, terceiro ventrículo. Escala da barra = 100 µm.

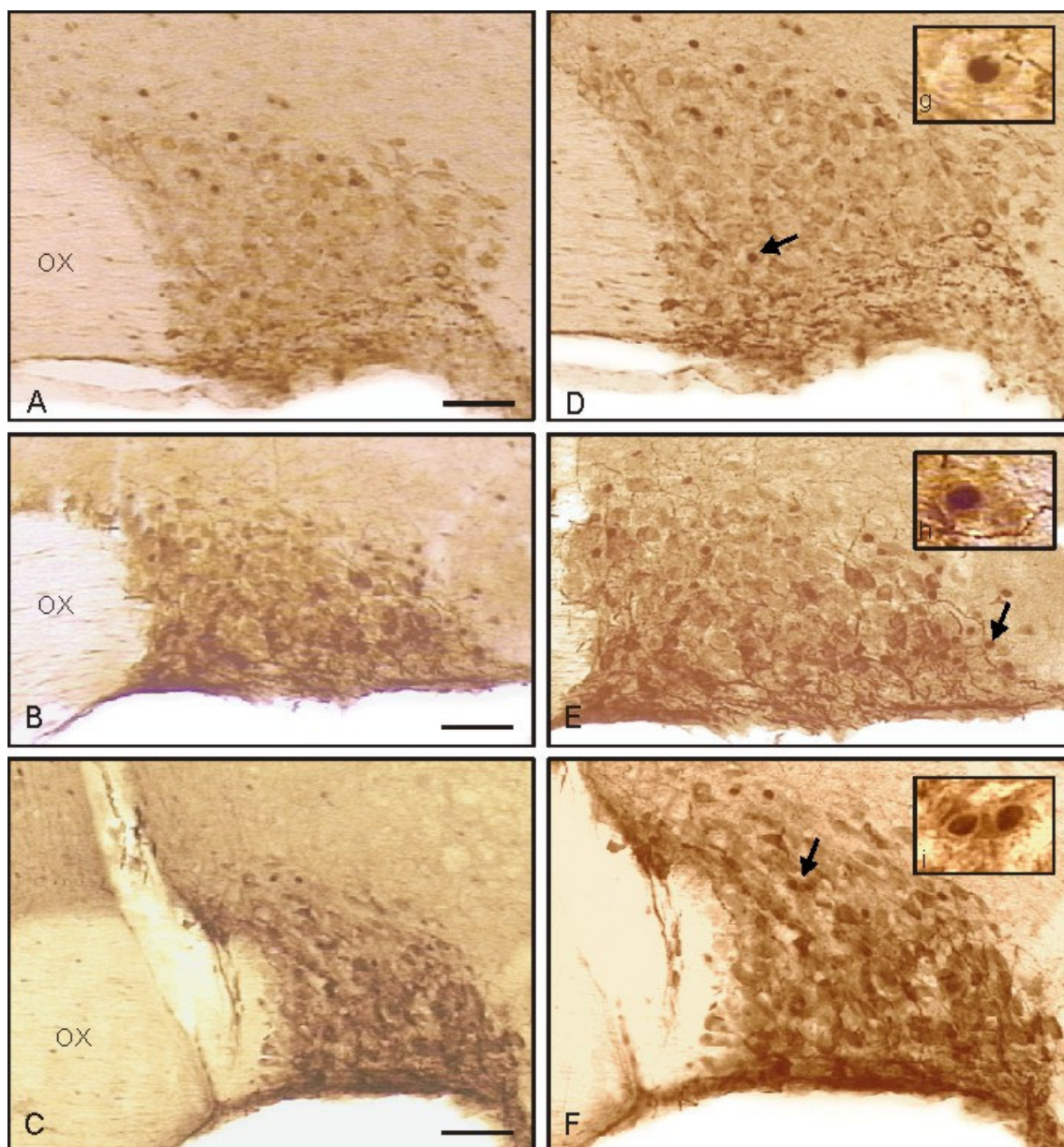


Fig. 18. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunorreatividade dupla c-Fos e vasopressina (AVP) no núcleo supra-óptico (NSO) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes das duplas marcações indicadas pelas setas. OX, quiasma óptico. Escala da barra = 100 μ m.

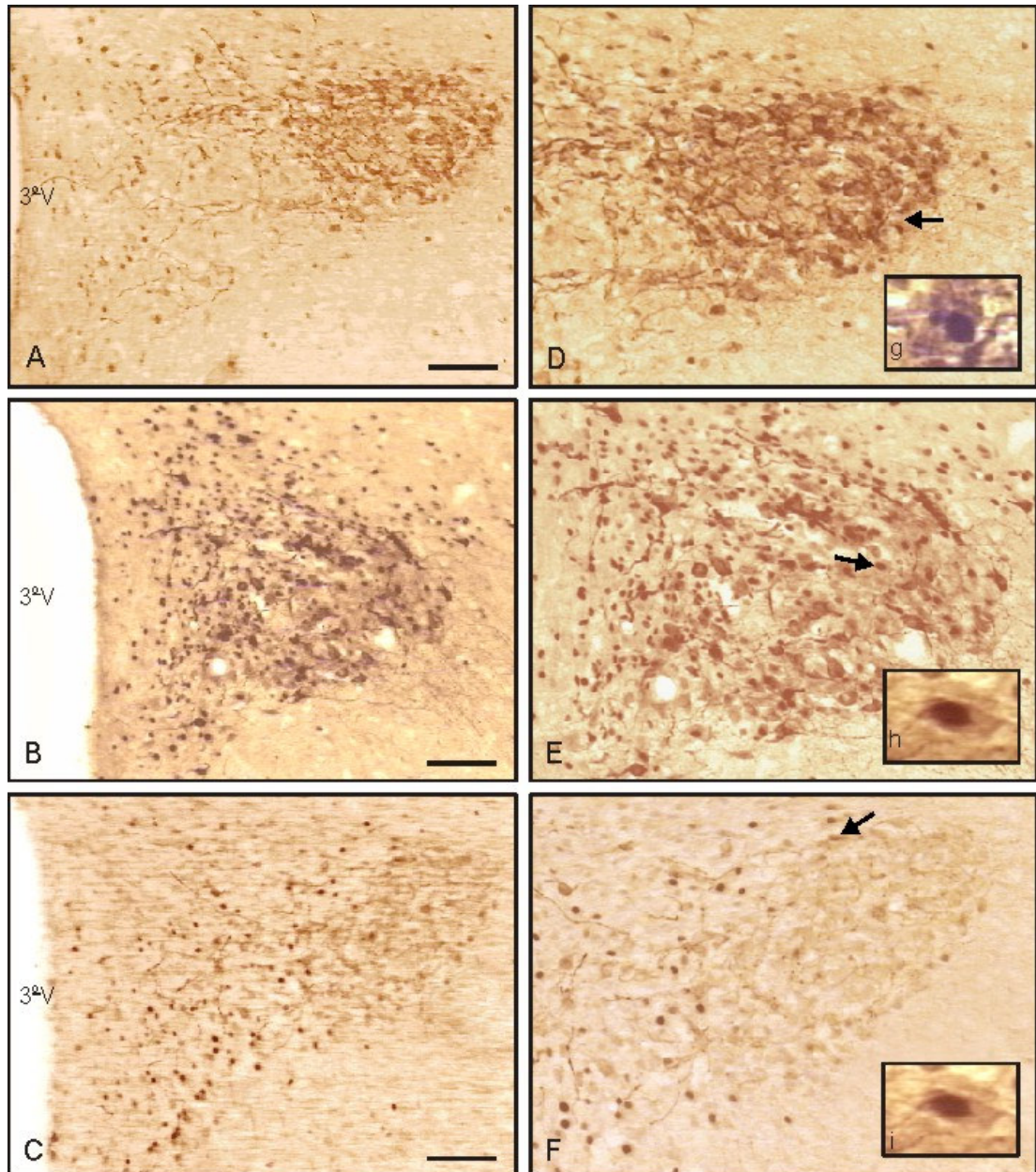


Fig. 19. Fotomicrografias de seções coronais representativas dos animais estudados mostrando imunorreatividade dupla c-Fos e vasopressina (AVP) na subdivisão lateral magnocelular (PaLM) do núcleo paraventricular (NPV) em ratos que receberam injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo (A e D); metisergida, 8,2 nmol (B e E) e DOI, 14,0 nmol (C e F) e submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A, B e C estão em aumento de 10X. Em D, E e F as fotomicrografias estão ampliadas 20X. As fotos g, h e i (aumento 40X) são detalhes das duplas marcações indicadas pelas setas. 3V, terceiro ventrículo. Escala da barra = 100 μ m.

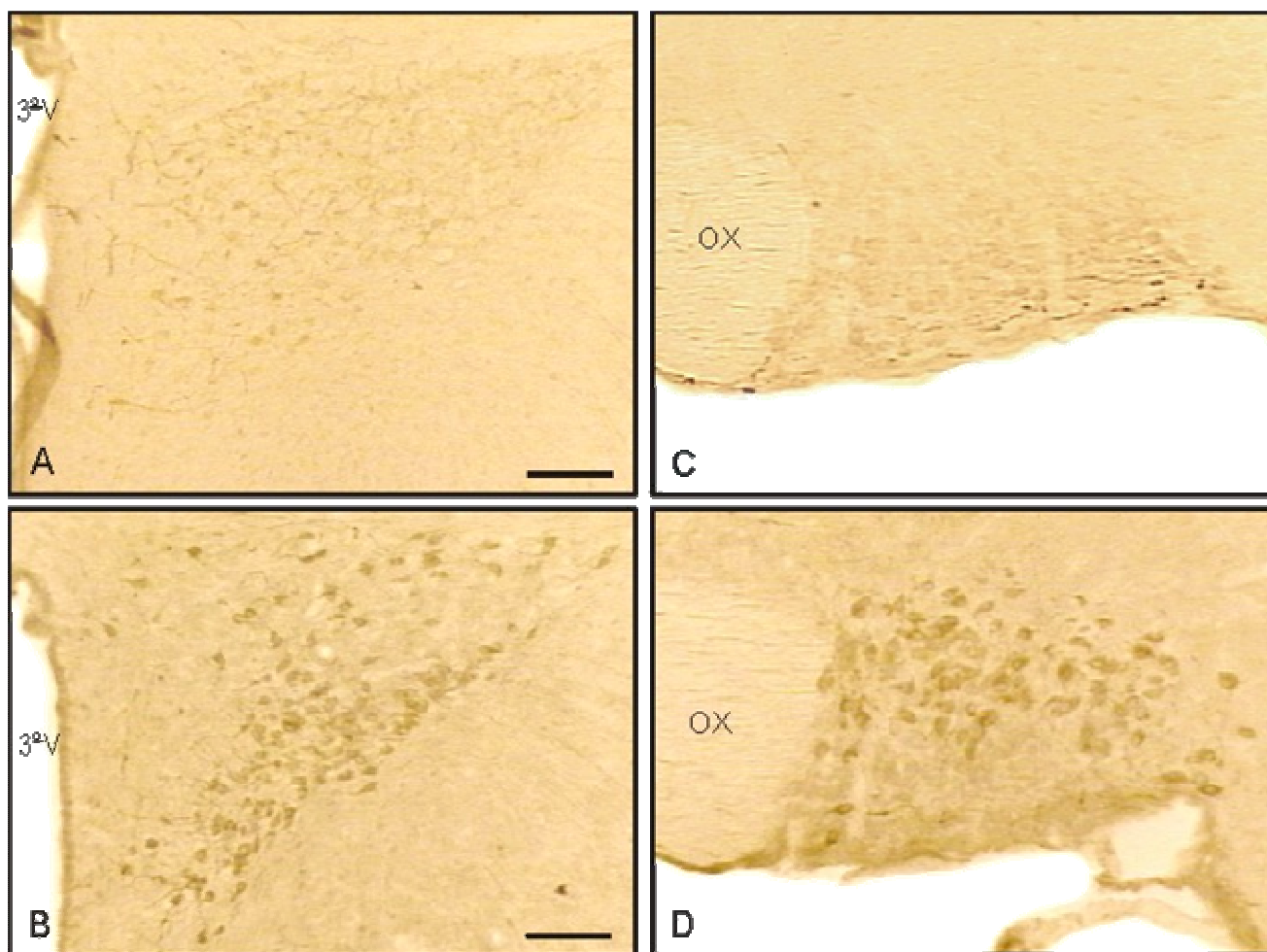


Fig. 20. Fotomicrografias de secções coronais mostrando a imunorreatividade à proteína c-Fos dos neurônios vasopressinérgicos (A e C) e ocitocinérgicos (B e D) da subdivisão lateral magnocelular (LM) do núcleo paraventricular (NPV, A e B) e núcleo supraóptico (NSO, C e D) em ratos que receberam duas sobrecargas hídricas orais (5% peso corporal) com intervalo de 1 hora entre elas. As fotomicrografias A e B tem aumento de 10X; C e D tem aumento de 20X. Escala da barra = 100 μ m. 3^ºV, terceiro ventrículo; OX, quiasma óptico.

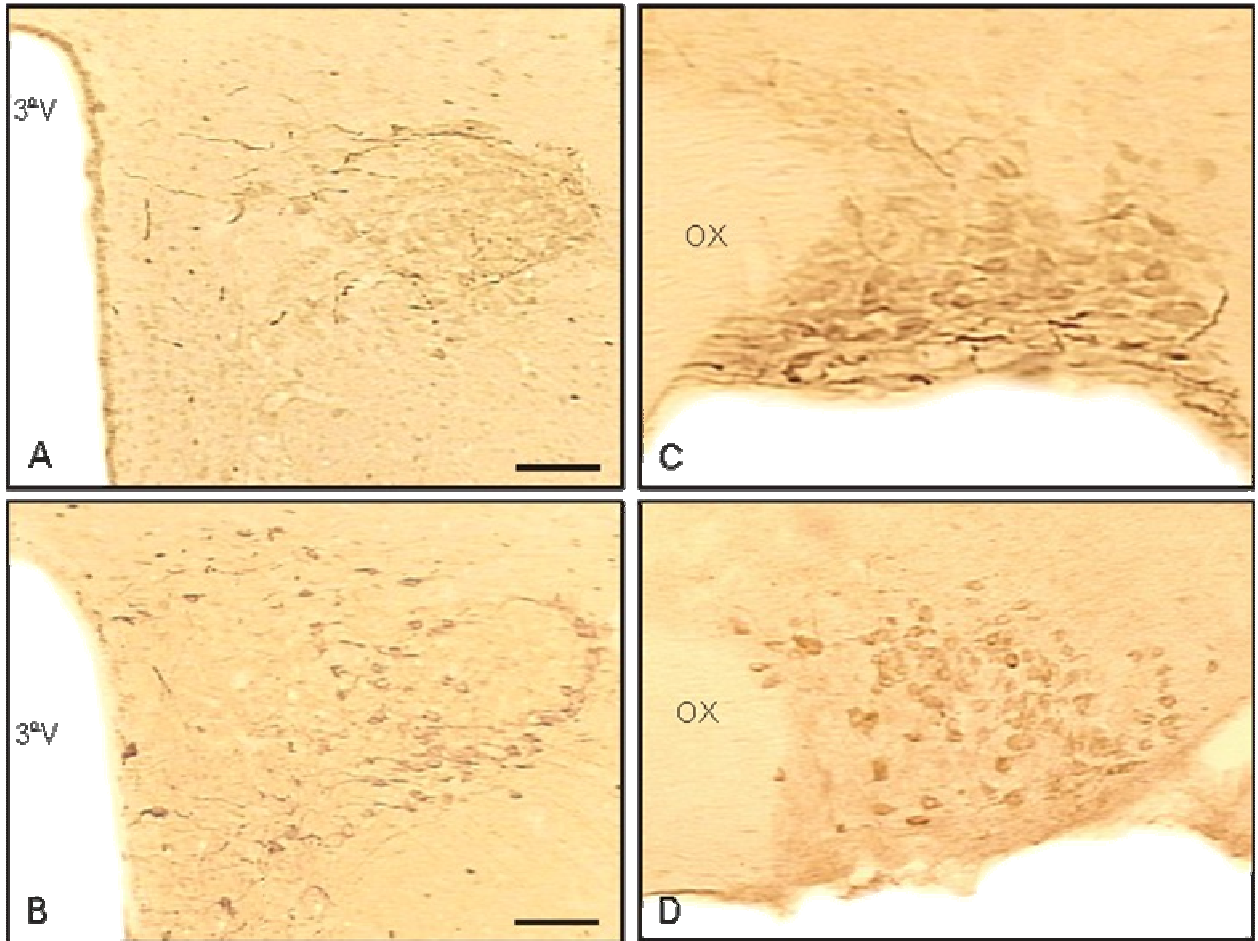


Fig. 21. Fotomicrografias de secções coronais mostrando a imunorreatividade à proteína c-Fos dos neurônios vasopressinérgicos (A e C) e ocitocinérgicos (B e D) da subdivisão lateral magnocelular (LM) do núcleo paraventricular (NPV, A e B) e núcleo supraóptico (NSO, C e D) em ratos apresentando apenas a cânula de silástico na veia jugular e não submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias A e B tem aumento de 10X; C e D tem aumento de 20X. Escala da barra = 100 μ m. 3V, terceiro ventrículo; OX, quiasma óptico.

F) Identificar os grupos neuronais de áreas prosencefálicas e do tronco cerebral imunorreativos à proteína c-Fos em resposta ao estímulo agudo da EVEC e que se conectam ao NPBL.

Uma vez realizada a injeção do fluorogold (FG) no NPBL, este é captado pelas terminações dos axônios e caminha por via retrógrada até o corpo celular do neurônio. Desta forma, em nossos experimentos, quando a área mantém conexões com o NPBL verifica-se o FG no seu corpo celular, bem como nos axônios e dendritos. Esta marcação é citoplasmática. Na dupla marcação (c-Fos-FG) nota-se marcações tanto no núcleo (Fos) quanto no citoplasma (FG). As injeções iontoforéticas de FG, como a que se observa na Fig. 24 foram feitas principalmente nas porções central e dorso-lateral do NPBL (Fulwiler e Saper, 1984).

Em ratos submetidos à EVEC isotônica e previamente microinjetados com FG no NPBL ocorreu um aumento do número de neurônios imunorreativos (ir-) à proteína-c-Fos no NTS ($29,0 \pm 4,8$ vs. sem EVEC: $12,6 \pm 3,2$) e no número de neurônios ir-c-Fos-FG ($5,3 \pm 1,2$ vs. sem EVEC: $0,5 \pm 0,5$), (Figs. 22 A e B e 25). No NDR houve aumento do número de neurônios ir-c-Fos ($17,0 \pm 1,9$ vs. sem EVEC: $6,6 \pm 1,2$) e no número de neurônios ir-c-Fos-FG ($4,7 \pm 0,5$ vs. sem EVEC: $0,5 \pm 0,3$) em resposta à EVEC (Figs. 22 A e B e 26). No locus coeruleus (LC) houve aumento apenas no número de neurônios ir-c-Fos-FG ($2,6 \pm 0,3$ vs. sem EVEC: $0,3 \pm 0,3$) (Figs. 22 B e 27) sem alterações no número de neurônios ir-c-Fos entre os ratos submetidos ou não à EVEC (Fig 22 A).

Em áreas prosencefálicas, os ratos previamente microinjetados com FG no NPBL e submetidos à EVEC isotônica, apresentaram aumento no número de neurônios ir-c-Fos no NPV (subdivisão ventral - que é caracterizada por apresentar neurônios de projeções não endócrinas) ($30,6 \pm 1,8$ vs. sem EVEC: $13,2 \pm 1,6$) e no número de neurônios ir-c-Fos-FG ($4,8 \pm 0,5$ vs. sem EVEC: $0,7 \pm 0,3$) (Figs. 23 A, B e 31). Além disso, houve aumento no número de neurônios ir-c-Fos na divisão dorsal do núcleo da estria terminal (BST) ($21,5 \pm 1,6$ vs. sem EVEC: $7,5 \pm 0,3$) e no número de neurônios ir-Fos-FG ($3,2 \pm 0,3$ vs. sem EVEC: $0,3 \pm 0,3$) em resposta à EVEC (Figs. 23 A, B e 30). O núcleo central da amígdala (ACe) também apresentou aumento no número de neurônios ir-c-Fos ($25,0 \pm 2,0$ vs. sem EVEC: $7,5 \pm 0,3$) e no número de neurônios ir-c-Fos-FG ($5,2 \pm 0,2$ vs. sem EVEC: $0,3 \pm 0,3$) em resposta à EVEC (Figs. 23 A e B e 29).

A Fig. 32 mostra um neurônio ocitocinérgico marcado com fluoresceína e que se apresenta co-localização de ocitocina (marcação citoplasmática) com a proteína c-Fos (nuclear) (revelado com DAB) e visualizado em campo claro. Qualitativamente, esta

imunomarcção confirma os resultados anteriormente obtidos, mostrando que os neurônios ocitocinérgicos são ativados e participam dos mecanismos de controle em resposta à EVEC. A Fig. 28 também evidencia, qualitativamente, um neurônio que apresenta o padrão de imunorreatividade tripla: proteína c-Fos-FG-5HT no NDR. Este padrão de marcação sugere que os neurônios serotoninérgicos do NDR foram ativados em resposta à EVEC e se conectam diretamente ao NPBL.

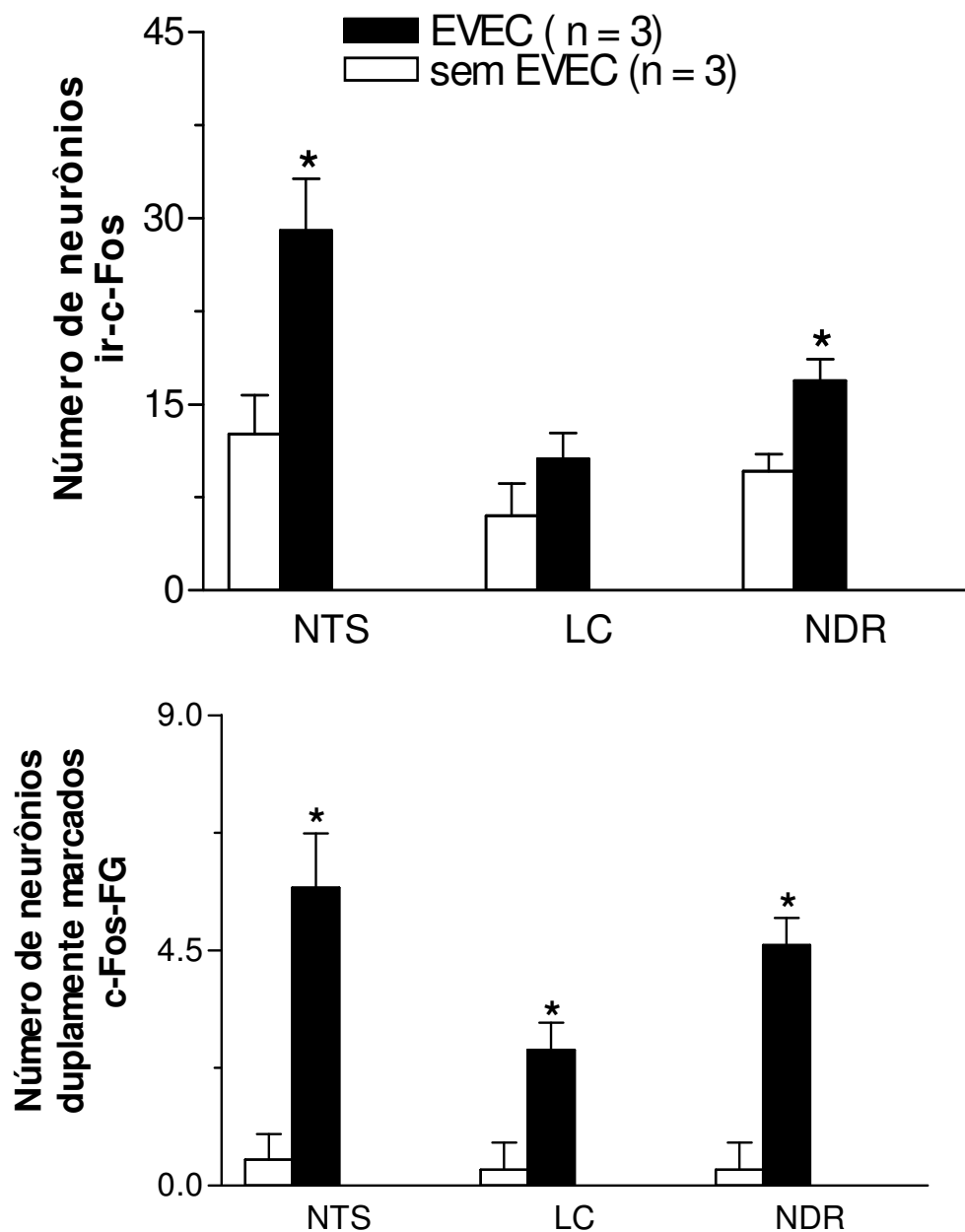


Fig. 22. (A): Número de neurônios imunorreativos (ir-) a proteína c-Fos e (B): neurônios duplamente marcados com a proteína c-Fos-FG (Fluorogold) em áreas do tronco cerebral: núcleo do trato solitário (NTS, porção adjacente a área postrema), locus coeruleus (LC) e o núcleo dorsal da rafe (NDR). Os animais foram previamente (7 dias antes) injetados com FG no núcleo parabraquial lateral (NPBL) e submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) (NaCl 0,15 M). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. sem EVEC.

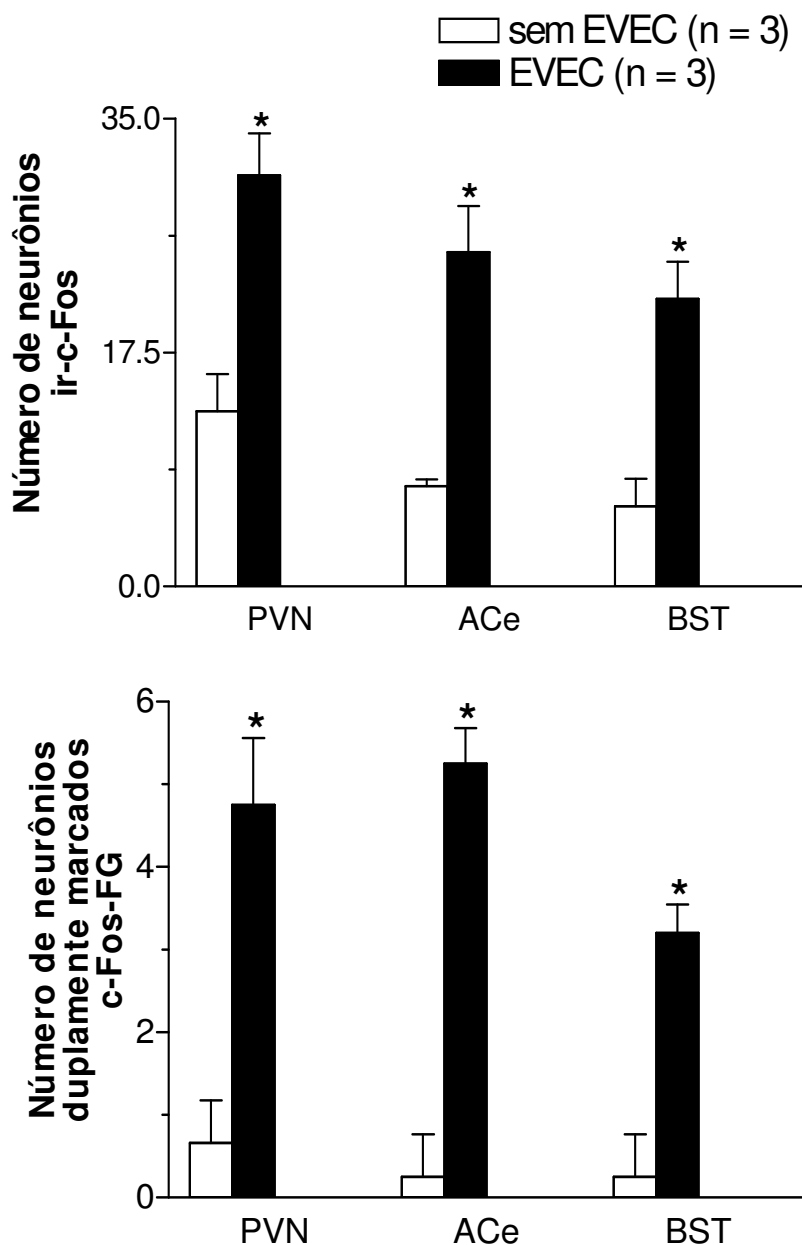


Fig. 23. (A): Número de neurônios imunorreativos (ir-) a proteína c-Fos e (B): neurônios duplamente marcados com a proteína c-Fos-FG (Fluorogold) em áreas prosencefálicas: núcleo paraventricular (NPV, porção ventral), o núcleo central da amígdala (ACe) e o núcleo da estria terminal (BST, parte dorsal). Os animais foram previamente (7 dias antes) microinjetados com FG no núcleo parabraquial lateral (NPBL) e submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC) (NaCl 0,15 M). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. sem EVEC.

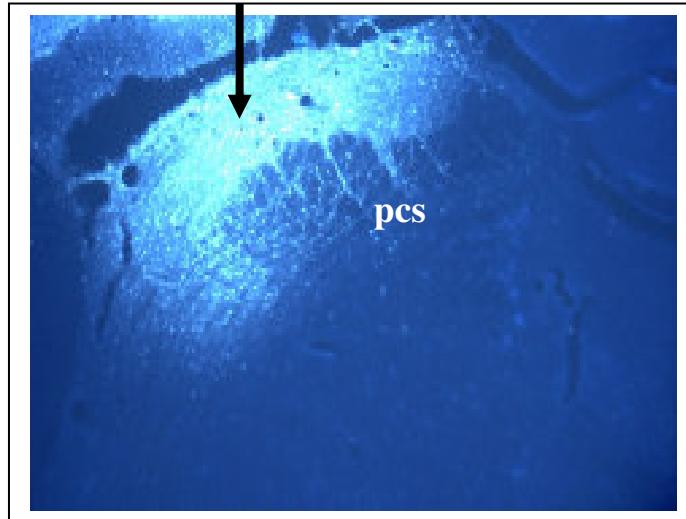


Fig. 24. A seta indica o sítio de injeção de fluorogold no NPBL. A deposição iontoforética limitou-se a porção acima do pedúnculo cerebelar superior (pcs)

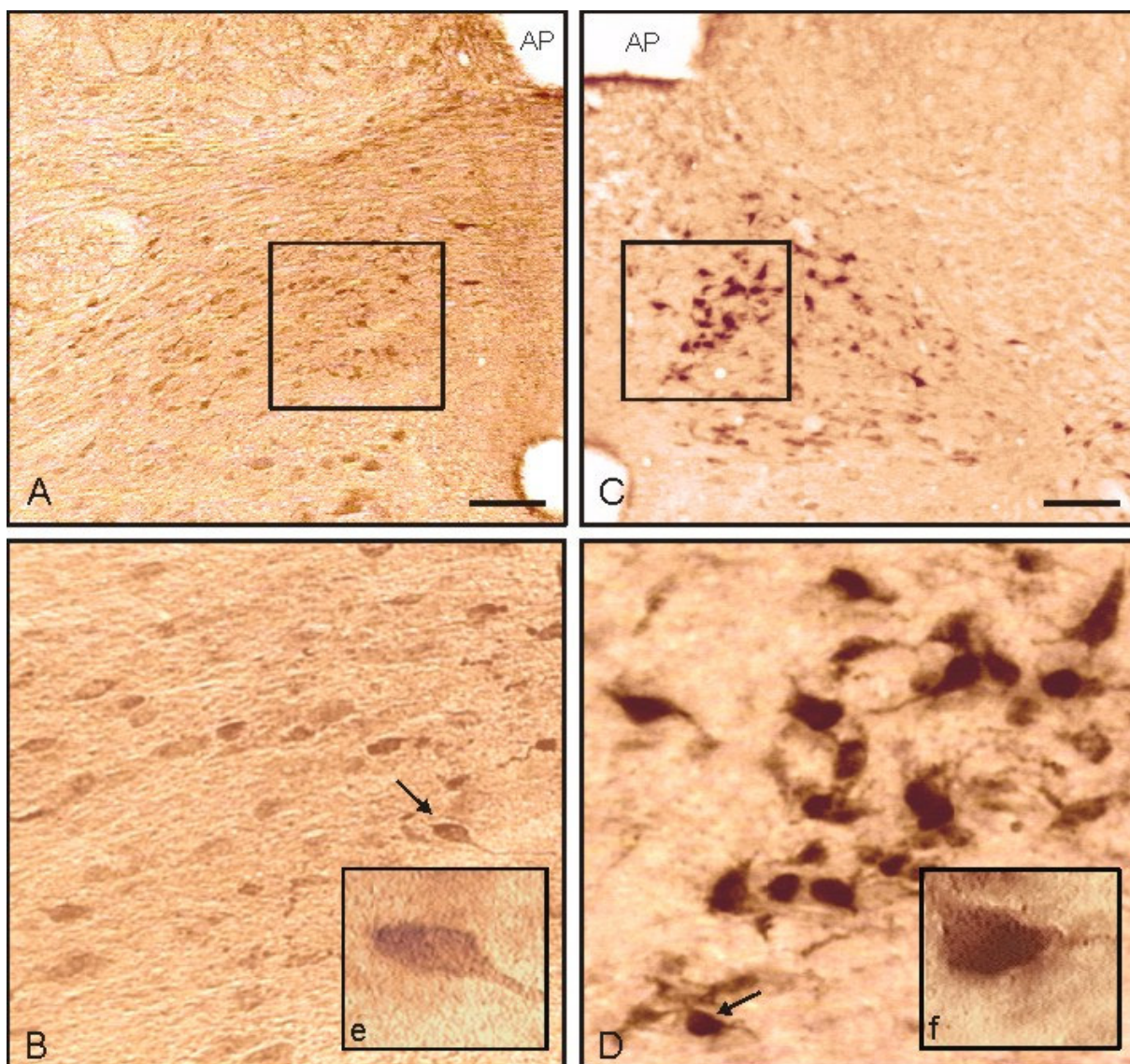


Fig. 25. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos e ao Fluorogold (FG) dos neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), porção adjacente à área postrema (AP), após 7 dias da injeção iontoforética deste marcador retrógrado aplicado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) em animais submetidos ou não à expansão do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A e B são representativas dos animais sem a EVEC (controles) (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotomicrografias dos painéis C e D são representativos dos animais submetidos à EVEC (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotos *e* e *f* (ampliadas 60X) são detalhes do neurônios indicados pelas setas apresentando somente FG (*e*) ou colocalizados com c-Fos-FG (*f*). Escala da barra = 100 μ m.

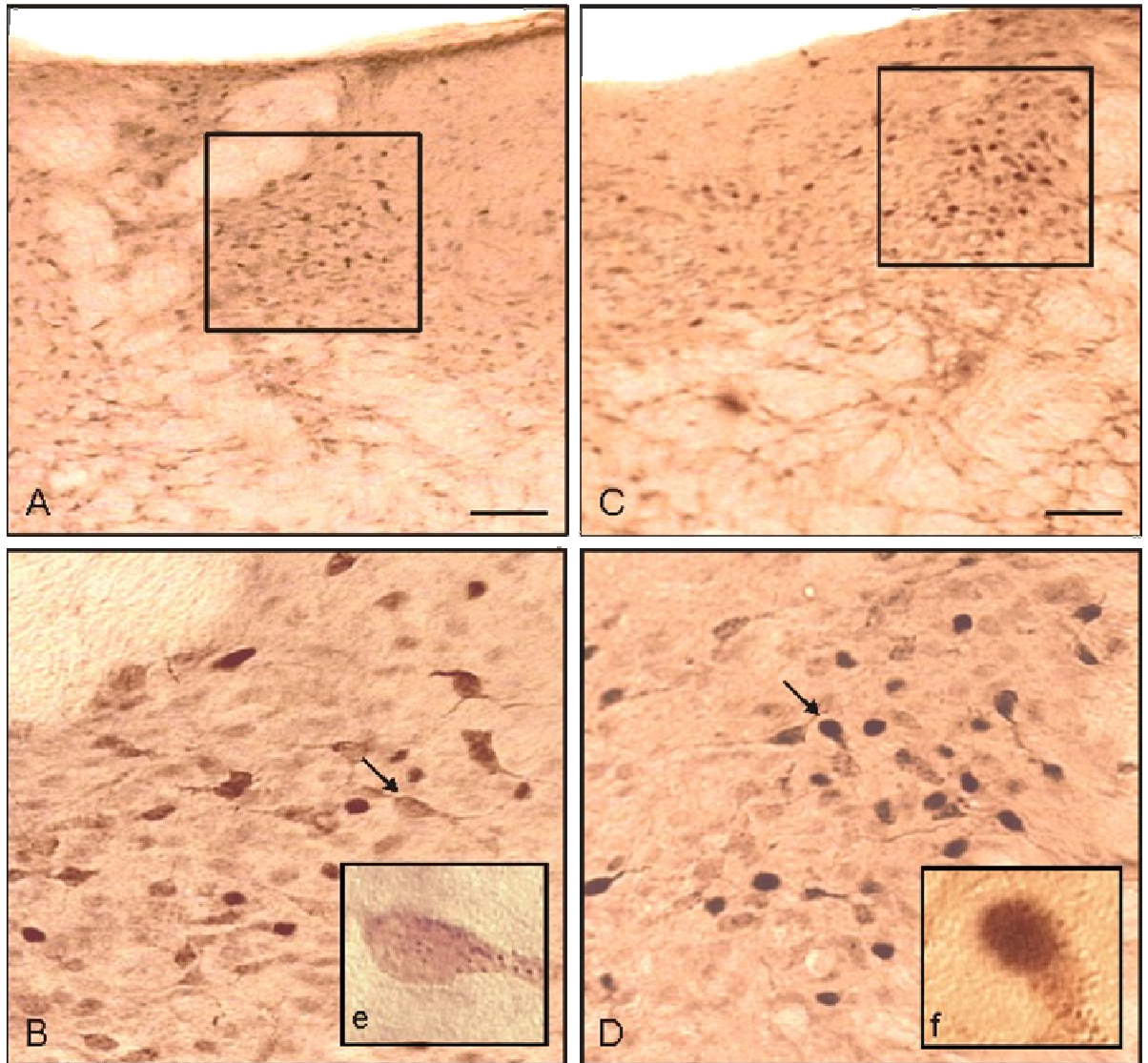


Fig. 26. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos e ao Fluorogold (FG) dos neurônios do locus coeruleus (LC) após 7 dias da injeção iontoforética deste marcador retrógrado aplicado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) em animais submetidos ou não à expansão do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A e B são representativas dos animais sem a EVEC (controles) (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotomicrografias dos painéis C e D são representativas dos animais submetidos à EVEC (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotos *e* e *f* (ampliadas 60X) são detalhes dos neurônios indicados pelas setas apresentando somente FG (*e*) ou colocalizadas com c-Fos-FG (*f*). Escala da barra = 100 μ m.

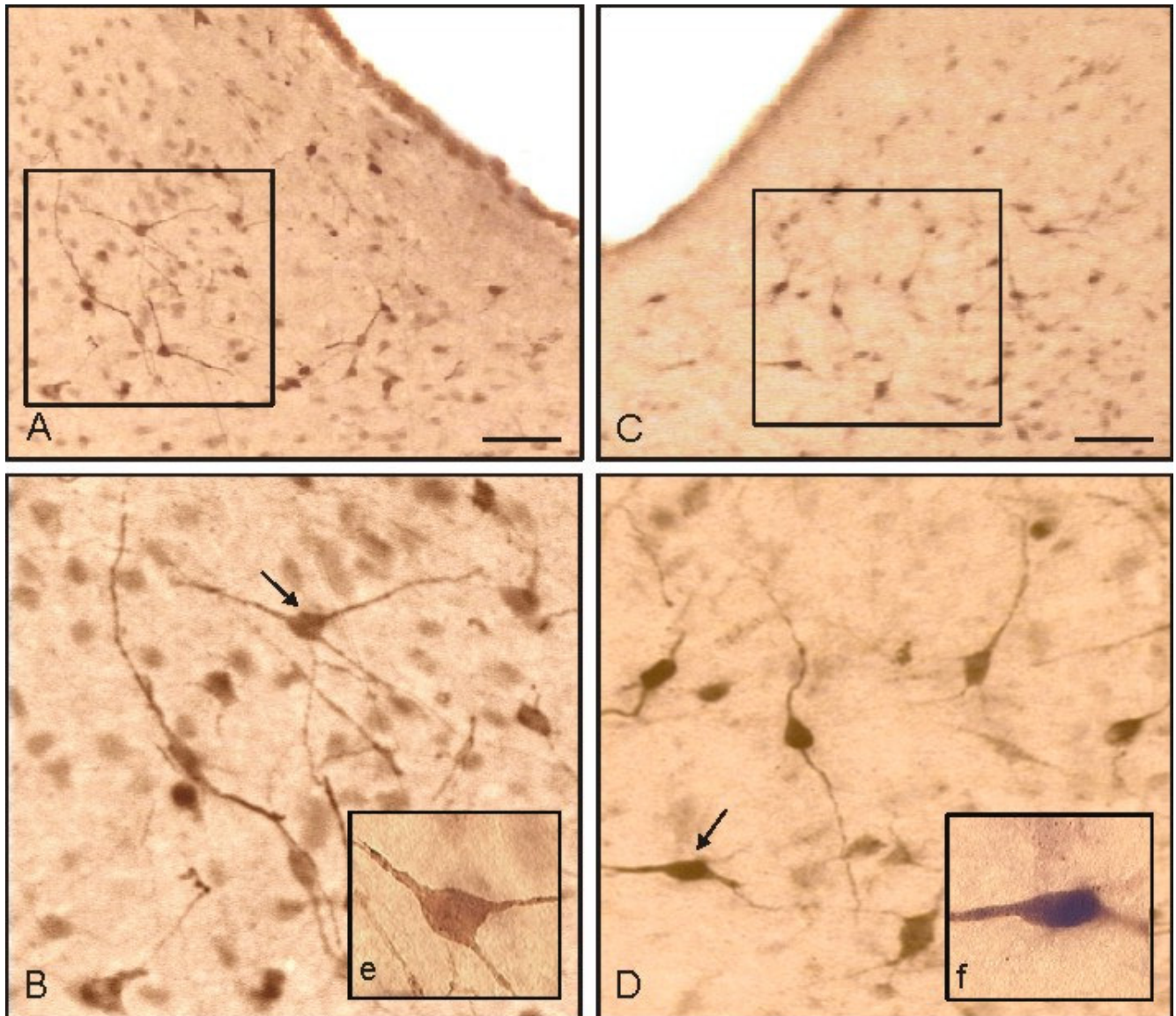


Fig. 27. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos e ao Fluorogold (FG) dos neurônios do núcleo dorsal da rafe (NDR) mostrando o padrão de imunorreatividade dos neurônios à proteína c-Fos e ao Fluorogold (FG) após 7 dias da injeção iontoforética deste marcador retrógrado aplicado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) em animais submetidos ou não à expansão do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A e B são representativas dos animais sem a EVEC (controles) (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotomicrografias dos painéis C e D são representativas dos animais submetidos à EVEC (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotos *e* e *f* (ampliadas 60X) são detalhes do neurônios indicados pelas setas apresentando somente FG (*e*) ou colocalizadas com c-Fos-FG (*f*). Escala da barra = 100 μ m.

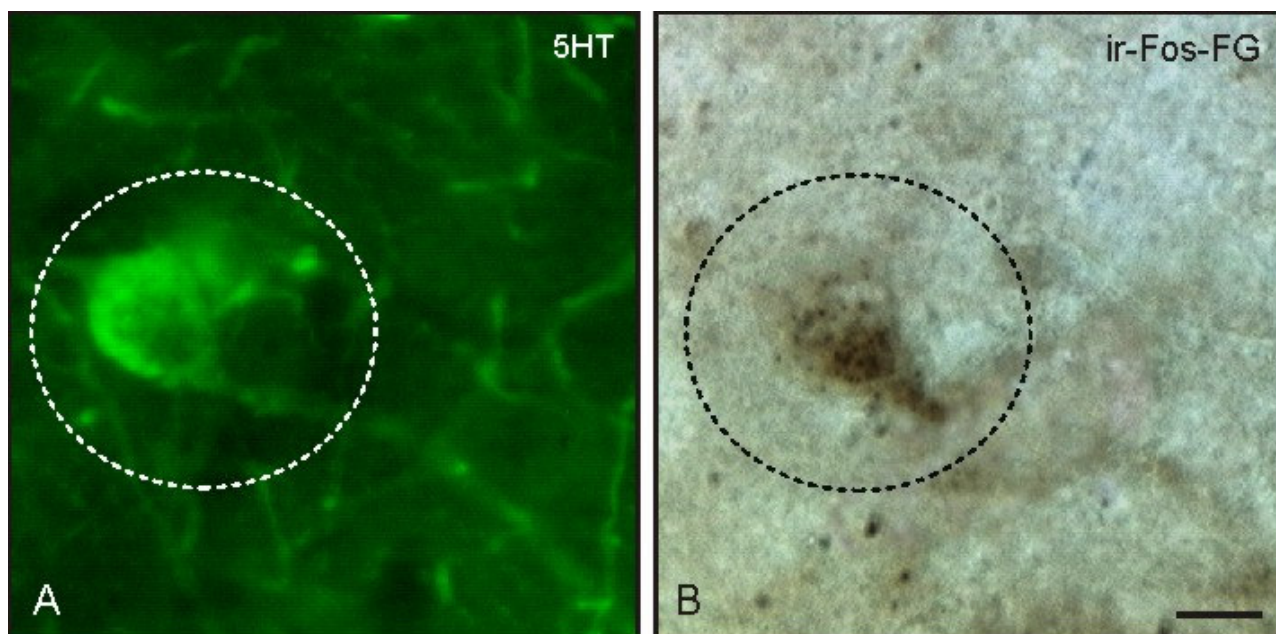


Fig. 28. Fotomicrografias de secções coronais ao nível do núcleo dorsal da rafe (NDR) mostrando o padrão de imunorreatividade tripla à proteína c-Fos-Fluorogold (FG)-serotonina (5HT) após 7 dias da injeção iontoforética deste marcador retrógrado aplicado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) em animais submetidos à expansão de volume do líquido extracelular (EVEC). Em A, o neurônio evidenciado pelo círculo branco representa a marcação citoplasmática da 5HT observada com o filtro de fluorescência (aumento de 40X). Em B visualizamos o mesmo neurônio evidenciado pelo círculo negro mostrando o padrão de imunorreatividade da dupla c-Fos-FG observado em campo claro (aumento de 40X). Escala da barra = 400 μ m.

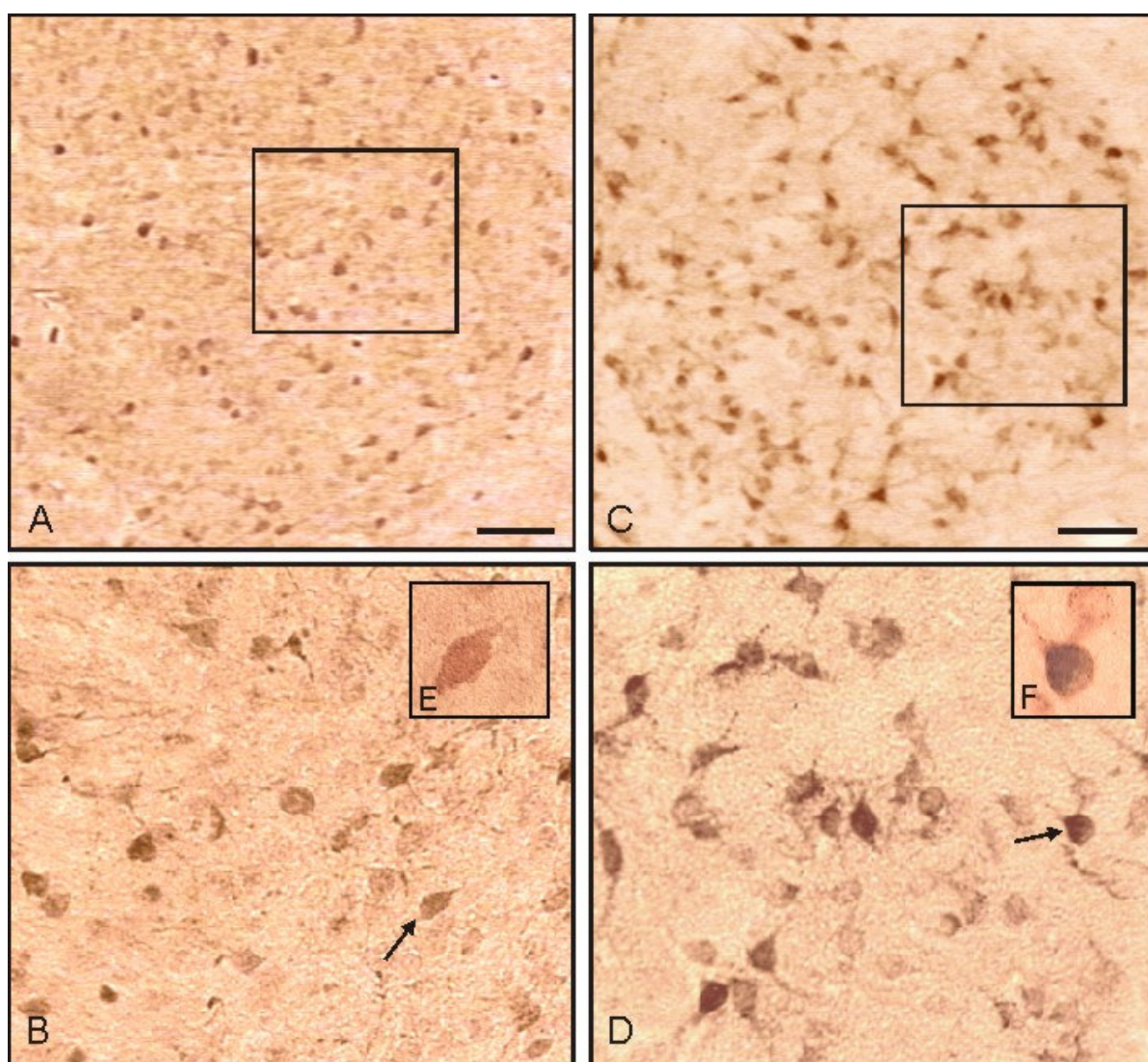


Fig. 29. Fotomicrografias de secções coronais representativas dos animais estudados mostrando o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos e ao Fluorogold (FG) dos neurônios da amígdala central (ACe) após 7 dias da injeção iontoforética deste marcador retrógrado aplicado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) em animais submetidos ou não à expansão do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A e B são representativas dos animais sem a EVEC (controles) (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotomicrografias dos painéis C e D são representativos dos animais submetidos à EVEC (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotos *e* e *f* (ampliadas 60X) são detalhes dos neurônios indicados pelas setas apresentando somente FG (*e*) ou colocalizadas com c-Fos-FG (*f*). Escala da barra = 100 μ m.

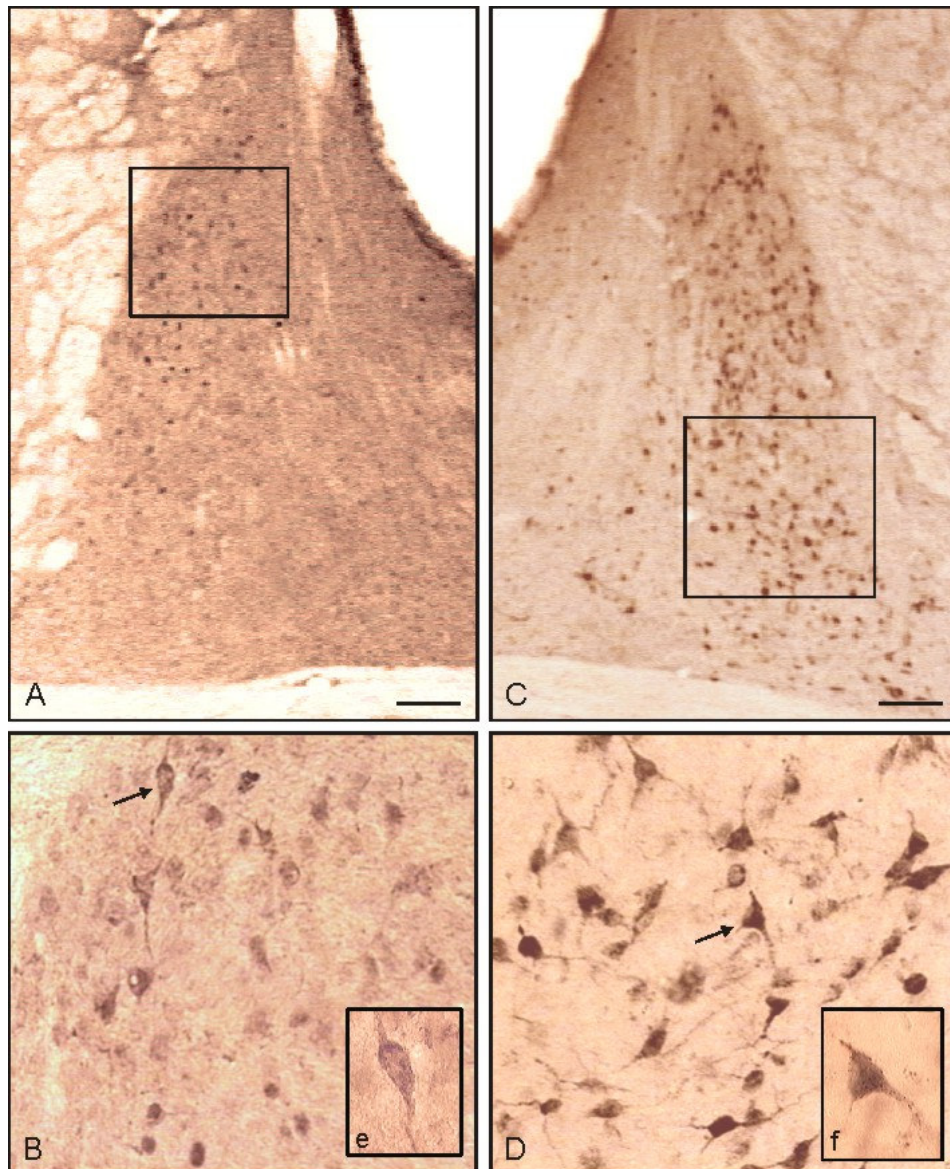
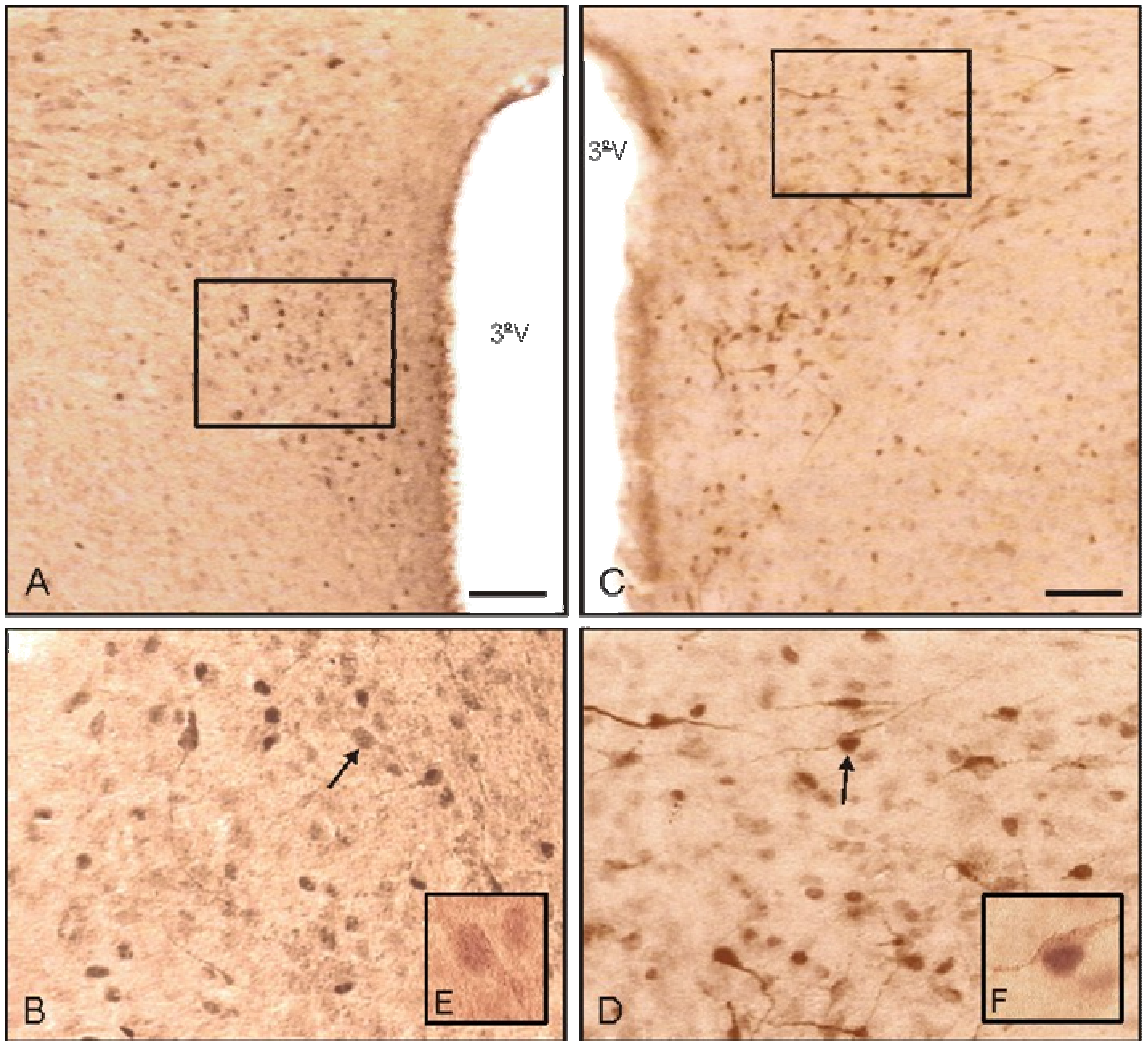
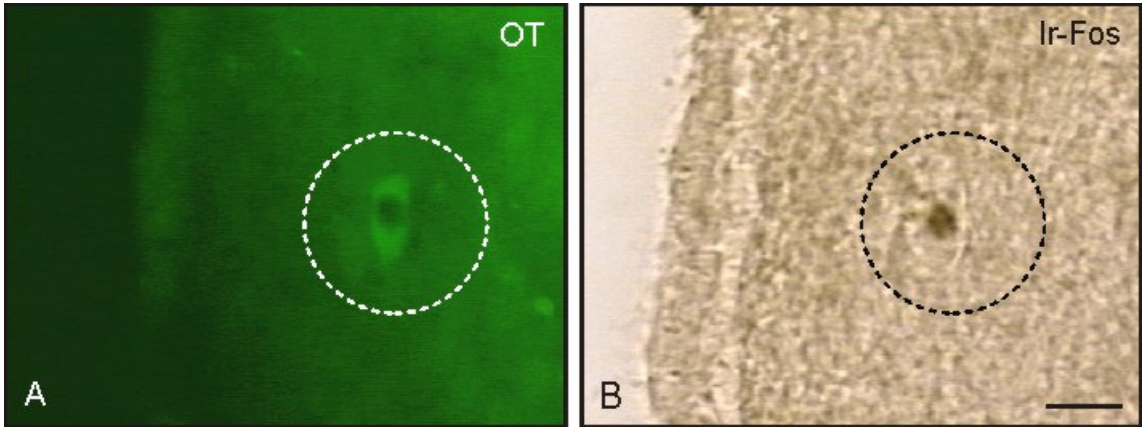


Fig. 30. Fotomicrografias de seções coronais seções coronais representativas dos animais estudados mostrando o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos e ao Fluorogold (FG) dos neurônios do núcleo da estria terminal (BST) após 7 dias da injeção iontoforética deste marcador retrógrado aplicado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) em animais submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC). As fotomicrografias dos painéis A e B são representativas dos animais sem a EVEC (controles) (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotomicrografias dos painéis C e D são representativas dos animais submetidos à EVEC (aumentos 10 e 40X, respectivamente). As fotos *e* e *f* (ampliadas 60X) são detalhes dos neurônios indicados pelas setas apresentando somente FG (*e*) ou colocadas Fos-FG (*f*). Escala da barra = 100 μ m.





DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a participação do mecanismo serotoninérgico do NPBL sobre a excreção cumulativa de água e eletrólitos, respostas hormonais (AVP, OT e ANP) e a caracterização imunohistoquímica (através da expressão da proteína-c-Fos em neurônios ocitocinérgicos, vasopressinérgicos, catecolaminérgicos e serotoninérgicos) de estruturas do SNC em resposta à EVEC. Os resultados do presente estudo mostram que microinjeções bilaterais do antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos metisergida no NPBL foram capazes de atenuar o aumento da excreção de sódio, potássio e volume urinário normalmente observado em resposta ao estímulo agudo induzido pela EVEC isotônica.

Por outro lado, o pré-tratamento com o agonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{2a/2c} DOI no NPBL produziu um incremento significativo na excreção de sódio, potássio e volume urinário no período de 20 a 40 min em resposta à EVEC em comparação aos ratos pré-tratados com salina no NPBL e submetidos à EVEC. No presente trabalho, animais pré-tratados com salina no NPBL apresentaram uma evolução temporal (ver o apêndice) da excreção urinária de água, sódio e potássio em resposta à EVEC isotônica semelhante àquela descrita por Haanwinckel e cols, (1995).

As duas doses testadas de DOI (2,8 ou 14,0 nmol) ou metisergida (2,0 ou 8,2 nmol) no NPBL foram escolhidas baseadas em estudos anteriores de Menani e Johnson (1995) e Menani e cols (1996), mostrando que a metisergida na dose de (8,2 nmol) é capaz de induzir ingestão de sódio quando realizada microinjeção no NPBL, sendo que o agonista DOI na dose de (14,0 nmol), quando injetado nesta mesma estrutura, induziu efeitos opostos (redução) na ingestão de sódio. O pré-tratamento com doses menores de metisergida (2,0 nmol) ou DOI (2,8 nmol) no NPBL permitiu comparar a sensibilidade (efeito dose-dependente da metisergida ou DOI) no NPBL na mediação das respostas renais induzidas pela EVEC isotônica.

Não foram observadas alterações significativas na excreção de água e eletrólitos em animais que foram apenas pré-tratados com metisergida ou DOI no NPBL e não submetidos à EVEC. Portanto, estes resultados sugerem que em situações normais os mecanismos serotoninérgicos do NPBL não estão envolvidos no controle da secreção de AVP, OT e ANP e que estes estariam sob o controle de outro (s) mecanismo (s). Além disso, estes resultados sugerem que o sistema serotoninérgico pode atuar no NPBL modulando o aumento da excreção de água e eletrólitos em resposta às variações de

volume do líquido extracelular.

Ainda, neste trabalho, os experimentos envolvendo manipulações farmacológicas no NPBL, mostraram resultados semelhantes àqueles descritos por Reis e cols (1994). Estes pesquisadores demonstraram que lesões eletrolíticas do núcleo dorsal da rafe (NDR) diminuíram a excreção de sódio, e aumentaram temporariamente (3-5 dias) a ingestão e excreção urinária de água, além de reduzir a liberação plasmática do ANP induzido pela EVEC. Os mesmos pesquisadores mostraram que a depleção de neurônios serotoninérgicos com o emprego de paraclorofenilalanina (PCPA), inibidor da síntese de serotonina, também diminuiu a excreção de sódio e potássio em ratos submetidos à EVEC. Resultados semelhantes a estes foram obtidos no presente estudo, uma vez que o antagonista serotoninérgico metisergida no NPBL foi eficaz em atenuar o aumento da diurese e excreção de eletrólitos induzida pela EVEC. As doses de metisergida, no entanto, não demonstraram efeitos significativos sobre a osmolalidade urinária.

Reis e cols, 1991, também mostraram que injeções intracerebroventriculares (icv) de agonistas serotoninérgicos (DOI ou serotonina) produziram aumento significativo na excreção urinária de sódio. Igualmente, a excreção de sódio induzida pela administração central de paracloroanfetamina (PCA), um composto que aumenta a concentração sináptica de serotonina, em ratos hidratados, também produziu aumento significativo na excreção renal de sódio e potássio (Stein e cols, 1987). Podemos sugerir que estes efeitos foram devidos à ação deste agente serotoninérgico uma vez que a sua administração periférica não alterou a excreção de sódio (Stein e cols, 1987). Nesse mesmo estudo (Stein e cols, 1987), mostraram que a administração intraperitoneal de PCPA, um inibidor da triptofano hidroxilase, aboliu a natriurese induzida pela administração intracerebroventricular de PCA.

Quanto à ingestão, estudos de Menani e cols (1996; 1998) demonstraram que a metisergida microinjetada no NPBL apresenta efeitos facilitatórios sobre a ingestão de sódio em ratos submetidos a injeções centrais de ANG II ou em animais previamente depletados de sódio ou submetidos a injeções subcutâneas de furosemida associado ao captopril. Os efeitos produzidos pelas microinjeções de DOI no NPBL nos estudos de Menani e cols (1996; 1998), mostraram inibição da ingestão de sódio, sugerindo que a serotonina no NPBL poderia exercer um efeito inibitório sobre a ingestão de sódio. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o DOI potenciou a excreção de sódio em resposta à EVEC, o que sugere uma função reguladora das vias

serotoninérgicas do NPBL no controle do volume dos líquidos corporais. Além disso, foram realizados estudos para avaliar a participação da via serotoninérgica do NPBL na modulação da liberação dos hormônios plasmáticos (AVP, OT e ANP), bem como, a presença de grupos neuronais serotoninérgicos, catecolaminérgicos, ocitocinérgicos e vasopressinérgicos imunorreativos a proteína c-Fos, em resposta à EVEC.

Os resultados obtidos demonstraram que os animais que receberam injeções de metisergida no NPBL apresentaram uma atenuação do aumento da concentração plasmática de ANP e OT, normalmente observado em resposta à EVEC. Os resultados obtidos a partir da quantificação das imunomarcações duplas, nos quais, os animais que receberam injeções de metisergida no NPBL apresentaram redução no número de neurônios ir-c-Fos e ir-c-Fos-OT nas subdivisões PaMM e PaLM do NPV. Estas observações podem ser correlacionados aos resultados em que obtivemos uma atenuação no aumento da concentração plasmática de OT normalmente observada em resposta à EVEC.

Os resultados mostraram também um aumento na concentração plasmática de AVP em ratos que receberam injeções de metisergida no NPBL em resposta à EVEC isotônica. Os resultados obtidos a partir da quantificação das imunomarcações duplas, mostraram que os animais pré-tratados com metisergida no NPBL apresentaram aumento significativo no número de neurônios ir-c-Fos-AVP na subdivisão LM do NPV (que caracteriza-se pelo predomínio de neurônios vasopressinérgicos) e no NSO em resposta ao mesmo paradigma experimental. Nesse sentido, estas observações podem ser correlacionados aos resultados em que obtivemos um aumento na concentração plasmática de AVP em ratos que receberam injeções de metisergida no NPBL em resposta à EVEC.

Menani e cols (1995; 1996) mostraram o que injeções bilaterais de metisergida (4 µg/ 200 nl) no NPBL foram capazes de induzir aumento na pressão arterial de ratos. Estes mesmo autores demonstraram que injeções de metisergida no NPBL potenciam a ingestão de água e de sódio em animais submetidos a estímulos de desidratação extracelular. Estes resultados, em conjunto aos que estão sendo apresentados neste estudo mostraram que os animais submetidos a injeções de metisergida no NPBL em resposta à EVEC apresentaram anti-diurese e anti-natriurese. Essa resposta sinalizaria para um mecanismo renal de proteção evitando a perda de líquidos e eletrólitos. Levando-se em consideração que o bloqueio do mecanismo serotoninérgico do NPBL (pela injeção de metisergida) induz aumento da PA poderíamos sugerir que os sistemas

de controle responsáveis pela manutenção da PA deixariam de responder adequadamente, estimulando o aumento da secreção de AVP, tanto no plasma, quanto nos neurônios magnocelulares vasopressinérgicos do NPV. A retirada do mecanismo inibitório do NPBL poderia ser comparada aos efeitos produzidos pelas lesões eletrolíticas do NPBL. Animais apresentando lesões eletrolíticas do NPBL aboliram a inibição da ingestão de água observada durante a distensão de um balão inserido no átrio direito (Ohman e Johnson, 1989). Nesses animais a lesão do NPBL prejudicaria a ativação de sistemas de controle sensíveis à expansão de volume (Kaufman, 1984), o que também pode ser observado nos estudos de (Ohman e Johnson, 1986) demonstrando que lesões do NPBL potenciam o efeito dipsogênico da ANGII administrada intracerebroventricularmente.

Andrade e cols (1998) demonstraram que a serotonina pode apresentar modulação excitatória ou inibitória nos circuitos neurais, estando esta modulação relacionada a diferentes tipos de receptores e canais iônicos. A modulação da liberação de vasopressina tem sido demonstrada estar sob o controle inibitório do GABA (Knepel e cols, 1980; Iovino e cols, 1982; Brennan e cols, 1984a, 1984b; Jhamandas e cols, 1987). Feng e cols (2001) demonstraram que os receptores serotoninérgicos 5HT₂ podem promover uma redução da inibição gabaérgica (receptores GABA A) em circuitos do córtex pré-frontal relacionados à emoção e cognição.

Estudos da literatura (Grindstaff e Cunningham, 2001), sugeriram a existência de uma via neural em que o NPBL enviaria projeções à banda diagonal de broca (DBB) e esta, por sua vez, seria responsável por enviar projeções excitatórias à zona perinuclear (PZN) do NSO que através de uma via gabaérgica inibiria a secreção de vasopressina (Tribollet e cols, 1985; Renaud e cols, 1996; Jhamandas e cols, 1999). Além disso, estudos de Jhamandas e cols (1991), sugeriram que aferências provenientes do NPBL poderiam enviar projeções para a PZN e influenciar neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos deste circuito. A ativação da PZN, uma região gabaérgica do hipotálamo lateral que se projeta para neurônios vasopressinérgicos do NSO tem sido implicada na inibição da AVP em resposta a alterações de volume. Além disso, estudos demonstraram que a PZN apresentou aumento significativo de neurônios imunorreativos a proteína c-Fos em resposta à expansão isotônica de volume (Grindstaff e Cunningham, 2001a; 2001b). Godino e cols, 2005 também demonstraram aumento no número de neurônios imunorreativos a proteína c-Fos na DBB em resposta à EVEC isotônica. Nesse sentido, os resultados da literatura

sugerem que o NPBL faria parte de um circuito integrando a DBB e a PZN, que ativaria os neurônios gabaérgicos do NSO modular a secreção de vasopressina em resposta à EVEC (Grindstaff e Cunningham, 2001a; 2001b; Tribollet e cols, 1985; Jhamandas e cols, 1989; Renaud e cols, 1996).

O pré-tratamento com DOI no NPBL induziu um incremento significativo na concentração plasmática de OT e ANP, sem alterar os níveis plasmáticos de AVP em resposta à EVEC. Haanwinckel e cols (1995) e mais recentemente, Godino e cols (2005) mostraram que a EVEC isotônica induz aumento das concentrações plasmáticas de OT e ANP e redução da AVP. Resultados da literatura mostraram que a OT é um potente peptídeo natriurético e calurético e que esses efeitos podem ser independentes da vasopressina (Balment e cols, 1980; Stricker e cols, 1987; Haanwinckel e cols, 1995). A partir da quantificação das imunomarcações duplas, os resultados obtidos mostraram que os ratos que receberam injeções de DOI no NPBL apresentaram um aumento no número de neurônios ir-c-Fos-OT nas subdivisões AC e MM do NPV em resposta à EVEC. Dessa forma, estas observações morfo-funcionais podem ser correlacionadas aos resultados em que obtivemos um incremento na concentração plasmática de OT em resposta à EVEC.

Por outro lado, os ratos pré-tratados com DOI no NPBL apresentaram redução no número de neurônios ir-c-Fos-AVP no NSO, mas não foram observadas alterações na concentração plasmática deste hormônio em resposta à EVEC. Resultados de Godino e cols, 2005, mostraram que após a realização da EVEC isotônica existe um aumento no número de neurônios ir-c-Fos-OT em diferentes subnúcleos do NPV (LM e MM) e NSO, porém, mostraram também ausência de alterações na imunomarcção ir-c-Fos-AVP nas subdivisões magnocelulares do NPV e do NSO.

No presente trabalho também foram realizados estudos neuroanatômicos através das injeções iontoforéticas do marcador retrógrado de vias fluorogold no NPBL e identificados os grupos neuronais imunorreativos a proteína c-Fos em resposta à EVEC isotônica. Dentre as áreas prosencefálicas que foram ativadas pela EVEC e que apresentaram projeções diretas ou monossinápticas para o NPBL encontram-se: o NPV (porção ventral), que apresenta neurônios com projeções não endócrinas para o tronco cerebral e vias autonômicas; ACe e BST. Estes resultados são de grande importância, pois evidenciam quais áreas prosencefálicas que se conectam diretamente com o NPBL, e fazem parte de um circuito neural que recebe e integra informações específicas envolvidas com o balanço do equilíbrio hidrossalino em resposta à EVEC. Estudos

adicionais necessitam ser realizados no sentido de esclarecer qual o significado destas aferências do NPV, BST e ACe ao NPBL.

Vários estudos têm demonstrado que a modulação exercida pela serotonina sobre os neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do NPV é mediada primariamente por receptores 5HT₂ (Levy e cols, 1992; Uvnas-Moberg e cols, 1996). Além disso, estudos prévios demonstraram que os neurônios do NPV, mas não do NSO podem ser ativados por terminações serotoninérgicas para aumentar a secreção de ocitocina (Van der Kar e cols, 1995). Resultados de (Zhang, 2002) demonstraram que a administração subcutânea de DOI foi capaz de induzir ativação dos receptores 5HT_{2A} do NPV levando à liberação de ocitocina, prolactina e renina para a circulação.

Os resultados de Andrade e cols (1998) demonstraram que a serotonina pode apresentar modulação excitatória ou inibitória dependendo do subtipo de receptor sobre os circuitos neurais. Os presentes resultados indicam que o mecanismo serotoninérgico do NPBL exibe efeitos dissociados no que diz respeito à liberação de ocitocina e vasopressina pelos neurônios magnocelulares do NPV e NSO em resposta à EVEC. Esses resultados são importantes porque sugerem que o mecanismo serotoninérgico do NPBL influenciaria de forma distinta a secreção dos hormônios neurohipofisários AVP e OT: por um lado facilitando as respostas natriuréticas, caliuréticas e diuréticas em virtude do incremento dos níveis plasmáticos de OT e ANP, sem alterar os níveis plasmáticos da AVP em resposta à EVEC. Por outro lado, efeitos opostos (a esses facilitatórios) puderam ser observados sobre a secreção dos hormônios neurohipofisários, concentração plasmática desses hormônios e excreção de água e eletrólitos, quando a metisergida foi administrada no NPBL em resposta à EVEC.

Os resultados de Godino e cols (2005) demonstraram aumento no número de neurônios ir-c-Fos-5HT no NDR em resposta à EVEC isotônica, sugerindo a participação da via serotoninérgica do NDR nos mecanismos de controle da hipervolemia induzida pela EVEC. Nossos resultados mostram que o pré-tratamento com DOI no NPBL induziu uma redução significativa no número de neurônios ir-c-Fos-5HT no NDR em resposta à EVEC. Tanto o NPBL como o NDR mantém uma conexão neural bidirecional. Estudos utilizando traçadores anterógrados (Saper e Loewy, 1980; Lee e cols, 2003), mostraram que o NDR recebe projeções do NPBL. E também, os resultados que estão sendo apresentados aqui, pela utilização do traçador retrógrado de vias Fluorogold, demonstram que os neurônios serotoninérgicos do NDR foram ativados em resposta à EVEC e se projetam para o NPBL. Portanto, nossa proposta é

que a serotonina presente no NPBL seja originada a partir do NDR, que além de apresentar corpos celulares produtores de serotonina, caracteriza-se como a maior projeção ascendente serotoninérgica para as áreas prosencefálicas. A ativação dos mecanismos inibitórios do NPBL reduzindo o número de neurônios ir-c-Fos-5HT no NDR precisam ser melhor elucidados no sentido investigar a importância desta via modulatória.

O pré-tratamento com metisergida no NPBL induziu um aumento no número de neurônios ir-c-Fos e ir-c-Fos-TH no NTS em resposta à EVEC. Nossa sugestão é que o NTS recebe aferências de barorreceptores que sinalizariam para uma situação de aumento da PA, uma vez que a microinjeção de metisergida no NPBL induz este aumento (Menani e cols, 1995) e, nesse sentido, os resultados sugerem que a ativação da via catecolaminérgica, presente nesta estrutura do tronco cerebral, está associada à regulação de situações de hipervolemia induzida pela EVEC. Os resultados obtidos no presente estudo a partir das injeções iontoforéticas de fluorogold no NPBL mostraram que o NTS e o LC apresentam conexões com este núcleo pontino e foram ativados (através da expressão da proteína c-Fos) em resposta à EVEC.

Na Fig. 33 apresentamos um diagrama esquemático mostrando o possível circuito neural envolvido no controle do volume dos líquidos corporais em resposta à EVEC isotônica. Esta via neural envolveria primeiramente a ativação de barorreceptores e receptores de volume cardiopulmonares que enviariam impulsos aferentes para estruturas do tronco cerebral (NTS, AP e LC) em resposta às variações de volume do líquido extracelular ou alterações na pressão arterial. Uma via serotoninérgica proveniente dessas duas estruturas foi descrita por Lança e Van der Kooy (1985). Tanto o NTS, como a AP poderiam enviar projeções ao LC e este, por sua vez, enviaria projeções a núcleos de integração como o NPBL, NDR e ACe que apresentariam conexões com o NPV e NSO do hipotálamo (Saper e Loewy, 1980; Sawchenko e cols, 1983; Larsen e cols, 1991; Petrov e cols, 1992). O DRN, uma vez ativado, poderia, através de projeções diretas ou por conexões via ACe ativar a liberação de OT pelos neurônios magnocelulares do NPV e NSO (Moore e cols, 1978; Cecheto e Saper, 1988; Ma e cols, 1991; Petrov e cols, 1994; Palkovits, 1999). No caso específico do NPBL (que envia projeções diretas ao NPV), está sendo proposta a existência de uma via serotoninérgica modulatória para a secreção de OT no NPV e indiretamente via DBB e PZN (através da modulação gabaérgica) que sinalizaria ao NSO para o controle da liberação de AVP (Grindstaff e Cunningham, 2001, 2001b;

Tribollet e cols, 1985; Jhamandas e cols, 1989; Renaud e cols, 1996). Em adição, resultados da literatura (Antunes-Rodrigues e cols, 1993; Haanwinckel e cols, 1995; Antunes-Rodrigues e cols, 1997; Chrigher e cols, 2001) mostraram que a via estimulatória da secreção de OT poderia ser através da ativação de terminais ANPérgicos intrahipotalâmicos que por sua vez induziriam a síntese e liberação de ANP central, que ativaria a liberação neurohipofisária de OT. Esta, uma vez liberada para a circulação sanguínea, induziria a liberação cardíaca de ANP responsável pela diurese, natriurese e vasodilatação necessárias para restabelecer o equilíbrio hemodinâmico e a homeostase dos líquidos corporais. Além disso, a OT apresentaria um potente efeito natriurético por suas ações diretas ou indiretas sobre os túbulos renais.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam grupos neuronais específicos ativados no SNC em resposta à EVEC isotônica e que se projetam ao NPBL. Estes grupos neuronais fazem parte de um circuito neural que recebe e integra informações provenientes dos sistemas de controle dos líquidos corporais. Em suma, os resultados obtidos sugerem que o sistema serotoninérgico presente no NPBL constitui um dos responsáveis pela regulação neuroendócrina do volume dos líquidos orgânicos modulando a excreção de água e eletrólitos, bem como a liberação de AVP, OT e ANP sabidamente envolvidos nesta regulação homeostática.

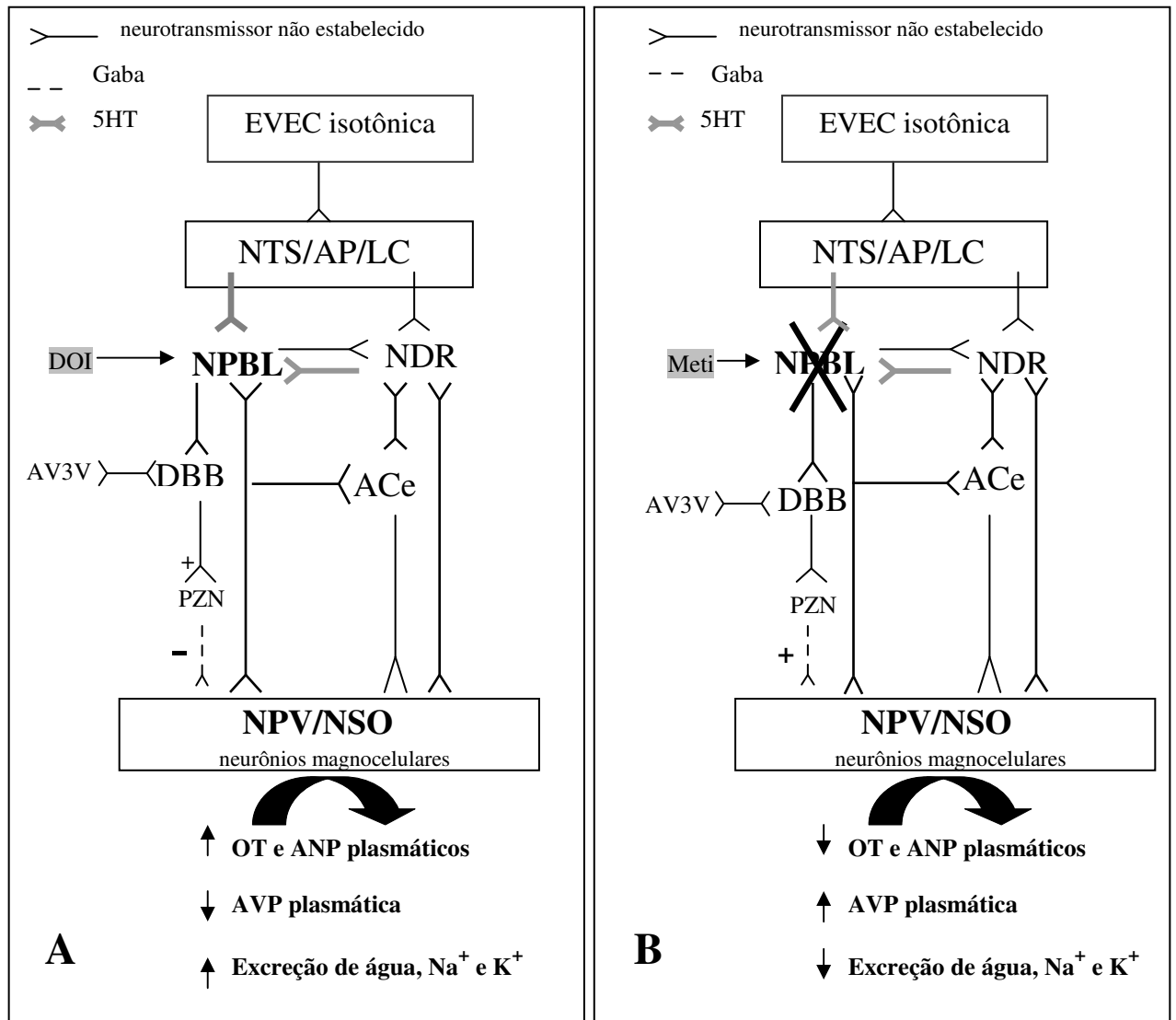


Fig. 33. Diagrama esquemático mostrando o possível mecanismo neural ativado em resposta à expansão de volume do líquido extracelular (EVEC). Este inclui o mecanismo serotoninérgico (5HT) presente no núcleo parabraquial lateral (NPBL) modulando a liberação de hormônios neurohipofisários (vasopressina - AVP e ocitocina - OT) e também o peptídeo natriurético atrial (ANP), além da excreção de água e eletrólitos. O painel da esquerda (A) está mostrando o mecanismo cerebral hipotético quando DOI é microinjetado no NPBL e o da direita (B) está mostrando o mecanismo cerebral hipotético quando Meti é microinjetada no NPBL. Metisergida (Meti – antagonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{1/2}; 2,5-dimetoxi-4-iodoamphetamine hydrobromide (DOI – agonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{2a/2c}). NTS, núcleo do trato solitário; AP, area postrema; LC, locus coeruleus; NDR, núcleo dorsal da rafe; ACe núcleo central da amígdala; AV3V, região anteroventral do terceiro ventrículo; DBB, banda diagonal de Broca; NPV, núcleo paraventricular do hipotálamo; NSO, núcleo supra-óptico do hipotálamo.

SUMÁRIO

√ Os resultados sugerem que o mecanismo serotoninérgico presente no NPBL participa modulando a excreção de água e eletrólitos urinários em resposta à EVEC isotônica.

√ O sistema serotoninérgico presente no NPBL participa modulando as vias centrais envolvidas na liberação de AVP, OT e ANP em resposta à EVEC isotônica.

√ Os resultados obtidos a partir das injeções iontoforéticas de FG revelaram grupos neuronais específicos dentro do sistema nervoso central que se projetam ao NPBL e são ativados em resposta à EVEC isotônica. O NPBL recebe várias projeções aferentes de estruturas do tronco cerebral NTS, LC, NDR e aferências prosencefálicas como ACe, BST e NPV formando um circuito neural que integra informações provenientes dos sistemas de controle envolvidos na regulação dos líquidos corporais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams SP. In *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America: Atrial Natriuretic Factor*, eds. Rosenblatt M e Jacobs JW. (Saunders, Philadelphia), 1-17, 1987.

Anderson DE, Gomez-Sanchez C, Dietz JR. Suppression of plasma renin and aldosterone in stress-salt hypertension in dogs. *Am J Physiol* 251: R181-R186, 1986.

Andrade R. Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 861: 190-203, 1998.

Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Rogers LC, Samson WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and angiotensin II – induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: R8720-R8723, 1985.

Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Rogers LC, Samson WK. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. *Endocrinology* 118: 1726-1729, 1986.

Antunes-Rodrigues J, Turrin MQ, Gutkowska J, McCann SM. Blockade of volume expansion-induced release of atrial natriuretic peptide by median eminence lesions in the rat. *Braz J Med Res* 23: 355-359, 1990.

Antunes-Rodrigues J, Ramalho MJ, Reis LC, Menani JV, Turrin MQ, Gutkowska J, McCann SM. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2956-2960, 1991.

Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, Silva-Neto CR, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6829-6831, 1992.

Antunes-Rodrigues J, Picanço-Diniz DWL, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM. Brain atrial natriuretic peptide neurons play an essential role in volume expansion induced release of natriuretic peptide and natriuresis. *Neuroendocrinology* 58: 696-700, 1993A.

Antunes-Rodrigues J, Favaretto ALV, Ballejo G, Gutkowska J, McCann SM. ANP as a neuroendocrine modulator of body fluid homeostasis. *Rev Bras Biol* 56: 221-231, 1996.

Antunes-Rodrigues J, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM. The neuroendocrine control of atrial natriuretic peptide release. *Mol Psychiatry* 2: 359-367, 1997.

Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LK, Valença MM, Mccann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84:169-208, 2004.

Armstrong WE. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol* 47: 291-339, 1995.

Armstrong WE, Hatton GI. The localization of projection neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus following vascular and neurohypophysial injections of HRP. *Brain Res Bull* 5: 473-477, 1980.

Armstrong WE, Warach S, Hatton GI, McNeill TH. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 5: 1931-1958, 1980.

Atlas AS, Maak T. Atrial natriuretic factor. In: Handbook of Physiology, edited by E.Erich, Windhager, *Oxford University Press* 1577-1669, 1992.

Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179: 641-668, 1978.

Badoer E. Cardiovascular role of parvocellular neurons in the periventricular nucleus of the hypothalamus. *News Physiol Sci* 11: 43-47, 1966.

Baldissera S, Menani JV, Sotero Dos Santos LF, Favaretto ALV, Gutkowska J, Turrin MQA, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Role of hypothalamus in the control of atrial natriuretic peptide release. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9621-9625, 1989.

Balment RJ, Brimble MS, Forsling ML. Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. *J Physiol* 308: 439-49, 1980.

Bargmann W, Scharrer E. The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am Sci* 39: 255-259, 1951.

Bernard JF, Alden M, Besson JM. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol* 329: 201-29, 1993.

Bertrand FE e Hugelin A. Respiratory synchronized function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. *J Neurophysiol* 34: 189-207, 1971.

Bisset GW e Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol* 73: 811-872, 1988.

Blackburn RE, Demko AD, Hoffman GE, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. *Am J Physiol* 263: R1347-53, 1992.

Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 269: R245-51, 1995.

Blair-West JR, Coghlan JP, Denton DA. A dose-response comparison of the actions of angiotensin II and angiotensin III in sheep. *J Endocrinology* 87: 409-417, 1980.

Bosler O, Descarries L. Monoamine innervation of the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT): a high resolution radioautographic study in the rat. *J Comp Neurol* 272: 545-61, 1987.

Brennan TJ, Malvin RL, Jochin KE, Roberts DE. Influence of right and left atrial receptors on plasma concentrations of ADH and renin. *Am J Physiol* 221: 273-278, 1971.

Brennan TJ, Morris M, Haywood JR. GABA agonists inhibit central sodium-induced vasopressin-dependent increases in arterial pressure. *Eur J Pharmacol* 103: 223-234, 1984a.

Brennan TJ, Morris M, Haywood JR. GABA agonists inhibit the vasopressin dependent pressor effects of central angiotensin II. *Neuroendocrinology* 39: 429-436, 1984b.

Brody MJ, Johnson AK. Role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. In Martini L and WF Ganong (Eds.), In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, Raven Press, New York, 249-292, 1980.

Camacho A, Phillips MI. Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Neurosci Lett* 25: 201-204, 1981.

Ciriello J, Lawrence D, Pittman QJ. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. *Brain Res* 322: 388-392, 1984.

Chriquer RS, Rocha MJ, Antunes-Rodrigues J, Franci CR. Hypothalamic atrial natriuretic peptide and secretion of oxytocin. *Brain Res* 889: 239-242, 2001.

Cogan MG. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. *Am J Physiol* 250: F710-F714, 1986.

Conrad KP, Gellai M, North WG, Valentin H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci* 689: 346-362, 1993.

Coote JH, Hilton, S.M, Zbrozyna W. The ponto-medullary area integrating the defense reaction in the cat and its influence on muscle blood flow. *J Physiol (Lond)* 229: 257-274, 1973.

Colombari DAS, Menani JV, Johnson AK. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am J Physiol* 271: R1470-R1476, 1996.

De Bold AJ. Heart atrial granularity. Effects of changes in water and electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med* 161: 508-511, 1979.

De Bold AJ, Bovenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28: 89-94, 1981.

Di Bona GF, Sawin LL. Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am J Physiol* 248: 15-23, 1985.

Edwards GLE, Ritter RC. Area Postrema lesions increase drinking to angiotensin and extracellular dehydration. *Physiol Behav* 29: 943-47, 1982.

Edwards GLE, Johnson AK. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am J Physiol* 261: R1039-R1044, 1991.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. *Peptide neurotransmitters* In:___ Principles of Neuropsychopharmacology. Massachusetts: Sinauer Associates, 445-491, 1996.

Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z. Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci* 17: 6502-6511, 2001.

Fulwiler CE e Saper CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res Rev* 7: 229-259, 1984.

Ganong WF. Sympathetic effects on renin secretion: mechanisms and physiological role. *Adv Exp Med Biol* 17: 17-32, 1972.

Garrison JC. Histamina, bradicinina, 5-hidroxitriptamina e seus antagonistas. In: Gilman AG, Rall TW, Nies A, Taylor P. (Eds) *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 378-394, 1991.

Genest J, Cantin M. The atrial natriuretic factor: its physiology and biochemistry. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 110: 1-125, 1988.

Godino A, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J, Vivas L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience* 133: 493-505, 2005.

Grindstaff RR, Cunningham JT. Lesion of the perinuclear zone attenuates cardiac sensitivity of vasopressinergic supraoptic neurons. *Am J Physiol* 280: R630-R638, 2001a.

Grindstaff RR, Cunningham JT. Cardiovascular regulation of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Exp Neurol* 171: 219-26, 2001b.

Gutkowska J, Horky K, Thibault G, Januszewicz P, Cantin M, Genest J. Atrial natriuretic factor is a circulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 125: 315-323, 1984.

Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto ALV, Gutkoswska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7902-7906, 1995.

Harms PL, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol* 36: 391-392, 1974.

Haselton JR, Goering J, Patel KP. Parvocellular neurons of the paraventricular nucleus are involved in the reduction in renal nerve discharge during isotonic volume expansion. *J Auton Nerv Syst* 50: 1-11, 1994.

Hatton GI, Hutton UE, Hoblitzell ER, Armstrong WE. Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res* 108: 187-193, 1976.

Hebert H, Moga M, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus to the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293: 540-580, 1990.

Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JP. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* 142: 1659-1668, 2001.

Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R537-R545, 2002.

Higuchi S, Morgan DA, Mark AL. Contrasting reflex effects of chemosensitive and mechanosensitive vagal afferents. *Hypertension* 11: 674-679, 1988.

Hosoya Y, Matsushita M. Identification and distribution of the spinal and hypophyseal projection neurons in the paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic study with the horseradish peroxidase method. *Exp Brain Res* 35: 315-331, 1979.

Hosoya Y, Sugiura Y, Okado N, Loewy AD, Kohno K. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Exp Brain Res* 85: 10-20, 1991.

Hussain MK, Fernando N, Shapiro M, Kagan A, Glick SM. Radioimmunoassay of arginine vasopressin in humans plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 616-625, 1973.

Iovino M, Steardo L, Poenaru S. A possible involvement of GABA pathways in the central control of ADH release in rats. *Acta Neurol (Napoli)* 4: 319-323, 1982.

Iovino M, Steardo L. Effect of substances influencing brain serotonergic transmission on plasma vasopressin levels in the rat. *Europ J Pharmacol* 112: 99-103, 1985.

Jhamandas JH, Renaud LP. Bicuculline blocks an inhibitory baroreflex input to supraoptic vasopressin neurons. *Am J Physiol* 252: R947-R952, 1987.

Jhamandas JH, Raby W, Rogers J, Buijs RM, Renaud LP. Diagonal band projection towards the hypothalamic supraoptic nucleus: light and electron microscopic observations in the rat. *J Comp Neurol* 282: 15-23, 1989.

Jhamandas JH, Aippersbach SE, Harris KH. Cardiovascular influences on rat parabrachial nucleus: an electrophysiological study. *Am J Physiol* 260: R225-R231, 1991.

Jhamandas JH, Harris KH, Petrov T, Krukoff TL. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *J Endocrinol* 4: 461-471, 1992.

Johnson AK, Edwards GL. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: *Current Topics in Neuroendocrinology, Behavioral Aspects of Neuroendocrinology*, edited by Ganten D and Pfaff D. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 149-190, 1990.

Johnson AK, Thunhorst RL. Sensory mechanisms in the behavioral control of body fluid balance: thirst and salt appetite. *In: Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*, edited by Fluharty SJ, Morrison AR, Sprague JM, and Stellar E. New York: Academic, 16: 145-176, 1995.

Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18:292-353, 1997.

Ju G, Liu S, Tao J. Projections from the hypothalamus and its adjacent areas to the posterior pituitary in the rat. *Neuroscience* 19: 803-828, 1986.

Kahl FR., Flint JF, Szidon JP. Influence of left atrial distention on renal vasomotor tone. *Am J Physiol* 226: 240-246, 1974.

Karim F, Majid DS, Sammerill RA. Sympathetic nerves in the mediation of renal response to localized stimulation of atrial receptors in anesthetized dogs. *J Physiol* 417: 63-78, 1989.

Kahl FR, Flint JF, Szidon JP. Influence of left atrial distention on renal vasomotor tone. *Am J Physiol* 226: 240-246, 1974.

Knepel W, Nutto D, Hertting G. Evidence for the involvement of a GABA-mediated inhibition in the hypovolaemia-induced vasopressin release. *Pflugers Arch* 388: 177-183, 1980.

Karim F, Majid, DS, Sammerill RA. Sympathetic nerves in the mediation of renal response to localized stimulation of atrial receptors in anesthetized dogs. *J Physiol* 417: 63-78, 1989.

Kaufman S. Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. *J Physiol Psychol* 349: 389-396, 1984.

Kaufman S, Monckton EA. Effect of peripherally administered atriopeptin III on water intake in rats. *J Physiol Lond* 396: 379-387, 1988.

Kaufman S. Renal and hormonal responses to prolonged atrial stretch. *Am J Physiol* 258: R1286-R1290, 1990.

Kisch, B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea Pig. *Exp Med Surg* 14: 99-112, 1956.

Krukoff TL, Harris KH, Jhamandas JH. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res Bullet* 30: 163-172, 1993.

Lança AJ, Van Der Kooy, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. *Neuroscience* 14: 1117-1126, 1985.

Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T. Atrial natriuretic factor - a circulating hormone stimulated volume loading. *Nature Lond* 314: 264-266, 1985.

Lang RE, Unger T, Ganten D. Atrial natriuretic peptide: a new factor in blood pressure control. *J Hypertens* 5: 255-271, 1987.

Larsen PJ, Moller M, Mikkelsen JD. Efferent projections from the periventricular and medial parvicellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J Comp Neurol* 306: 462-479, 1991.

Lechan RM, Nestler JL, Jacobson S. The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. *Brain Res* 245: 1-15, 1982.

Lee HS, Kim MA, Valentino RJ, Waterhouse BD. Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res* 963: 57-71, 2003.

Levy AD, Li Q, Alvarez Sanz MC, Rittenhouse PA, Brownfield MS, Van de Kar LD. Repeated cocaine modifies the neuroendocrine responses to the 5-HT_{1C}/5-HT₂ receptor agonist DOI. *Eur J Pharmacol* 221:121-127, 1992.

Li BH, Rowland NE. Cholecystokinin and dexafenfluramine-induced anorexia compared using devazepide and c-fos expression in the rat brain. *Reg Pep* 50: 223-233 1994.

Lloyd Jr TC, Friedman JJ. Effect of a left atrium-pulmonary vein baroreflex on peripheral vascular beds. *Am J Physiol* 233: H587-H591, 1977.

Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ. Cloning and characterization of a vasopressin V₂ receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 357: 336-339, 1992.

Lovick TA, Coote JH. Effects of volume loading on paraventriculo-spinal neurones in the rat. *J Auton Nerv Syst* 25: 135-140, 1988.

Lovick TA, Malpas S, Mahony MT. Renal vasodilatation in response to acute volume load is attenuated following lesions of parvocellular neurones in the paraventricular nucleus in rats. *J Aut Nerv Syst* 43: 247-255, 1993.

Luiten PG, Ter Horst GJ, Karst H, Steffens AB. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res* 329: 374-378, 1985.

Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci Lett* 134: 21-4, 1991.

Marie JP, Guillemont H, Hatt PY. Lé degré de granulation des cardiocytes auriculaires: Étude planimétrique au cours de différents apports de eau et de sodium chez le rat. *Phatol Biol* 24: 549-554, 1976.

Mason JM, Ledsoe JR. Effects of obstruction of the mitral orifice or distention of the pulmonary vein-atrial junctions on renal and hind-limb vascular resistance in the dog. *Circ Res* 35: 24-32, 1974.

Masotto C, Negro-Villar A. Inhibition of spontaneous or angiotensin II-stimulated water intake by atrial natriuretic factor. *Brain Research Bull* 15: 523-526, 1985.

McCann SM, Franci C, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, Favaretto ALV. Neural control of atrial natriuretic peptide actions on fluid intake and excretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 213: 117-127, 1996.

Menani, JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol* 269: R1044-R1049, 1995.

Menani, JV, Thunhorst RL, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in control of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 270: R162-R168, 1996.

Menani, JV, De Luca Jr LA, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol* 274: R555-R560, 1998B.

Menani JV, De Luca LA Jr, Thunhorst RL, Johnson AK. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R126-31, 2000.

Mezey E, Kiss JZ. Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology* 129: 1814-1820, 1991.

Micheline LC, Marcelo MC, Amico J, Morris M. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. *Heart Circ Physiol* 284: H2269-H2276, 2003.

Moore RY, Halaris AE, Jones BE. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol* 180: 417-38, 1978.

Morita H e Vatner SF. Effects of volume expansion on renal nerve activity, renal blood flow, and sodium and water excretion in conscious dogs. *Am J Physiol* 249: F680-F687, 1985.

Nakamura M, Katsuura G, Nakao K, Imura H. Antidipsogenic action of alpha-human atrial natriuretic polypeptide administered intracerebroventricularly in rats. *Neurosci Lett* 58: 1-6, 1985.

Neill JC, Cooper SJ. Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats: evidence for possible 5-HT_{1c} receptor mediation. *Psychopharmacology* 99: 196-201, 1989.

Nissen R, Cunningham JT, Renaud LP. Lateral hypothalamic lesions alter baroreceptor-evoked inhibition of rat supraoptic vasopressin neurones. *J Physiol* 470: 751-766, 1993.

Norgren RE, Leonard CM. Ascending central gustatory pathways. *J Comp Neurol* 150: 217-238, 1973.

Norgren R. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 166: 17-33, 1976.

Norgren R. The central organization of the gustatory and visceral afferents systems in the nucleus of the solitary tract. In: Katsuki Y, Norgren R, Sato M. (Eds.) *Brain mechanism of sensation*. New York : Wiley 143-160, 1981.

Ohman LA, Johnson AK. Lesions in the parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol* 251: R504-R509, 1986.

Ohman LA, Johnson AK. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *Am J Physiol* 256: R264-R269, 1989.

Ohman LA, Johnson AK. Role of the lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. *Brain Res* 695: 275-278, 1995.

Oldfield BJ, Hou-Yu A, Silverman AJ. A combined electron microscopic HRP and immunocytochemical study of the limbic projections to rat hypothalamic nuclei containing vasopressin and oxytocin neurons. *J Comp Neurol* 23: 221-231, 1985.

O'Neill RG. Aldosterone regulation of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct. *Semin Nephrol* 10: 365-74, 1990.

Palade GE. Secretory granules in the atrial myocardium. *Anat Rec* 262, 1961.

Palkovits M, Eskay RL, Antoni FA. Atrial natriuretic peptide in the median eminence is of paraventricular nucleus origin. *Neuroendocrinology* 46: 542-544, 1987.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edition. New York: Academic Press, 1986.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd edition. San Diego: Academic Press, 1997.

Paxinos G. The rat nervous system. Third edition, Elsevier Academic Press, 2004.

Petersson A, Hedner T, Ricksten S-E, Hedner J, Towle AC. Acute volume expansion as a physiological stimulus for the release of atrial natriuretic peptides in the rat. *Life Sci* 38: 1127-1133, 1986.

Petersson M, Alster P, Lundeberg T, Uvnas-Moberg K. Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats. *Physiology and Behavior* 60: 1311-1315, 1996.

Petersson M, Alster P, Lundeberg T, Uvnas-Moberg K. Oxytocin decreases blood pressure in male but not in female spontaneously hypertensive rats. *J Aut Nerv Syst* 66: 15-18, 1998.

Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH. Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell Tissue Res* 277: 289-95, 1994.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 49: 413-435, 1987.

Poulain DA, Wakerley JB. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7: 773-808, 1982.

Pyner S, Coote JH. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. *Neuroscience* 100: 549-556, 2000.

Reis LC, Ramalho MJ, Antunes-Rodrigues J. Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control. *Braz J Med and Biol Res* 24: 633-641, 1991.

Reis LC, Ramalho MJ, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12022-12027, 1994.

Renaud LP, Bourque CW. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36: 131-169, 1991.

Renaud LP. CNS pathways mediating cardiovascular regulation of vasopressin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:157-160, 1996.

Ricksten S-E, Noresson E, Thóren P. Inhibition of renal sympathetic nerve traffic from cardiac receptors in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 106: 17-22, 1979.

Robert F, Geenen V, Schoenen J, Burgeon E, De Groot D, Defresne MP, Legros JJ, Franchimont P. Colocalization of immunoreactive oxytocin, vasopressin and interleukin-1 in human thymic epithelial neuroendocrine cells. *Brain Behav Immun* 5: 102-115, 1991.

Roberts MM, Robinson AG, Fitzsimmons MD, Grant F, Lee WS, Hoffman GE. C-fos expression in vasopressin and oxytocin neurons reveals functional heterogeneity within magnocellular neurons. *Neuroendocrinology* 57: 388-400, 1993.

Rhodes CH, Morrell ST, Pfaff DW. Immunohistochemical analysis of hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J Comp Neurol* 198: 45-64, 1981.

Rouah-Rosilio M, Orosco M, Nicolaidis S. Serotonergic modulation of sodium appetite in the rat. *Physiol Behav* 55: 811-816, 1994.

Saito H, Sakai KA, Jouvet M. Discharge patterns of the nucleus parabrachialis lateralis neurons of the cat during sleep and waking. *Brain Res* 134: 55-57, 1977.

Samson WR. Dehydration-induced alterations in rat brain vasopressin and natriuretic factor immunoreactivity. *Endocrinology* 117: 1279-1281, 1985.

Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* 117: 305-312, 1976.

Saper CB, Loewy AD. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res* 197: 291-317, 1980.

Saper CB, Standaert DG, Currie MG, Schwartz MD, Geller DM, Needleman P. Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: Presence in cardiovascular regulatory areas. *Science* 227: 1047-1049, 1985.

Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218: 121-144, 1983

Schultz HD, Fater DC, Sundet WD, Geer PG, Goetz KL. Reflexes elicited by acute stretch of atrial vs. pulmonary receptors in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 242: H1065-H-1076, 1982.

Seymour AA, Davis JO, Frreman RH. Renin release form kidneys stimulated by PGI₂ and PGD₂. *Am J Physiol* 273: F285-F290, 1979.

Shafton AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res* 801: 239-243, 1998.

Shapiro RE, Miselis RR. The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol* 234: 344-364, 1985.

Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 68: 1248-1284, 1988.

Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, Albuquerque-Araujo WI, de Nucci G, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 278-283, 1999.

Stein JM, Lind RW, Johnson AK. The effects of intraventricular and intravenous *p*-chloroamphetamine on urine volumes and electrolyte balance. *Soc Neurosci Abstr* 6: 228, 1980.

Stein JM, Lind RW, Johnson AK. Central serotonergic influences on renal electrolyte and water excretion. *Neuropharmacology* 26: 1685-1692, 1987.

Steinbusch HW. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 4: 557-618, 1981.

Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ, Palacios JM, Richard P, Porte A. Autoradiographic localization of binding sites for oxytocin and vasopressin in the rat kidney. *J Endocrinol.* 113: 179-82, 1987.

Stricker EM, Hossut JÁ, Verbalis JG. Neurohypophyseal secretion in hypovolemic rats: inverse relation to sodium appetite. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp. Physiol)* 252: R889-R896, 1987.

Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194: 555-570, 1980.

Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Prog Brain Res* 68: 169-190, 1986.

Swanson LW. The hypothalamus. In A.Björklund, T. Hökfelt and L.W. Swanson (Eds.), *Handbook of chemical Neuroanatomy, Vol. 5: Integrated systems of the Central Nervous System, Part I*, Elsevier, Amsterdam 1-124, 1987.

Swanson LW. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. 1992.

Thames MD, Abboud FM. Interaction of somatic and cardiopulmonary receptors in control of renal circulation. *Am J Physiol* 237: H560-H565, 1979.

Thibonnier M, Auzan C, Madhun Z, Wilkins P, Berti-Mattera L, Clauser E. Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem* 269: 3304-3310, 1994.

Thomas CJ, Rankin AJ, Head GA, Woods RL. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29: 1126-1132, 1997.

Thomas CJ, Allen AM, McAllen RM, Woods RL. ANP potentiates nonarterial baroreflex bradycardia: evidence from sinoaortic denervation in rats. *Auton Neurosci* 97: 89-98, 2002.

Thunhorst RL, Johnson AK. Effects of arterial pressure on drinking and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 264: R211-R217, 1993.

Thunhorst RL, Johnson AK. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 266: R458-R465, 1994A.

Thunhorst RL, Lewis SJ, Johnson AK. Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depelton-induced salt appetite. *Am J Physiol* 267: R1043-R1049, 1994B.

Toth E, Stelfox JE, Kaufman S. Cardiac control of salt appetite. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 252: R925- R 929, 1987.

Tribollet E, Armstrong WE, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ. Extra-hypothalamic afferent inputs to the supraoptic nucleus area of the rat as determined by retrograde and anterograde tracing techniques. *Neuroscience* 15: 135-148, 1985.

Tribollet E, Barberis C, Dreifuss JJ, Jard S. Autoradiographic localization of vasopressin and oxytocin binding sites in rat kidney. *Kidney Int.* 33: 959-65, 1988.

Tuck ML, Dluhy RG, Williams GH. A specific role for saline or the sodium ion in the regulation of renin and aldosterone secretion. *J Clin Invest* 53: 988-995, 1974.

Uvnas-Moberg K, Hillegaard V, Alster P, Ahlenius S. Effects of 5-HT agonists, selective for different receptor subtypes, on oxytocin, CCK, gastrin and somatostatin plasma levels in the rat. *Neuropharmacology* 35: 1635-1640, 1996.

Vandesande F, Dierickx K, De Mey J. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tissue Res* 180: 443-452, 1977.

Van de Kar LD, Rittenhouse PA, Li Q, Levy AD, Brownfield MS. Hypothalamic paraventricular, but not supraoptic neurons, mediate the serotonergic stimulation of oxytocin secretion. *Brain Res Bull* 36: 45-50, 1995.

Verbalis JG, Mangione MP, Stricker EM. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology* 128: 1317-1322, 1991.

Zimmerman EA. The organization of oxytocin and vasopressin pathways In: *Neurosecretion and Brain Peptides* (Eds. Reichlin, S. & Bick, K.L.) Raven Press New York, 63-75, 1981.

Zimmerman EA. From neurosecretion to neural communication and beyond. *Neurology* 36: 809-814, 1986.

Wang SC, Ranson SW. Autonomic responses to electrical stimulation of the lower brain-stem. *J Comp Neurol* 71: 437-455, 1939.

Ward DG, Grizzle WE, Gann DS. Inhibitory and facilitatory areas of the rostral pons mediating ACTH release in the cat. *Endocrinology* 99: 1220-1228, 1976.

Wiegand SJ, Price JL. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J Comp Neurol* 192: 1-19, 1980.

APENDICE

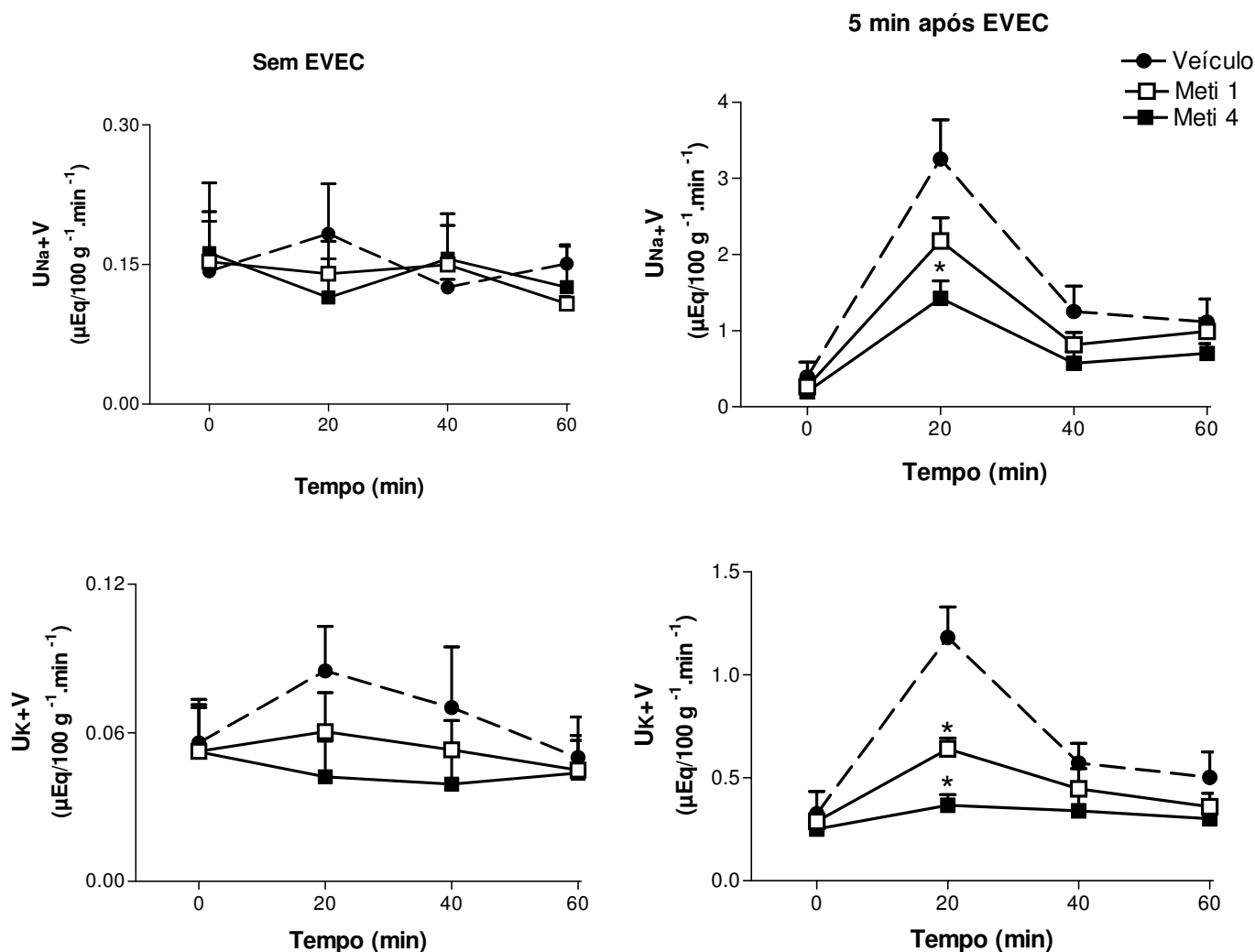


Fig 3. Excreção de sódio e potássio em ratos submetidos à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e microinjetados no núcleo parabraquial lateral (NPBL) com veículo ou metisergida (Meti, 2,0 ou 8,2 nmol/0,2 μl). Os gráficos (A) e (B) representam a excreção urinária de sódio (UNa+V); (C) e (D) representam a excreção urinária de potássio (UK+V). Os resultados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas). Notar que as escalas da ordenada para a excreção de sódio e potássio em (A e B) e (C e D) são diferentes; $n = 8$.

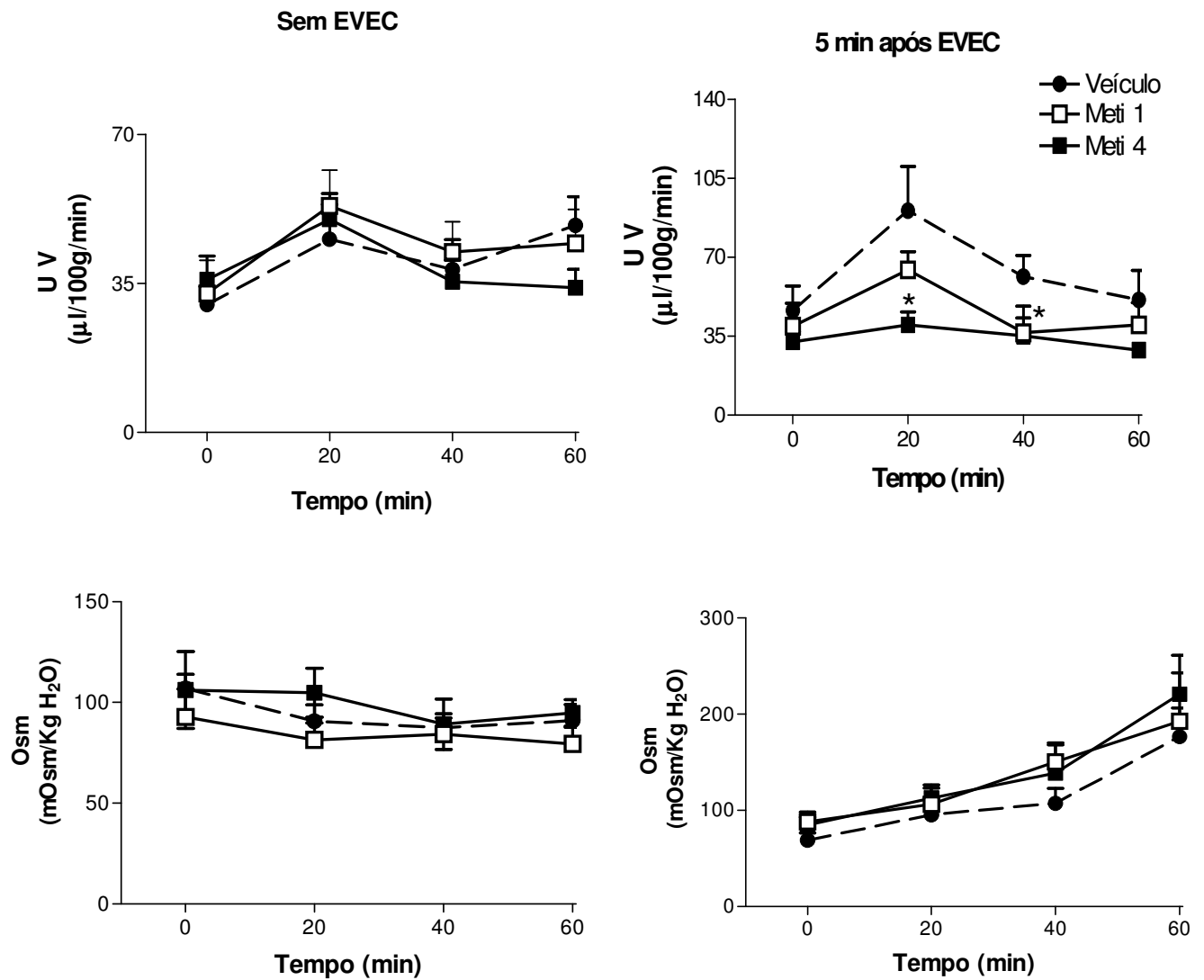


Fig. 4. Volume urinário e osmolalidade urinária em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e microinjetados no núcleo parabraquial lateral (NPBL) com veículo ou metisergida (Meti, 2,0 ou 8,2 nmol/0,2 μl). Os gráficos (E) e (F) representam volume urinário (UV); (G) e (H) representam osmolalidade urinária (Osm). Os resultados estão representados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n = 8$.

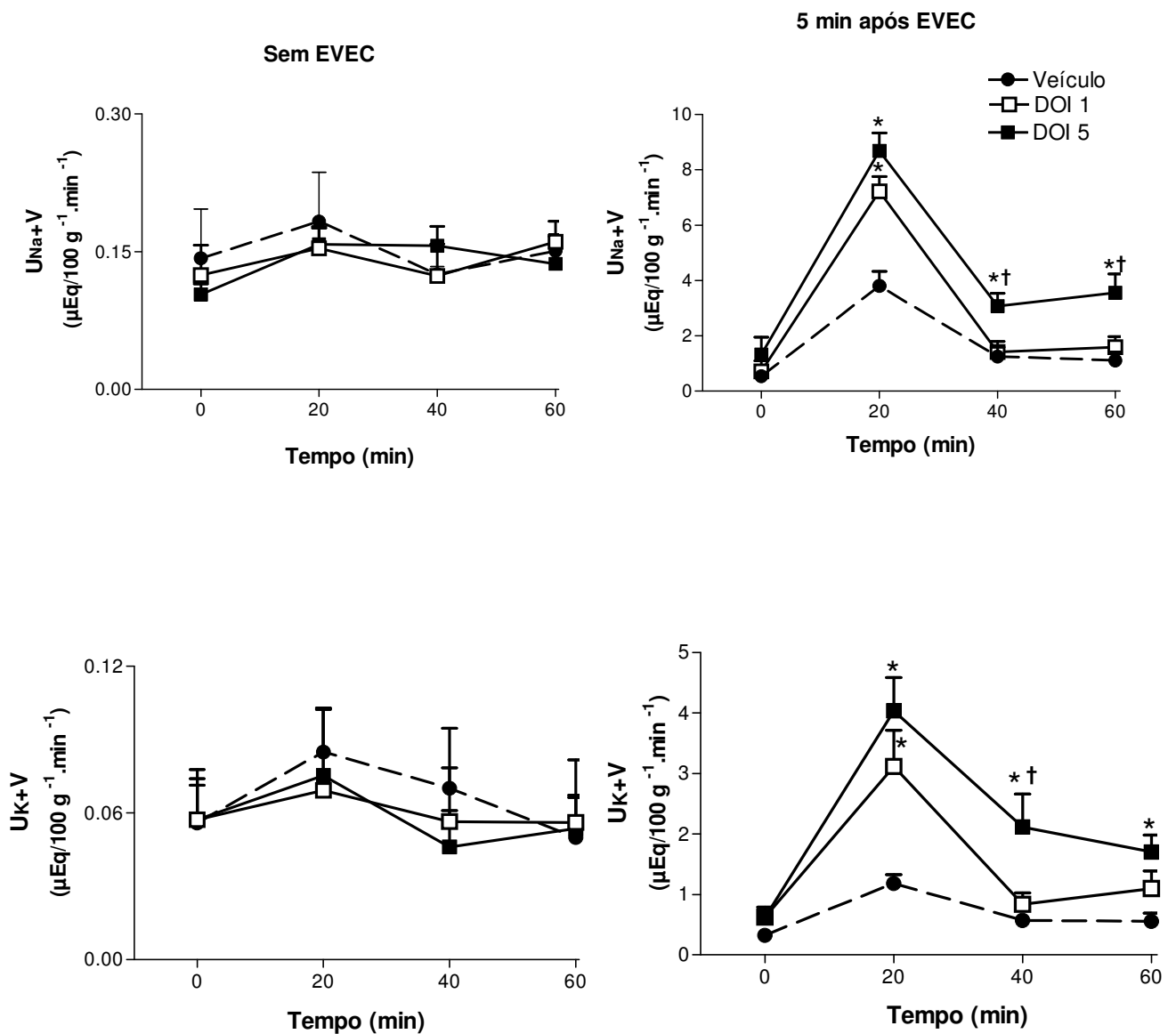


Fig.5. Excreção de sódio e potássio em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e microinjetados no núcleo parabraquial lateral (NPBL) com veículo ou hidrócloro de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 2,8 ou 14,0 nmol/0,2 μl). Os gráficos (A) e (B) representam a excreção urinária de sódio (UNa+V); (C) e (D) representam a excreção urinária de potássio (UK+V). Os resultados estão representados como média ± EPM. * p < 0,05 vs. Veículo; † p < 0,05 vs. DOI 1. (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas). Notar que as escalas da ordenada para a excreção de sódio e potássio em (A e B) e (C e D) são diferentes; n = 8.

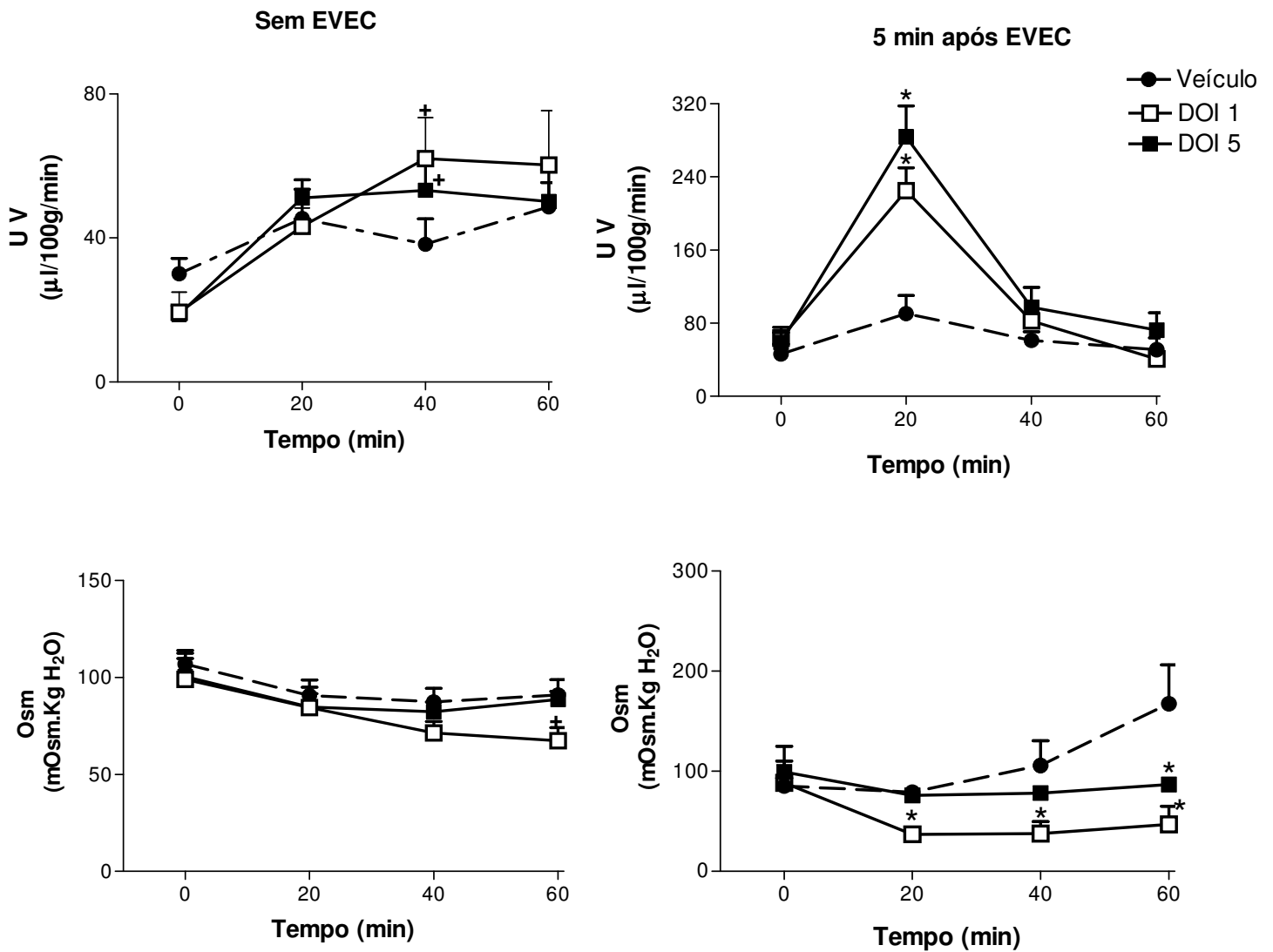


Fig. 6. Volume urinário e osmolalidade urinária em ratos submetidos ou não à expansão isotônica do volume do líquido extracelular (EVEC, NaCl 0,15 M) e apresentam microinjeção no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de veículo ou hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI, 2,8 ou 14,0 nmol/0,2 μl). Os gráficos (E) e (F) representam volume urinário (UV); (G) e (H) representam osmolalidade urinária (Osm). Os resultados estão representados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Veículo (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas); $n = 8$.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)