

Siany da Silva Liberal

Participação do Óxido Nítrico e Monóxido de Carbono na Regulação da Secreção do Peptídeo Natriurético Atrial em Explantes de Bulbo Olfatório.

Belém 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Siany da Silva Liberal

Participação do Óxido Nítrico e Monóxido de Carbono na Regulação da Secreção do Peptídeo Natriurético Atrial em Explantes de Bulbo Olfatório.

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz W. P. Diniz.

Co-Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Belém 2008

Siany da Silva Liberal

Participação do Óxido Nítrico e Monóxido de Carbono na Regulação da Secreção do Peptídeo Natriurético Atrial em Explantes de Bulbo Olfatório.

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz W. P. Diniz.

Co-Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Universidade federal do Pará

Prof. Dr. Rommel Burbano
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Anderson Manuel Herculano
Universidade Federal do Pará

Belém, 02 de junho de 2008

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisca Liberal (*in memoriam*) e Antônio Liberal; ao meu filho Hugo Murilo Liberal. E ao Domingos Diniz.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz, que acreditou em mim e em meu potencial, antes de qualquer coisa e orientou-me e incentivou-me frente aos desafios profissionais e pessoais que se apresentaram durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, por me proporcionar todas as condições necessárias para a execução deste trabalho, pelo seu entusiasmo contagiante na obtenção dos resultados, por sua amizade, apoio e incentivo. E pela felicidade de trabalhar em sua companhia tão estimada e agradável.

As técnicas Marina Holanda e Maria Valci, por sua amizade e pela ajuda imprescindíveis.

A minha família, principalmente aos meus pais: Francisca da Silva Liberal (*in memorian*), e a Antônio da Silva Liberal, que sempre me dedicaram afeto e apoio, a minhas irmãs Vera e Socorro Liberal, que me ajudaram a cuidar do meu filho quando estava distante realizando este trabalho e aos demais irmãos César, Jorge, Roni que sempre me incentivaram.

Ao meu filho Hugo Murilo Liberal, pelo afeto e pela compreensão da distância saudosa, mas necessária.

Ao Domingos que me fez redescobrir o valor do amor, da amizade, da compreensão, e do respeito, que me permitiu seguir o caminho com alegria, leveza e confiança. E por todos os momentos de alegria que vivemos.

Aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia (LNE-FMRP): Lisandra, Wagner, Rodrigo, Maurício, Eduardo, Dayane, pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia, (LNE-UFPA): Lúcia, Wanda, Ellen, Waldiney, Alan, Márcia, Herculano, pela harmoniosa companhia.

As amigas de Ribeirão Preto: Lisandra, Simone e Aline, Cléo, pela amizade e pela convivência alegre, que me fizeram suportar a saudades de casa. E as amigas Vó Nena e Carol, pelo carinho e pela acolhida tão especial que me fizeram sentir em casa e protegida.

À Deus, por tudo que ele representa para mim.

EPÍGRAFE

*A grandeza não consiste em receber honras,
mas em merecê-las.*

Aristóteles

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Equilíbrio hidrossalino	2
1.2. Circuitos hipotalâmicos e límbicos reguladores do balanço hidrossalino	5
1.3. O sistema hipotálamo-neurohipofisário e o controle da excreção de água e NaCl	10
1.4. Papel do ANP na inibição da ingestão de NaCl e água	17
1.5. O bulbo olfatório e a regulação da homeostase hidrossalina	18
1.6. O óxido nítrico na modulação da liberação de neurohormônios hipotalâmicos	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.2. Preparação de Explantes de Bulbo Olfatório	28
3.3. Técnicas	31
3.3.1 <i>Radioimunoensaio para ANP</i>	31
3.3.2 <i>Atividade da enzima sintase de óxido nítrico.</i>	32
3.3.3 <i>Quantificação de nitrato</i>	33
3.3.4 <i>Quantificação de proteínas</i>	34
3.4. Análise estatística dos resultados:	35
4. RESULTADOS	36

4.1 Efeitos de variações de osmolalidade sobre a liberação de ANP e nitrato	37
4.2. Efeito do aumento da osmolalidade sobre a atividade da sintase de oxido nítrico	38
4.3. Efeito de doadores de NO	39
4.4 Efeitos de inibidor da guanilato ciclase (GC) associado ao doador de NO	42
4.5. Efeitos de Inibidor de NOS	43
4.6. Efeitos de Inibidor da Enzima Heme-Oxigenase	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Regulação da ingestão de água pelos órgãos circunventriculares (OCVs).....	04
Figura 2- Figura 2. Circuito hipotético de regulação da ingestão de sal.....	08
Figura 3- Esquema integrativo dos inputs recebidos nos OCVs, ativação de núcleos hipotâmicos e liberação de neurohormônios na neuro-hipófise.....	11
Figura 4- Distribuição das camadas celulares no bulbo olfatório principal.....	19
Figura 5- Produção de NO a partir de ativação de neurotransmissor.....	23
Esquema 1- Desenho Experimental.....	30
Figura 6- Efeitos da variação de osmolalidade sobre a liberação de ANP.....	37
Figura 7- Efeito do aumento da osmolalidade sobre a atividade da sintase de NO.....	38
Figura 8- Efeito do SNP sobre a liberação de ANP basal e estimulada por aumento de osmolalidade	39
Figura 9- Efeito de SIN-1 sobre a liberação de ANP basal e estimulada por aumento da osmolalidade.....	40
Figura 10- Efeitos da associação de SOD e SIN-1.....	41
Figura 11- Efeitos de ODQ ou sua associação com SIN-1 sobre a liberação de ANP basal ou estimulada por hipertonicidade salina.....	42
Figura 12- Efeitos de L-NAME sobre a liberação de ANP basal e estimulada.....	43
Figura 13- Efeitos do ZNDPBG (10 μ M e 100 μ M) sobre a liberação de ANP a partir do BO.....	44

Figura 14- Efeitos de ZNDPBG (10 ou 100 μ M) e conteúdo tecidual
de 14 C citrulina..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio Adrenocorticotropico
 Alfa-MSH ou α - MSH – Hormônio estimulador do melanócito - α
 ANG II – Angiotensina II
 ANP - Peptídeo natriurético atrial
 BOA - Bulbo Olfatório Acessório
 AVP ou ADH - Arginina vasopressina ou hormônio antidiurético
 AVP [3 H] Arginina vasopressina triciada
 AV3V - Região antero-ventral do terceiro ventrículo
 BH₄ – Tetra biohemepterina
 BO - Bulbo olfatório
 BVE - hiper- Expansão de volume extracelular hipertônica
 BVE - iso – Expansão de volume extracelular isotônica
 CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
 CaM - Calmodulina
 CO – Monóxido de carbono
 CO₂ – Dióxido de carbono
 DAG - Diacilglicerol
 DTT - Ditioneitol (DTT),
 EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético
 EM- Eminência mediana
 e-NOS- Enzima sintase de óxido nítrico endotelial
 EPL- Camada plexiforme externa
 FAD- Flavina adenina dinucleotídeo
 FMN - Flavina mononucleotídeo
 GABA- Ácido gama aminobutírico
 GC - Enzima guanilato ciclase

GCs - Enzima guanilato ciclase solúvel
GL - Camada glomerular
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
GRL - Camada granular
GTP – Guanosina trifosfato
HEPES - ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfonic)
HO - Heme oxigenase
HO-1 - Heme oxigenase tipo 1
HO-2 - Heme oxigenase tipo 2
H₂O - Água
Icv – Intra-cérebro ventricular
iNOS - Enzima sintase de óxido nítrico induzida
IPL - Camada plexiforme interna
IP₃ - Inositol trifosfato
Iv – Intra-ventricular
KCl - Cloreto de potássio
L-arg - L-arginina
L-NAME - N(G)-nitro-L-arginina metil éster
MgSO₄ - Sulfato de Magnésio
MnPO - Núcleo pré-óptico mediano
mRNAs – Ácidos ribonucléicos mensageiros
MTL - Camada de células mitrais
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfate
NaH₂PO₄ - Fosfato de sódio
NaHCO₃ - Carbonato de sódio
NH - Neurohipófise
n-NOS - Enzima sintase de óxido nítrico neuronal
NOA – Núcleo anterior olfatório
NO - Óxido nítrico
NO₂⁻ -Nitrato
NO₃⁻ - Nitrito

NOS - Enzima sintase de óxido nítrico
NT - Neurotransmissor
O₂ - Oxigênio
O₃ - Ozônio
OCVs - Órgãos circumventriculares
ODQ - 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one
OT [³H] – Oxitocina Triciada
OVLT – Órgão vasculoso da lâmina terminal
PLC - Fosfolipase C
PIP₂ - Fosfatidil inositol bi-fosfato
PMSF - Fenil metil sulfonil fluoreto
PVN - Núcleo paraventricular
QO - Quiasma óptico
R - Receptor
RE - Retículo endoplasmático
RNAs - Ácidos ribonucleico
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real.
SIN-1 - Cloreto de 3-morpholinylsydnoneimine
SFO - Órgão subfornicial
SNC - Sistema nervoso central
SNP - Nitroprussiato de sódio
SOD - Enzima superóxido desmutase
SON - Núcleo supra-óptico
TRIS – Tris-hidroxi-metil-amino-metano
ZNDPBG - Zinco deuteroporfirina 2,4-bis glicol

RESUMO

Este estudo investigou a participação de óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) na regulação da secreção de peptídeo atrial natriurético (ANP), em condição basal ou estimulada por variações na osmolalidade dependente de sódio em explantes de bulbo olfatório (BO) de rato *in vitro*. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos pesando 220-250g, mantidos sob condições controladas de temperatura (23-25°C) e iluminação (12 h de luz/12 h de escuro). Os animais foram decapitados, os BOs retirados e mantidos em solução de tampão fosfato (2 a 5 °C) até a pré-incubação (60 min) para padronização da secreção basal de ANP. Após este tempo o meio foi trocado e nova incubação com as drogas teste ocorreu por mais 30 min. A solução nutriente utilizada foi Krebs mantida em atmosfera de O₂ (95%) e CO₂ (5%) em pH 7,4 a 37 °C com agitação contínua (50 ciclos/min) em banho tipo Dubnoff. A concentração de ANP ou nitrato (metabólito exclusivo de NO) foi medida em amostras de meio por técnica de radioimunoensaio por duplo anticorpo ou quimiluminescência respectivamente. Medidas indiretas de atividade de NO sintase (NOS) intracelular foram realizadas por técnica de cintilação líquida para ¹⁴C-citrulina formada (NO por estequiometria) a partir da captação pelo tecido de ¹⁴C-L-arginina. Os resultados expressos em média ± erro padrão da média foram comparados e as diferenças estatísticas (95%) confirmadas por análise de variância e pós-teste de Neuman Keuls. Os resultados mostraram que a secreção de ANP foi estimulada e a produção de nitrato (NO₃) inibida por aumento da osmolalidade de 280 para 340 mOsm/Kg H₂O. Efeito inverso foi observado quando a osmolalidade foi diminuída de 280 para 240 mOsm/Kg H₂O, indicando que o BO pode responder com a ativação de vias inibidoras (ANPérgicas) de sede preferencial para sódio quando for detectado o aumento da oferta desse íon. Similar aumento da secreção de ANP ocorreu após a adição de l-nitroarginina metil éster (L-NAME), um inibidor da NOS, e diminuição, após tratamento com nitroprussiato de sódio (SNP) e cloreto de 3-morpholinylnsydnoneimine (SIN-1), doadores de NO, em condição basal ou estimulada por sódio hipertônico (340 mOsm/Kg H₂O), sugerindo que o NO pode atuar de forma tônico-inibitória sobre a secreção basal de ANP e atenuar sua resposta secretora resultante a incremento de concentração de sódio e osmolalidade no meio. Essa inibição nitrérgica pode ocorrer via produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), desde que adição de um inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), o 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) resultou em aumento da secreção de ANP inibida por SIN-1 na condição de iso ou hiperosmolalidade. Individualmente, ODQ só estimulou a secreção de ANP em condição basal, sugerindo que nessa condição a produção de GMPc não seja suficiente para manter inibida a secreção de ANP. O monóxido de carbono (CO) poderia ser um fator restritivo para a produção de GMPc e NO, desde que a diminuição da produção de CO por por Zinco deuteroporfirina 2,4-bis glicol (ZNDPBG), um inibidor de Hemeoxigenase (enzima de síntese de CO), resultou em diminuição da liberação de ANP e aumento da produção de C¹⁴-citrulina, em condição iso ou hiperosmótica. Concluindo, este estudo reúne evidências que confirmam a reatividade do BO em liberar ANP como resposta a variações de osmolalidade dependente de sódio, a qual, pode ser modulada de forma inibitória por NO via GMPc. Finalmente, que este mecanismo inibidor pode ser limitado pela produção de CO como consequência da produção de NO.

Palavras-chaves: peptídeo natriuretico atrial, bulbo olfatório, óxido nítrico, monóxido de carbono, osmolalidade, sódio.

ABSTRACT

This study was performed to investigate the role of nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) in the regulation of basal or hypertonic sodium-induced atrial natriuretic peptide (ANP) secretion from *in vitro* olfactory bulb (OB) explants. Male adult rats weighting 230-250 g were maintained under environmental controlled conditions of temperature (23-25 °C) and illumination (12 h light/12 h dark). The rats were killed by decapitation and OB extirpated and dissected under ice cold phosphate buffer solution (2-5 °C). The BOs were distributed into individual tubes and pre-incubated (60 min) into Dubnoff bath immersed in Krebs salts solution under 95% O₂ and 5% CO₂ gaseous atmosphere, 37 °C, pH 7,4 and continuous shake (50 cycles/min). Samples of medium were collected and frozen at -70 °C for posterior measures of ANP by double antibody radioimmunoassay, nitrate (metabolite of NO) by quimiluminescence and ¹⁴C-citruline by liquid scintillation beta emissions count techniques (indirect measure of NO sintase activity). The data were presented as median±SEM and difference between groups compared by one way ANOVA and Newman Keuls applied as post test. The results showed direct relation between ANP release and sodium-induced osmolality changes (280 to 340 mOsm/Kg H₂O or 280 to 240 mOsm/Kg H₂O). In opposition, inverse behavior occurred to nitrate production after similar changes on sodium concentration in the medium (0,15 to 0,19 or 0,15 to 0,13 M) suggesting that OB may to control increases in extracellular sodium levels by stimulating ANP release or inhibiting NO production. In fact, the use of donors as 0,3 mM sodium nitroprussiate (SNP) and 0,3 mM 3-Morpholinylsydnoneimine Chloride (SIN-1) or the inhibitor of NOS 0,5 mM 1-nytroarginine methyl ester (L-NAME) induced decrease or increase, respectively, in ANP release to the medium. These effects may be occurred via cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesis since that addition of 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ), a inhibitor of soluble guanilate cyclase (sGC), induced a significant increase in ANP release inhibited by SIN-1. ODQ individually only stimulated the basal ANP release suggesting that under hypertonic sodium stimulated condition the endogenous cGMP production follow the lower NO synthesis activity. These low NO production may depend of high CO levels since that blockage of Hemeoxigenase (enzyme that synthesize CO) by Zinco deuteroporfirina 2,4-bis glicol (ZNDPBG) induced decrease in ANP release and increase in ¹⁴C-citruline production. This study showed evidences that confirm the ANP neurosecretor osmoresponsivity may depend of NO inhibitory mechanism via cGMP. The synthesis of NO and cGMP (indirectly), by your hand, may to depend of a negative feedback activated by CO production.

Keywords: peptide atrial natriuretic, olfactory bulb, nitric oxide, carbon monoxide, osmolality, sodium.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Equilíbrio hidrossalino

A manutenção do equilíbrio hidrossalino ou hidroeletrolítico depende de uma precisa regulação da osmolalidade bem como de volume dos fluidos corporais que por sua vez, dependem de rigoroso controle da oferta de sódio para o meio extracelular, visto que este íon corresponde ao elemento de maior concentração neste compartimento e, portanto, o maior determinante da osmolalidade plasmática (Antunes-Rodrigues e cols., 2004).

O equilíbrio hidrossalino é imprescindível para a sobrevivência do indivíduo e prioritariamente é mantido pela regulação da ingestão de água e sódio, bem como pela excreção ou reabsorção, principalmente pelos rins, em casos de excessos ou perdas fisiológicas e patológicas destes dois componentes, respectivamente.

A perda hipotônica de sódio por vias excretoras (ex. glândulas sudoríparas) está associada à perda de volume intra e extracelular (hipovolemia) é detectada pelo sistema nervoso central (SNC) e estimula respostas neuroendócrinas que resultam em indução à sede e ao apetite ao sódio ou diminuição da excreção de água pelos rins moduladas pelo ADH, hormônio antidiurético liberado pela neurohipófise a fim de poupar água para corrigir perda de volume. Em sentido contrário, o aumento da oferta hipertônica de sódio reflete a transferência de volume celular para o compartimento extracelular a qual é sinalizada por sede e inibição do apetite ao sódio (hiperosmótica), que invariavelmente resulta em hipervolemia. Esta condição também aumenta a liberação de ADH que agirá

poupando água e excretando sódio renal e assim diluindo o plasma (para revisão Fitzsimons, 1998).

Portanto, a sede é estimulada pela desidratação celular que pode ocorrer tanto pela diminuição do volume sanguíneo, denominada sede extracelular (por exemplo: hemorragia, diarreia) quanto pelo aumento da osmolalidade plasmática, denominada sede intracelular (por exemplo: sobrecarga intravenosa de solução hipertônica ou dieta hiper sódica). O mecanismo de correção de hipertonidade mostra-se bem eficiente, e sensível, pois aumentos de 1 a 2% da osmolalidade podem provocar respostas neuroendócrina e indução da ingestão de água, sendo que apenas uma redução de aproximadamente 10% de volume plasmático é capaz de gerar tal estímulo (Para revisão, Antunes-Rodrigues e cols., 2004.).

Então, em condições de equilíbrio dinâmico (homeostase) limites alostáticos (condições adaptativas funcionais) de balanço hidrossalino são regulados para garantir as condições fisiológicas. A perda de sódio resulta em perda de volume e na perda inevitável de água nela dissolvidos. O equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelulares é, portanto, a estratégia mais eficiente para garantir trocas de água e outros solutos entre os meios intra e extracelular.

Por fim, variações da concentração de sódio podem alterar a osmolalidade do líquido extracelular, que no plasma corresponde a cerca de 280-290 mOsm/Kg de H₂O, e conseqüentemente, geram variações de volume no plasma que são rigorosamente monitoradas e podem ser detectadas pelo SNC por osmorreceptores, neurônios sensíveis a fluxos bidirecionais de água ou sódio através da membrana plasmática. Estas células informam as alterações no balanço de íons e líquidos corporais ao hipotálamo e outras

regiões do SNC, envolvidas com a regulação do balanço hidroeletrolítico, cujo processamento permite respostas reguladoras neuroendócrinas integradas garantindo a manutenção do balanço hidroeletrolítico por vias humorais ou neurais (Antunes-Rodrigues e cols., 2004). Na região anterior ao terceiro ventrículo, esses sensores detectam variações de osmolalidade e concentração de sódio nos chamados órgãos circunventriculares (OCVs). Estes neurônios (osmorreceptores) estão conectados ao sistema renina-angiotensina sistêmico o qual veremos com mais detalhes a seguir. A sede pode ser induzida por ativação destes neurônios ou por ativação dos neurônios angiotensinérgicos diretamente nos OCVs ou AV3V como mostrado na Figura 1.

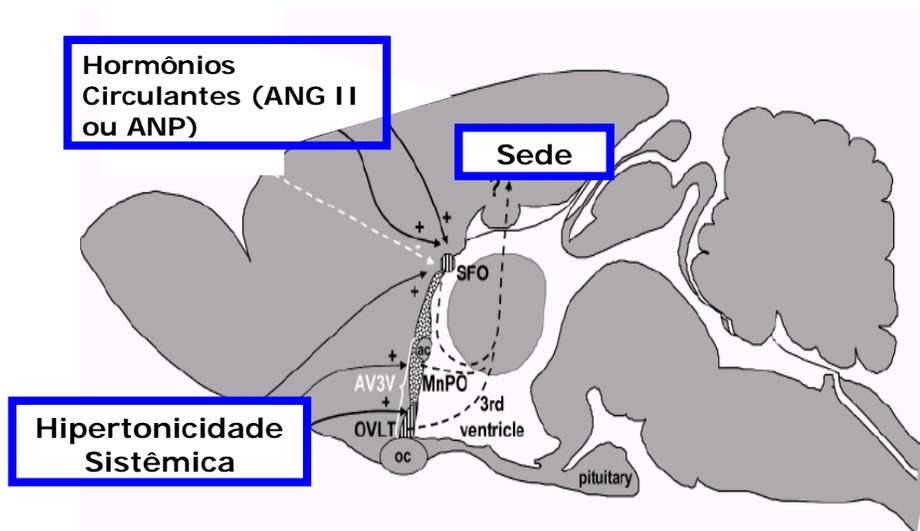


Figura 1. Regulação da ingestão de água promovida pelo sistema angiotensinérgico agindo sobre os órgãos circunventriculares. A sede eliciada pela hipertonicidade plasmática ou ANG II é antagonizada por ANP. OVLT- órgão vasculoso da lâmina terminal; SFO- órgão subfornicial; MnPO- núcleo pré-óptico mediano; AV3V- área Antero-ventral do terceiro ventrículo; AC- comissura anterior; OC- quiasma óptico. Mckinley & Johnson, 2004.

Desde a década de 60 (Grossman, 1960 e 1969; Covian e Antunes-Rodrigues, 1963) encontramos evidências que o hipotálamo é um importante núcleo regulador deste balanço. Atualmente, alguns estudos demonstram a existência de vários circuitos hipotalâmicos integrativos que estimulam outras áreas, integrando um circuito neural que participaria desta regulação e, portanto, respondem a variações de volume e osmolalidade do plasma, como veremos a seguir.

1.2 Circuitos hipotalâmicos e límbicos reguladores do balanço hidrossalino.

Em meados da década de 30 (Richter, 1936) e 40 (Covian e cols., 1946), foi demonstrado que a extirpação cirúrgica das adrenais resultava em um aumento acentuado da ingestão de sal, sugerindo um importante papel deste órgão como um agente intermediário para poupar sódio, cuja ausência poderia ativar mecanismos cerebrais determinantes do apetite ao sódio. A conexão que faltava ser estabelecida entre as adrenais e o sistema nervoso central foi enfim concretizada com a descoberta de um peptídeo que age provocando aumento de pressão por sua ação vasoconstritora e pela retenção indireta de volume ao estimular a produção de mineralocorticóides adrenais, como a aldosterona.

Esse peptídeo é a angiotensina II (ANG II), produzida a partir da conversão da angiotensina I (ANG I), pela enzima conversora de angiotensina (ECA), principalmente nos

pulmões. Sendo que a diminuição da perfusão (fluxo sanguíneo) renal, que pode ser causada por hipovolemia, é o principal estímulo para o aumento da ANGII circulante, pois promove a liberação de renina pelas células justaglomerulares renais, esta enzima, por sua vez promove a conversão do angiotensinogênio na corrente sanguínea em Angiotensina I. A ANG II além de seus efeitos pressóricos também atua estimulando a ingestão de água na área septal e de sal e água no hipotálamo (para revisão ver Fitzsimons, 1998).

Outros estudos desenvolvidos por Covian e Antunes-Rodrigues (1963), viriam demonstrar que lesões de estruturas hipotalâmicas comprometiam o controle estimulador da região ântero-medial (onde hoje se identifica o núcleo paraventricular - PVN) e o controle inibidor da porção medial e lateral do hipotálamo sobre a ingestão de sódio.

A partir destes estudos novas áreas foram caracterizadas como importantes centros de controle do apetite seletivo para sódio ou água. Por exemplo, o complexo amigdalóide que é uma área que possui conexões com o hipotálamo foi investigado por Gentil e cols (1968) e Cox e cols (1978), os quais demonstraram a existência de um controle antagônico de ingestão de sódio e estimulante para a ingestão de água, desde que lesões bilaterais do núcleo córtico-medial aumentaram a ingestão de sódio e diminuíram a ingestão de água, enquanto que lesões do núcleo baso-lateral diminuíram preponderantemente a ingestão de sódio.

Por outro lado, lesões da porção medial ou lateral da área septal, (que possuem conexões neurais tanto com o hipotálamo como com o complexo amigdalóide) resultaram na perda de um importante componente inibidor da ingestão de sódio. Quando as lesões foram estendidas à região como um todo, uma resultante diminuição da ingestão de água ocorreu em oposição a potenciação do estímulo de ingestão de NaCl. (Gentil e cols., 1968;

Chiaraviglio, 1969). E ainda lesões extensivas no bulbo olfatório (BO), também resultaram em aumento da ingestão de sódio, ou seja, perdia-se um componente inibidor da ingestão de sódio (Chiaraviglio, 1969).

Por fim, um circuito hipotético (figura 2) , no que diz respeito aos núcleos envolvidos com a regulação da ingestão de água e sal, o hipotálamo anterior apresenta uma regulação antagônica, a estimulação da parte anterior medial (HAM), favoreceria a ingestão de sal, enquanto que a ativação da região ântero-lateral (HAL) inibiria a ingestão. A partir de conexões com outras regiões como a amígdala, que também parece conter núcleos com ações antagônicas, pois a estimulação do complexo amigdalóide baso-lateral, reforçaria a regulação exercida pelo hipotálamo anterior medial, e ao mesmo tempo inibiria a porção ântero-lateral, a fim de aumentar a ingestão de sódio em situações de déficit deste elemento. Já a região córtico-medial realizaria regulação inversa, reforçaria a ativação da região HAL e inibiria (HAM), que resultaria em inibição da ingestão de sódio. E ainda a área septal e o bulbo olfatório, adicionalmente modulariam a região inibidora da amígdala e do hipotálamo, contribuindo com a resposta inibidora à ingestão de sal exercida por essas áreas. (Antunes-Rodrigues, e cols. 2004).

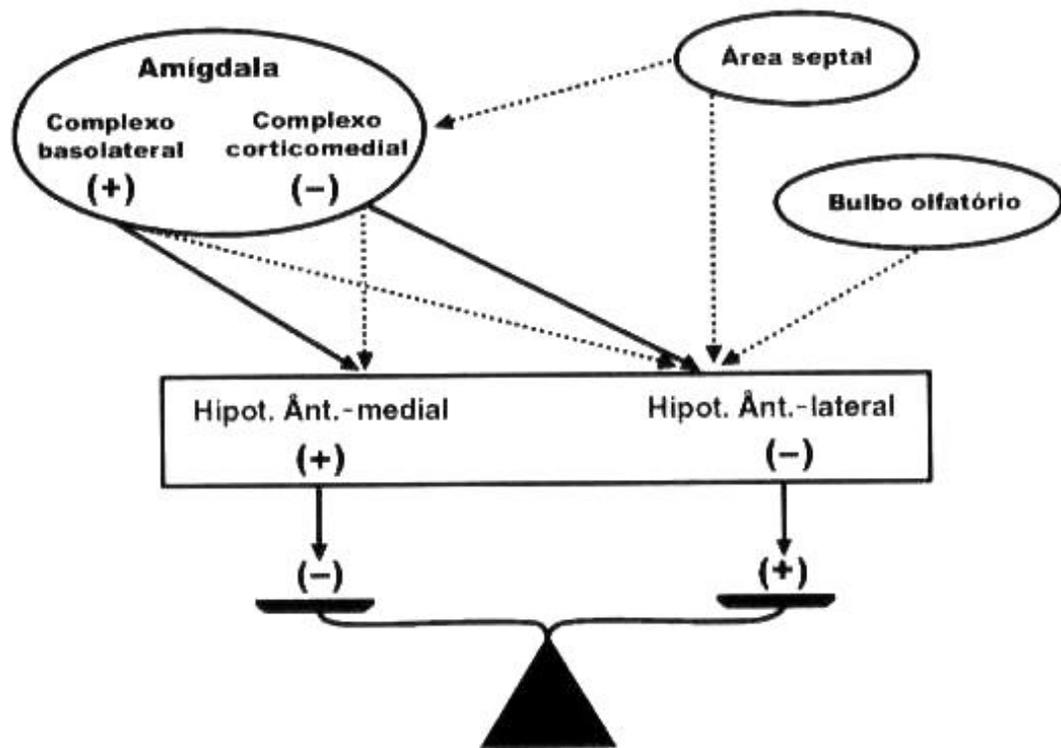


Figura 2. Circuito hipotético de regulação da ingestão de sal, idealizado por Covian e cols., 1975, envolve os núcleos hipotalâmico anterior, complexo amigdalóide, que possuem regiões antagônicas para regulação da ingestão de sal. A área septal e bulbo olfatório promovem modulação das regiões inibitórias, contribuindo para este efeito. Na balança o sinal negativo significa perdas e o positivo significa ganhos de sódio circulante. Então o sistema tenta equilibrar a balança ou estimulando (+) ou inibindo (-) a ingestão de sódio

Inúmeras investigações a partir de então foram realizadas com o intuito de desvendar possíveis circuitos envolvidos no controle cerebral do comportamento de ingestão seletiva para sal e água. Os primeiros estudos que determinaram ações de transmissores sinápticos nos circuitos que regulam a homeostase dos líquidos corporais foram publicados por Grossman (1960, 1969) na década de 60. Estes estudos demonstraram que a estimulação colinérgica e noradrenérgica de regiões hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas provocavam um aumento na ingestão de água e alimento.

Por outro lado, outras investigações mostraram que a estimulação colinérgica e angiotensinérgica da região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) causou um rápido aumento na ingestão de água seguida de natriurese (aumento da excreção de sódio) em animais saciados (Grossman 1969; Antunes-Rodrigues e McCann 1970; Fitzsimons 1970; Fitzsimons e Stricker 1971).

Adicionalmente, evidenciou-se que a injeção intracerebroventricular (icv) de carbacol (um agonista colinérgico) resultou em dramática natriurese e antidiurese, semelhante aos efeitos observados com a injeção central (icv) de solução salina hipertônica (Dorn e Porter 1970). Estes achados mostraram que é possível mimetizar respostas fisiológicas ao aumento de osmolalidade no líquido extracelular com a ativação de receptores colinérgicos no hipotálamo, ou seja, significando que projeções colinérgicas para esta região poderiam representar um circuito importante sinalizando para a regulação do desequilíbrio osmótico.

Estudos subseqüentes mostraram que agonistas e antagonistas colinérgicos e alfa-adrenérgicos administrados na área septal, AV3V ou terceiro ventrículo alteravam a resposta natriurética e antidiurética estimulada por carbacol (Dorn e cols., 1970; Morris e cols., 1976; Saad e cols. 1975 e 1976; Camargo e cols., 1976 e 1979; Franci e cols., 1980, 1983, Menani e cols., 1984; Rocha e cols., 1985, 1999). Em outras investigações observou-se que a fentolamina, um antagonista alfa-adrenérgico, aboliu a natriurese estimulada por microinjeção de solução salina hipertônica, norepinefrina ou carbacol no terceiro ventrículo. Adicionalmente, a administração de isoproterenol, um agonista beta adrenérgico, resultou em redução da excreção renal de sódio e potássio, efeito inverso obtido pela administração isolada de propanolol, um beta-bloqueador, que também potenciou a resposta natriurética quando associado ao carbacol. O bloqueio colinérgico com

atropina diminuiu a resposta a norepinefrina e suprimiu a natriurese resultante a injeção de solução salina hipertônica (Morris e cols., 1976 e 1977; Perez e cols., 1984).

Estes dados sugerem que um importante eixo de informação pode depender da atividade colinérgica hipotalâmica e septal, a qual atuaria estimulando a ingestão associada à retenção renal de água com conseqüente aumento da natriurese e, que estas ações podem sofrer modulações inibitórias de vias noradrenérgicas centrais, estabelecendo assim um balanço de ganhos e perdas na manutenção da oferta de sal e água para organismo, resultante a ação de dois sistemas classicamente antagônicos.

Por outro lado, o controle da ingestão de sódio pode receber influência da ação periférica de sensores de sódio e sua relação com o sistema renina-angiotensina-aldosterona. No hipotálamo, os sensores que detectam variações de osmolalidade e concentração de sódio estão localizados, principalmente, em órgãos circumventriculares (OCVs). Estes neurônios especializados estão conectados ao sistema renina-angiotensina central e podem ser modulados pelo sistema renina-angiotensina sistêmico. A sede pode ser eliciada por ativação destes neurônios ou por ativação dos neurônios angiotensinérgicos diretamente. (Figura.1) (Geerling e Loewy, 2008; Fitzsimons, 1998)

Como vimos o hipotálamo é um importante centro regulador do balanço hidrossalino então vamos detalhar alguns dos aspectos relevantes desta regulação.

1.3. O sistema hipotálamo-neurohipofisário e o controle da excreção de água e NaCl.

O aumento da concentração de sódio plasmático pode ser detectado pelo OVLT ou SFO via osmorreceptores (Jonhson e Gross, 1993), além de informações sobre pressão arterial, via tronco cerebral, oriundas da ativação de receptores sensíveis ao aumento de volume do plasma (barorreceptores), podem ativar o sistema hipotálamo-neurohipófise (Stricker e Verbalis, 1986, Antunes-Rodrigues e cols., 1992) gerando uma resposta neuroendócrina que resulta em correções da osmolalidade plasmática pela perda renal de sódio estimulada por peptídeo natriurético atrial (ANP) (Rosenzweig, 1991), ocitocina (OT) (Soares e cols., 1999), ou retenção renal de água induzida por ADH ou AVP (Arima e cols. 1999), ver figura 3. (para revisão Antunes-Rodrigues e cols., 2004);

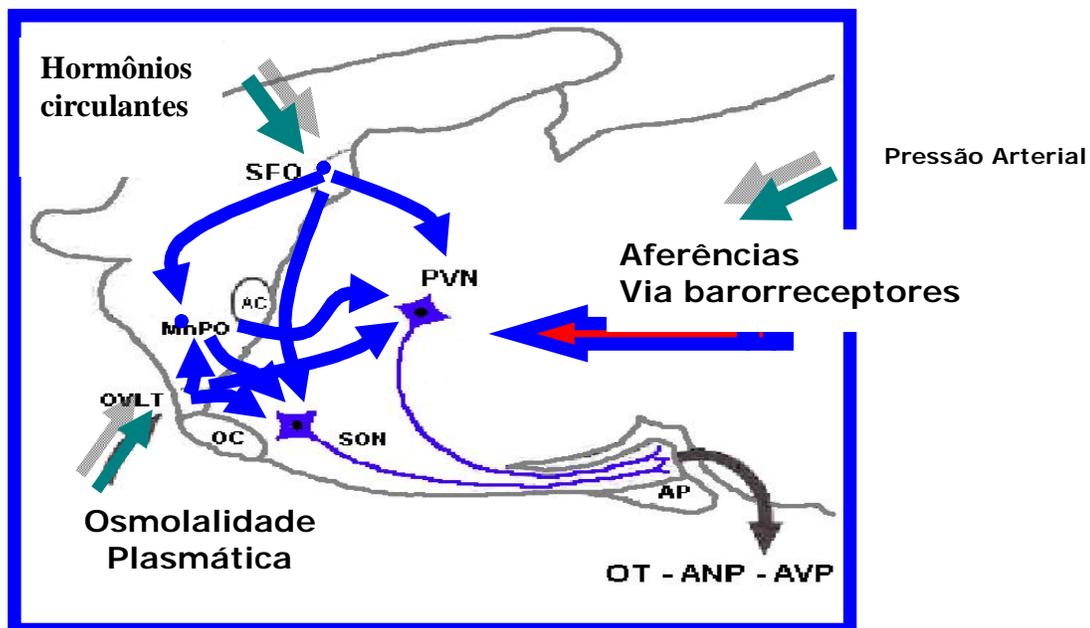


Figura 3 Esquema representativo das interações a partir das informações recebidas (setas com sombra) sobre a osmolalidade plasmática (aumento da concentração de sódio), pressão arterial e hormônios circulantes, as estruturas da lâmina terminal (OCVs, OVLT, MnPO e SFO) ativam núcleos hipotalâmicos PVN e SON responsáveis pela liberação de neurohormônios (OT, AVP e ANP) na hipófise posterior (neuro-hipófise) afim de regular essas variações detectadas. (adaptado de Antunes-Rodrigues)

O sistema hipotálamo-neurohipofisário está localizado na parte medial do hipotálamo anterior e compreende o núcleo paraventricular (PVN) em par, um de cada lado da parede dorso-lateral do terceiro ventrículo e o Núcleo Supra-óptico (SON), também pareado. Os pericários dos neurônios magnocelulares responsáveis pela síntese e liberação de OT e AVP estão localizados em ambos os núcleos PVN e SON. O PVN contém neurônios preponderantemente ocitocinérgicos e o SON, vasopressinérgicos. Os axônios desses neurônios formam o trato hipotálamo-hipofisário, os quais se encerram na neurohipófise. Alguns desses axônios terminam na eminência mediana em justaposição aos capilares das veias portais, mas, a maior parte projeta-se para o lobo neural (Brownstein e cols., 1980; Renaud e Bourque, 1991; Armstrong, 1995; Hatton, 1997).

A AVP e OT liberadas na eminência mediana são transportadas pelos vasos portais ao lobo anterior da glândula pituitária onde eles atuam estimulando a liberação de ACTH e prolactina, respectivamente (McCann, 1957; McCann e cols., 1959; McCann, 1999). A OT e AVP liberadas pelo lobo neural são transportadas, em parte, pelos vasos portais curtos ao lobo anterior, e são conduzidas no sangue que parte de ambos os lobos pelas veias hipofisárias, que retornam ao coração (Porter e cols., 1983).

A OT e AVP são sintetizadas e liberadas por neurônios magnocelulares neurosecretores classificados em subtipos produtores de AVP e OT. Algumas evidências para experimentos qualitativos de RT-PCR em unidades celulares confirmaram o fato da maioria dos neurônios magnocelulares co-expressarem RNAs (RNAm) para ambos os peptídeos. Além disso, estas expressões foram encontradas virtualmente em todos os neurônios magnocelulares no SON do hipotálamo (Xi e cols., 1999). Mudanças no padrão de descarga e frequência de neurônios magnocelulares em resposta a significativos

estímulos fisiológicos regulam os níveis circulantes de seus hormônios secretados (Renaud e Bourque, 1991; Grindstaff e cols., 2000).

Os perfis eletrofisiológicos de neurônios produtores de OT e AVP podem ser distinguidos uns dos outros, e, daqueles da zona perinuclear imediatamente adjacente (Armstrong e Stern, 1998). Neurônios ocitocinérgicos possuem propriedades que favorecem a produção de salvas de pequenos potenciais, os quais são ampliados durante a lactação (Stern e Armstrong, 1996; Lambert e cols., 1993). Em contraste, neurônios vasopressinérgicos no hipotálamo exibem atividade elétrica em fases que dependem de propriedades intrínsecas de membrana e é influenciada por fatores extrínsecos como a osmolalidade plasmática, volume sanguíneo e pressão (para revisão ver Armstrong, 1995).

O papel da OT na natriurese, e, na liberação de ANP estimulada por expansão de volume foi cuidadosamente investigada (Haanwinckel e cols., 1995). Em ratos submetidos à sobrecarga hídrica e diurese contínua, a OT induziu significativo aumento proporcional à dose na excreção de sódio, na osmolalidade urinária e diminuição no volume urinário. A concentração de ANP plasmático aumentou significativamente após a injeção i.p. ou i.v. de OT, a qual gerou uma intensa resposta natriurética. A expansão de volume extracelular (BVE) provocada por injeções intra-atriais de solução salina induziu um rápido aumento da concentração de OT e ANP no plasma e concomitante diminuição nos níveis de AVP plasmática (Haanwinckel e cols., 1995). Quando uma expansão de volume hipertônico foi realizada com a injeção de 0,3 M de NaCl, a qual provavelmente estimula osmореceptores ou receptores de sódio, somando-se aos barorreceptores, resultou em aumento da liberação de ANP e OT semelhante àquele produzido por BVE isotônica. Entretanto, ao contrário da BVE isotônica, a BVE hipertônica induziu um aumento significativo, mas transitório (5 min)

aumento nos níveis de AVP plasmático. A magnitude da resposta secretória de OT foi tão intensa quanto o estímulo de sucção, um clássico estímulo para a liberação de OT. No entanto, a liberação de OT por sucção foi associada com um aumento do ANP plasmático que foi prevenido pela injeção (i.v.) prévia de um antagonista de OT, reforçando a hipótese de que a ação secretora de ANP pela OT é fisiologicamente significativa (Haanwinckel e cols., 1995).

Por outro lado, injeções de um anticorpo anti-ANP não alteraram os níveis basais de OT, mas bloquearam a secreção de OT estimulada por aumento de osmolalidade (Antunes-Rodrigues e cols., 1993b). Portanto, foi demonstrado que o ANP hipotalâmico é necessário para estimular a liberação de OT na condição de hiperosmolalidade (Chriguer e col., 2001). Estes resultados reunidos reforçam a hipótese de que a expansão de volume isotônico via atividade barorreceptora aferente para o tronco cerebral estimula a liberação intra-hipotalâmica de ANP, a qual provoca a liberação de OT pela neurohipófise, esta OT circula até o coração e induz a liberação de ANP. (Favareto e cols., 1997)

Outros sistemas neurotransmissores podem atuar regulando o balanço hidroeletrólítico por ação intermediada pelo ANP central. Algumas evidências implicaram o sistema colinérgico nesta regulação, como por exemplo, a estimulação por carbacol aumentou a excreção de sódio, enquanto lesões na região AV3V diminuiram essa excreção. A natriurese induzida por estimulação colinérgica é acompanhada por um dramático aumento na concentração plasmática de ANP e conteúdo de ANP no hipotálamo médio-basal, neurohipófise e, particularmente, pituitária anterior, mas sem provocar variações no conteúdo de ANP dos pulmões ou dos átrios direito e esquerdo (Baldissera e cols., 1989). O aumento marcante no conteúdo de ANP no hipotálamo basal, neurohipófise e

adenohipófise, sugerem que a natriurese resultante daquela estimulação é conseqüente, em parte, da liberação de ANP do cérebro (Baldissera e cols., 1989).

A contribuição do sistema ANP cerebral para os níveis de ANP plasmático foi demonstrado pela diminuição de ANP e da natriurese induzida por BVE após imunoneutralização central do ANP (Antunes-Rodrigues e cols., 1993b). Estes dados confirmam resultados obtidos por experimentos similares em ovelhas por Charles e cols., (1991) e indicam que o ANP liberado a partir de neurônios ANP hipotalâmicos é crucial para o aumento da secreção de ANP pelo coração, o qual medeia a natriurese resultante.

O bloqueador de receptor colinérgico muscarínico sulfato de atropina, microinjetado na região AV3V não teve efeito sobre os níveis plasmáticos basais de ANP, mas, diminuíram de forma significativa a liberação de ANP induzida por BVE. Semelhantes resultados foram observados após microinjeção do alfa bloqueador fentolamina na região AV3V (Antunes-Rodrigues e cols., 1993a). Estes resultados são consistentes com a via de controle fisiológico da liberação de ANP, a qual está relacionada à distensão de barorreceptores localizados no átrio direito, arco aórtico, seio carotídeo e rins, os quais alteram a atividade de neurônios noradrenérgicos aferentes a partir do tronco cerebral cujos axônios estão direcionados para a região AV3V (Gutkowska, e cols., 1997).

Por sua vez, a ANG II e o ANP têm ações opostas sobre a ingestão e excreção de sal e água modulada por sistemas neurotransmissores como vimos na Figura 1. O aumento da liberação de ANP por neurônios que se conectam com neurônios efetores do comportamento de ingestão inibiu a resposta estimuladora de ANG II desde que a injeção prévia de fenilefrina (um agonista α_1 -adrenérgico) ou clonidina (um agonista α_2 -adrenérgico) na região AV3V reduziu significativamente a ingestão de água induzida por

ANG II. A injeção de agonista α -adrenérgico induziu um significativo aumento na concentração de ANP plasmático e no conteúdo de ANP no bulbo olfatório, AV3V, hipotálamo médio-basal e eminência mediana (Bastos e cols., 2001). Estes achados mostram que o efeito inibitório de agonistas α -adrenérgicos sobre a ingestão de água induzida por ANG II pode ser explicada pelo aumento no conteúdo e liberação de ANP a partir destas estruturas cerebrais.

A presença de um fator natriurético no SNC mediando a natriurese induzida por manipulação do cérebro em diferentes modelos experimentais foi postulada por Sedlakova e cols. (1969), os quais reportaram a purificação de um fator natriurético hipotalâmico que eles acreditavam fosse um análogo da OT. Independentemente, Orias e McCann (1970a, 1970b, 1972a e 1972b) foram hábeis em demonstrar que AVP e OT têm atividade natriurética em ratos com sobrecarga hídrica. A diurese induzida por distensão do átrio pode ser devida à ativação reflexa do sistema neuroendócrino, resultando na liberação de ANP a partir da neurohipófise (Morris e cols., 1976).

O papel do ANP no controle do balanço hidromineral foi investigado em ratos estudando-se o efeito de lesões da eminência mediana sobre respostas natriuréticas à salina hipertônica, carbacol ou norepinefrina injetada no terceiro ventrículo. As lesões de eminência mediana induziram diabetes insípido pela interrupção do trato supraóptico hipofisário, e bloqueou a natriurese, caliurese e antidiurese seguida a injeção de salina hipertônica ou norepinefrina no terceiro ventrículo (Morris e cols., 1976, 1977). A hipofisectomia não bloqueia estas respostas, o que descarta a participação dos hormônios da pituitária anterior (Dorn e cols., 1970). Além disso, a natriurese foi mantida em ratos com diabetes insípido hereditário, com ausência de AVP (Orias e McCann 1972b),

sugerindo que a AVP não é um componente essencial da resposta natriurética induzida pela injeção de solução salina hipertônica no terceiro ventrículo. Adicionalmente, lesões de eminência mediana interromperam a secreção de hormônio natriurético, outro que não AVP, possivelmente OT, envolvida na natriurese induzida por estimulação do sistema nervoso central.

1.4. Papel do ANP na inibição da ingestão de sódio e água.

O PVN e a eminência mediana (EM), estruturas envolvidas no controle da natriurese, apresentam corpos celulares de neurônios ANP (Palkovits e cols., 1987) e elas podem responder a administrações de ANP com uma inibição proporcional a dose da ingestão de água após desidratação por 18 h ou por sede induzida por ANG II em ratos (Antunes-Rodrigues e cols., 1985; Masotto e Negro-Vilar, 1985; Nakamura e cols., 1985; Tarjan e cols., 1988; Itoh e cols., 1988; Imura e cols., 1992; Zhu e Herbert 1996) ou em ovelhas (Weisinger e cols., 1992). Além disso, doses inferiores àquelas efetivas em inibir a ingestão de água, quando injetadas na AV3V reduziram a ingestão de cloreto de sódio a 1,5% em ratos conscientes depletados de sal (Antunes-Rodrigues e cols., 1986). O ANP também suprimiu a ingestão de sal e de água induzida por desidratação e administração de ANG II (Antunes-Rodrigues e cols., 1985).

O ANP exerce seu efeito antipsicogênico (Katsuura e cols., 1986) por ação direta através da alta quantidade de receptores localizados no SFO (Gibson e cols., 1986), desde que este órgão circumventricular é também um sítio crítico para a ingestão induzida por ANG II (Figura 1). (Fitzsimons, 1998)

De fato, o pré-tratamento com várias doses de ANP microinjetadas no SFO de ratos reduziu a ingestão de água estimulada por excitação neuronal no SFO (Hattori e cols., 1988; Buranarugsa e Hubbard, 1988; Ehrlich e Fitts, 1990).

Estes estudos, em conjunto, mostraram que o hipotálamo detém um complexo sistema de regulação integrada do volume e da osmolalidade dos fluidos corporais em sincronia com áreas adjacentes como a área septal e outras estruturas telencefálicas e prosencefálicas no rato, como o bulbo olfatório e amígdala. A seguir veremos algumas evidências da participação do bulbo olfatório nesta regulação.

1.5 O bulbo olfatório e a regulação do homeostase hidrossalina

O sistema olfatório é dividido em duas regiões: bulbo olfatório principal (BO) e bulbo olfatório acessório (BOA), com aparência de córtex primitivo formado por camadas dispostas da parte próxima a superfície para parte mais interna em: camadas de células glomerulares, circundada por células periglomerulares, geralmente formando circuito inibitório, camada plexiforme externa, camada de células mitrais, camada plexiforme interna e camada granular (Figura 4)

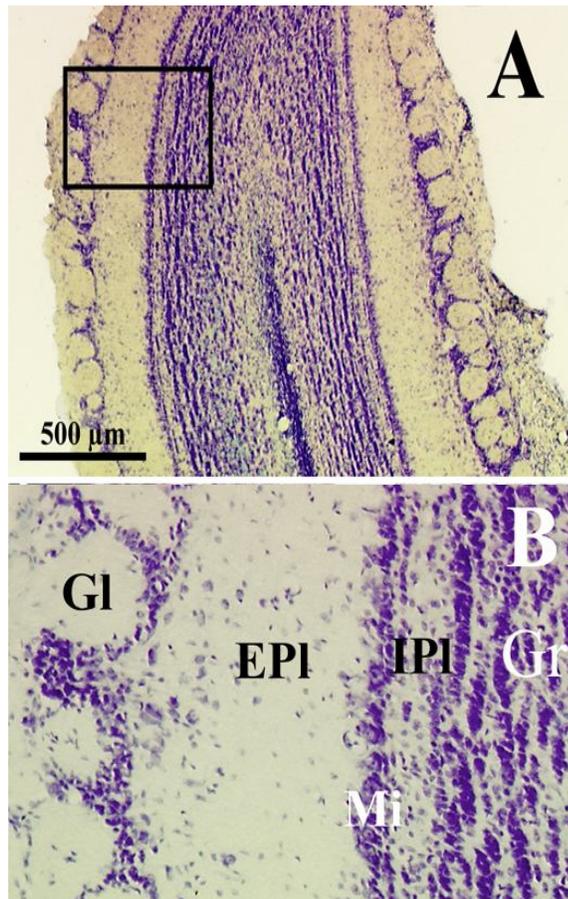


Figura 4. Distribuição de camadas no bulbo olfatório principal (BO). **A.** corte coronal de 500 μ m, em um aumento de 40x. **B.** Aumento de 100x, **GL**- Camada glomerular; **EPI**- Camada plexiforme externa; **Mi**- Camada de células mitrais; **IPL**- camada plexiforme interna e; **GRL**- camada de células granulares.

Algumas evidências sugerem a participação do bulbo olfatório na regulação do balanço de sódio em ratos. De fato, essa estrutura foi apontada como um componente inibidor no controle da ingestão de sal pelo SNC, desde que lesões desta região também resultaram em aumento da ingestão de sódio (Chiaraviglio, 1969). Mais recentemente foi demonstrado que o conteúdo de ANP no bulbo olfatório variou com a ingestão de sódio durante 24h, sendo que o aumento dos níveis de ANP nesta área foi associado a uma

diminuição da ingestão e vice-versa (Glass e cols., 1997). Estes achados sugerem que este peptídeo possa participar de correções inibitórias da reposição de sódio exercidas por este a partir do BO.

Existem ainda evidências de que há uma conexão importante entre BO e a região ântero ventral do terceiro ventrículo (AV3V), e que é necessária para manter os níveis de ANP no BO, pois lesões extensivas nesta região provocaram uma diminuição do conteúdo de ANP no BO, sugerindo que a integridade da região AV3V é essencial para a modulação dos níveis de ANP no BO (Baldissera e cols., 1989). Por outro lado, a camada plexiforme externa do BO apresenta a co-localização de ambos receptores de ANP e de ANG II (Mendelsohn e cols., 1987) sugerindo estreita relação reguladora entre estes mediadores antagônicos neste núcleo central.

Alta concentração de fibras varicosas imunoreativas para ANP, foram observadas na camada glomerular (Kawata e cols., 1985). Estudos com hibridização *in situ*, mostraram que há RNAm para ANP em várias células dispersas na camada mitral e nas camadas plexiforme interna e externa, entretanto, forte sinal de expressão de RNAm foi encontrado no pedúnculo olfatório e em várias subdivisões do núcleo anterior olfatório (NOA), com abundante expressão na parte posterior e ventral deste núcleo (Ryan e Gundlach, 1995). Embora a concentração deste peptídeo seja bem menor do que a encontrada no hipotálamo, aproximadamente 4 vezes (Kawata e cols. 1985) e em quantidade de RNAm comparando com o átrio cardíaco cerca de mil vezes menor (revisão Gutkowska, 1996).

Quanto aos sítios de ligação para ANP, estudos usando auto-radiografia, mostraram alta concentração de sítios ligantes para ²⁵I-ANP no BOA e na camada plexiforme externa do BO e moderada concentração de sítios no trato olfatório lateral (TOL) e em menor

concentração na camadas granular e glomerular, bem como, no nervo olfatório (Gibson e cols., 1986). Apesar da presença de ANP, bem como seus receptores no BO, ainda não há uma melhor abordagem sobre o verdadeiro papel deste peptídeo no BO, embora existam evidências sobre ao envolvimento do BO e a homeostase hidrossalina como veremos a seguir.

Adicionalmente, foi detectada a presença de sítios de ligação para OT (3^H) e AVP (3^H) em diferentes regiões do BO (Barberis e Audigier, 1985) sugerindo um possível papel regulador destes neurohormônios sobre a atividade hidrossalina nesta região. Segundo Yoshimura e cols., (1993), existem mRNA para receptor de OT (R-OT) no BO, nas células periglomerulares, nas células mitrais e nas células granulares, e intensa expressão de RNAm para R-OT no núcleo anterior olfatório. Outros achados mostraram uma efetiva ação da ocitocina (OT), um neurohormônio que também inibe a ingestão hidroeletrólítica, inibindo correntes espontâneas de ácido gama aminobutírico (GABA) em cultura de células mitrais (Osako e cols., 2000) e aumentando a ocorrência de potenciais excitatórios pré e pós-sinápticos glutamatérgicos em cultura de neurônios isolados de bulbo olfatório de rato (Osako e cols., 2001). Estas evidências mostram que a OT pode exercer uma atividade tônica estimulatória sobre aferências do bulbo olfatório carreadoras de atividade sensorial olfativa possivelmente envolvida com o controle da ingestão de sal.

Atualmente, vários achados demonstram que a liberação de neuro-hormônios como: ANP, OT e AVP podem ser modulados por um mensageiro atípico o óxido nítrico (NO), que também possui sua enzima de síntese no BO (Ventura e cols., 2002).

1.6. O óxido nítrico na modulação da liberação de neurohormônios hipotalâmicos.

O óxido nítrico (NO) pode ser sintetizado por sintases de óxido nítrico (NOS), pertencentes à família das citocromo P450, a qual catalisa a oxidação sequencial do grupamento guanidina do aminoácido L-arginina produzindo quantidades equimolares de L- citrulina e NO (Bush e cols., 1992), num processo que envolve cinco elétrons e é dependente de O₂ e NADPH, além de cofatores FAD, FMN e tetrabiopterina. (Alderton e cols., 2001).

Existem três isoformas de NOS: duas são constitutivas, cuja atividade depende da presença do complexo Ca²⁺ - Calmodulina (CaM), que são a isoforma 1 (neuronal ou nNos) e a isoforma 3 (endotelial ou eNOS) e uma isoforma tipo 2 (iNOS) que é ativada em situações de estresse celular (MacMicking e cols., 1997). Embora não pareça depender de aumentos da concentração de Ca²⁺ citoplasmático esta enzima, parece depender de ligação com a CaM (CHO e cols., 1992). Na figura.5. (abaixo) observamos, de forma resumida, a ativação da via de produção de NO neuronal.

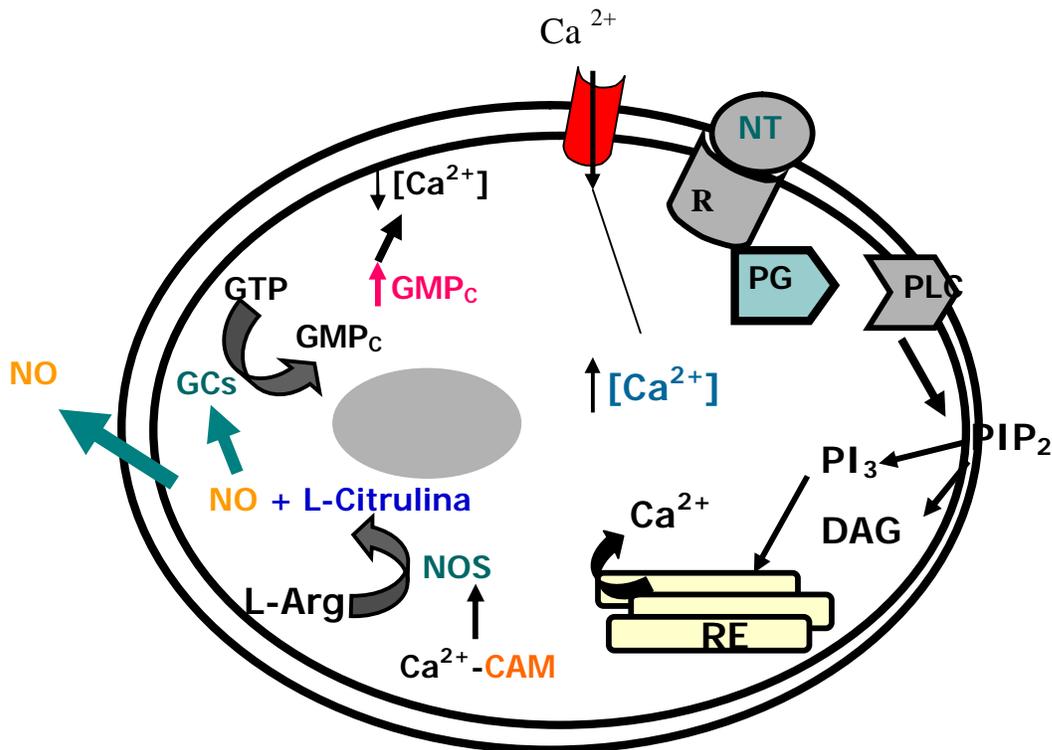


Figura 5. Produção de NO a partir da ativação por neurotransmissor (NT) e via canal de Ca^{2+} . PIP_2 - fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, IP_3 - Inositoltrifosfato, DAG- diacilglicerol, R- receptor, PLC-fosfolipase C, PG- proteína G, CAM – camodulina, L-Arg- L- arginina, RE- retículo endoplasmático, NOS- síntase de óxido nítrico, GCs- guanilato ciclase solúvel, GTP- guanosina trifosfato, GMP_c - guanosina monofosfato cíclico.

Apesar de uma meia-vida curta (5-10 s), o NO difunde-se livremente através da membrana celular podendo agir como um fator parácrino. Como produtos de seu metabolismo o íon nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) são utilizados como indicadores indiretos de sua produção (Marletta, 1989)

A presença de NOS foi detectada em várias estruturas do sistema nervoso central, incluindo estruturas envolvidas no controle do balanço de fluidos corporais como: SON e PVN (Dawson, e cols., 1991, Kadowaki e cols., 1994, Rodrigo e cols., 1994; Bhat, e cols., 1995), neurohipófise (NH) e SFO (Rodrigo e cols, 1994), no núcleo pré-óptico mediano

(MnPO) e OVLT (Bhat, e cols., 1995), apontam para uma possível participação do sistema nitrérgico na regulação hidrossalina. Inclusive segundo Bredt e cols.(1990) a NOS também está presente na camada de células granulares do BO.

Aumento significativo da atividade de NOS no hipotálamo e neurohipófise foi observado em ratos submetidos à dieta aditiva de NaCl a 0,3M (7 dias) como único alimento líquido disponível (Ventura e cols., 2002) sugerindo que a síntese de NO está ativa na condição de estresse hiperosmolar. Interessantes resultados demonstraram que o papel da ANG II na indução de sede via SFO pode em parte depender da ativação da produção de NO no SNC, desde que administração de L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester), um inibidor da sintase de óxido nítrico, no ventrículo lateral atenuou a ingestão de água estimulada por ANG II ou desidratação (Saad e cols., 1999).

De fato, algumas evidências reforçam esta hipótese desde que a administração intracerebroventricular de L-NAME, elevou os níveis de OT e AVP no plasma (Liu e cols., 1997), indicando que o NO inibe tonicamente a secreção basal destes hormônios em condições isosmóticas e isovolêmicas. Por outro lado, o L-NAME não foi eficiente em alterar a secreção de OT e ANP, mas, diminuiu a secreção de AVP após expansão hipertônica de volume (BVE- Hiper) (Ventura e cols., 2002). Em contraste, em ratos privados de H₂O por 24h (desidratados) a administração de L-NAME ou L-NMMA (NG-monomethyl-L-arginine monoacetate), ambos inibidores da NOS aumentam os níveis de OT, mas não de AVP no plasma (Summy-Long e cols., 1993), sugerindo uma maior eficiência inibidora do NO sobre a secreção de AVP na BVE e OT na desidratação possivelmente relacionado à regulação de volume do líquido extracelular.

Em contrapartida, a administração de cloreto de 3-morfolinilsidnoneimina (SIN-1) e nitroprussiato de sódio (SNP), doadores de NO, inibiram a liberação de ANP estimulada

por aumento da osmolalidade relacionada ao sódio em preparação de hipotálamo médio-basal *in vitro* (Gomes e cols., 2004). Neste estudo foi verificada a influência de outro gás o monóxido de carbono (CO) sobre a modulação nitrérgica da liberação de ANP.

O NO parece ter uma estreita relação com o CO, que tem sido apontado por inúmeros trabalhos como um mensageiro neuronal (Dawson e Snyder, 1994; Artinian e cols., 2001). O CO é produzido a partir da clivagem da molécula heme pela enzima heme oxigenase (HO), que resulta em quantidades equimolares de CO, biliverdina e ferro (Marks e cols., 1991). Ambas as isoformas da enzima HO1 and HO2 estão presentes no PVN e SON (Vincent e cols., 1994). Tanto as vias heme-HO como L-arginine–NOS interagem a estreitos níveis de relação regulando múltiplas funções neuroendócrinas (Brann e cols., 1997). Outra evidência importante para nossa investigação é a presença de HO-2 nas células mitrais do BO (Verma e cols., 1993)

Recentes investigações demonstraram que o CO pode inibir a atividade da NOS em estudos *in vitro* (Gomes e cols., 2004; Griscavage e cols., 1994). Estes achados configuram uma importante participação do NO mediando negativamente à liberação de hormônios inibidores da sede sugerindo sua participação em mecanismos dipsogênicos de acordo com variações do volume extracelular e que estes efeitos podem ser contrapostos por mediação do CO.

Adicionalmente, o fato de o ANP atuar como modulador inibitório central do comportamento de ingestão de sal e água, e de estar presente no bulbo olfatório, assim como ambas as enzimas produtoras de CO e NO priorizamos investigar isoladamente esta área a fim de verificar se há alteração da liberação de ANP a partir do BO frente a variações da concentração de sódio do meio e se esta liberação é regulada por NO e CO.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Estudar a participação do BO na regulação da homeostase de sódio com ênfase em mecanismos nitrérgicos de regulação da liberação de ANP em resposta a alterações de osmolalidade no líquido extracelular.

2.2. Objetivos específicos:

- Estudar a relação entre variações da osmolalidade, liberação de ANP e atividade nitrérgica em explantes de BO.
- Estudar o papel do NO na regulação da liberação de ANP basal ou estimulada por hipertonicidade salina (NaCl 0,3M) em explantes de BO.
- Estudar a influência do monóxido de carbono (CO) sobre a síntese de NO e liberação de ANP basal ou estimulada por hipertonicidade salina em explantes de BO..

3- MATERIAL E MÉTODOS

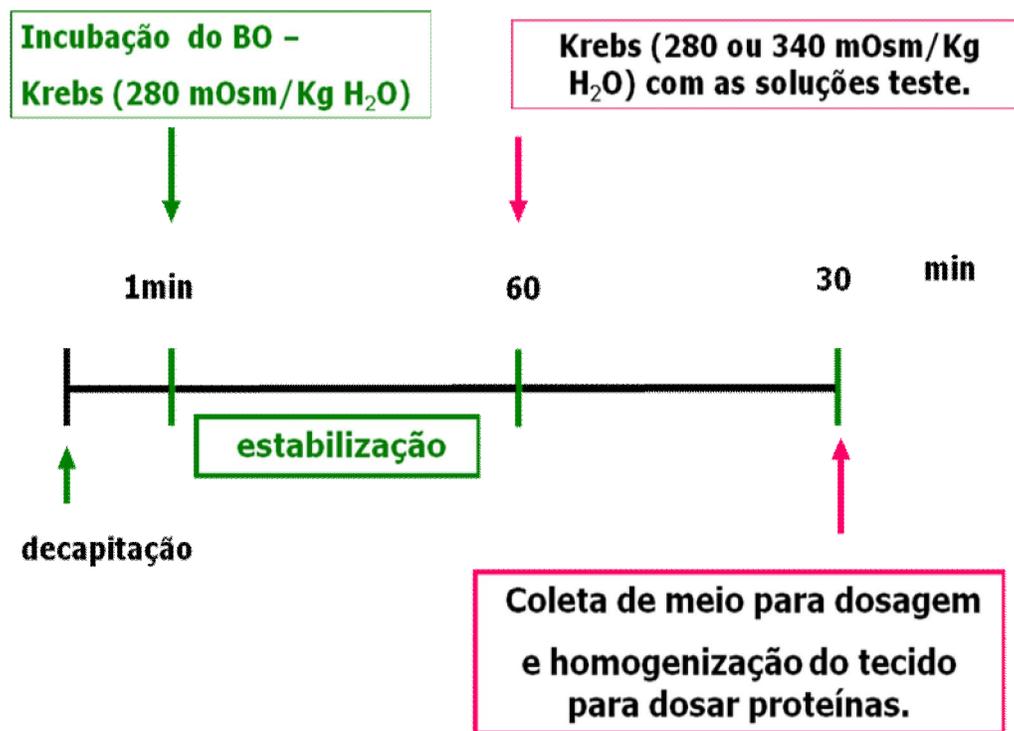
3.1 Animais:

Ratos Wistar, machos, adultos (220-250g), obtidos junto ao Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP), foram mantidos em gaiolas individuais sob condições controladas de temperatura (24-26°C) e iluminação (12 h de claro/12 h de escuro), com livre acesso a alimento.

3.2. Preparação de Explantes de Bulbo Olfatório

Após decapitação, os cérebros foram cuidadosamente removidos e o BO imediatamente extraído (até seu ponto de inserção nos hemisférios cerebrais) e transferido, para tubos de ensaio contendo 0,5 ml de Solução de Krebs – Tampão Bicarbonato (118.46 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.18 mM NaH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 24.88 mM, NaHCO₃, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O) com 1% de glicose, e pré-incubado em banho Maria, tipo Dubnoff a 50 ciclos/min em uma temperatura de 37°C durante 60 min, com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Depois do período de pré-incubação, o meio foi cuidadosamente aspirado e repostado com a solução de Krebs – Tampão Bicarbonato isosmótico (280 mOsm/kg H₂O) ou hiperosmótico (340 mOsm/kg H₂O) com ou sem as substâncias a serem testadas e re-incubados durante

30 min. A viabilidade do tecido foi testada usando KCl 56mM para examinar o efeito da despolarização celular. O meio de incubação foi retirado de cada incubação e armazenado em freezer a -70°C para quantificação de ANP e Nitrato, de acordo com esquema experimental abaixo:



Esquema 1. Desenho experimental da incubação *in vitro* de explantes de BO, estabilização das dosagens (1h) e tempo de incubação após estímulos 30min.

3.3. Técnicas:

3.3.1. Radioimunoensaio (RIE) para ANP.

A quantificação de ANP foi realizada por radioimunoensaio com duplo anticorpo específico, no Laboratório de Neuroendocrinologia – FMRP – USP (Ribeirão Preto). Amostras de tecido (BO) foram coletadas, homogeneizadas, centrifugadas a 10.000 rpm e armazenadas em freezer -70°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em ácido acético 0,1 N para quantificação do peptídeo (Gutkowska, e cols., 1984).

O radioimunoensaio consiste na preparação de uma curva-padrão, feita ensaiando-se 100 μl de padrões ANF com diluição seriada de 0.76 a 195.3 pg/tubo (1-28- Peninsula[®]), 100 μl de tampão ANP [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – Monosfosfato bibásico de sódio heptahidratado, 134.04 g/l (Dinâmica Reagentes[®]); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - Fosfato de sódio monobásico monohidratado, 69 g/l (Dinâmica Reagentes[®]); NaCl - Cloreto de sódio, 2.92g/l (Dinâmica Reagentes[®]); Albumina Bovina Fração V, 1.0 g/l (SIGMA[®] A-8022); Triton X-100, 1.0ml (SIGMA[®] T-8787); Polietilenoglicol, 6,25% (PEG PM 6000-REAGEN[®]) e NaN_3 – Azida de Sódio, 0.01% (SIGMA[®] S-8032)]; 100 μl de anticorpo primário (ANF de coelha anti-rata, antigamaglobulina de rata produzida em coelha- *rabbit anti-rat alpha ANF*, diluição 1:60.000- conseguido por imunização na FMRP/USP), diluído com soro de coelho normal 1%, 100 μl de hormônio marcado (^{125}I - ANF (1-28)) e a reação foi completada com 100 μl de segundo anticorpo (ANF de cabra anti-coelho,

antigamaglobulina de coelha produzida em cabra, diluição de 1: 20.000- fabricada por imunização na FMRP/USP), seguido de incubação “overnight” de 4 dias a 4 °C. Ao final adicionou-se 1 ml de polietilenoglicol, 6,25% (PEG PM 6000- REAGEN[®]) refrigerado para acelerar a precipitação do complexo formado. Centrifugou-se em centrífuga refrigerada 4 °C (Mod. 3 K10- SIGMA[®]), por 25min a 3.000 rpm e o sobrenadante foi aspirado e a radioatividade do precipitado foi contada em cpm no contador Gama (Cobra 5002-PACKARD[®]) com eficiência de contagem maior que 72%.

As concentrações de ANP nas amostras foram obtidas a partir desta curva-padrão anteriormente descrita. Amostras de mesmo grupo foram quantificadas em um único ensaio para evitar variações interensaios. As amostras foram quantificadas em duplicata e utilizaram-se duas curvas-padrão, sendo uma lida no início e outra no final da leitura do ensaio, para controle de pipetagem. Esses dois procedimentos, também são importantes para o controle intra-ensaio.

Devido à realização de diferentes ensaios, obtivemos diferentes valores de dose efetiva 50% (ED₅₀), afim, de corrigir essas diferenças inter-ensaios geradas sobre os valores médios basais, realizamos uma normalização, usando um fator de correção resultante da razão entre a ED₅₀ mais sensível (6.9 pg/tubo) e cada ED₅₀ do ensaio seguinte.

3.3.2. Atividade da enzima sintase de óxido nítrico (NOS).

A determinação da atividade da NOS no bulbo olfatório foi realizada por meio de uma modificação do método descrito por Bredt e Snyder (1989). Após a extirpação dos bulbos olfatórios estes foram homogeneizados em 200 μ l de solução contendo: 320 mM Sacarose, 50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT (dithiothreitol), 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 2 μ g/ml Aprotin, 1 mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride), pH 7,4 e, então, centrifugados a 10.000 g por 10 min, a 4 °C. Quarenta microlitros (40 μ l) do sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo de ensaio sendo a seguir adicionado a este 100 μ l de HEPES 20 mM (pH 7.4) contendo 1,25 mM CaCl₂, 1 mM TT e 100 mM BH₄ (Tetrahydrobiopterin), 120 μ M de NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) e 100,000 cpm de [¹⁴C]-L-arginina (270 μ Ci/mmol). Imediatamente após, o tecido foi incubando por um período de 15 min em incubadora metabólica (Dubnoff, 50 ciclos por minuto, sob uma atmosfera de 95% O₂/5% CO₂, a 37° C). No final deste período foi imediatamente adicionado aos tubos 1 ml de Resina Dowex AG 50W-X8 (200 mesh, sodium form) e centrifugado a 10.000 g por 10 min, 4°C. Quatrocentos microlitros (400 μ l) do sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo contendo 3 ml de líquido de cintilação, e posterior determinação da quantidade de [³H] citrulina em contador de cintilação beta (Contador b. LS 6500, Beckam Instruments, Inc., USA).

3.3.3 Quantificação de nitrato (NO₃).

A determinação da concentração de nitrato no BO foi realizada por técnica de quimioluminescência, através de um analisador de óxido nítrico (Nitric Oxide Analyser, modelo: NOATM 280, Siervers Instruments – USA). Esta técnica é utilizada para medir nítrito ou nitrato em fluídos biológicos

Após o protocolo experimental alíquotas 5 µl de meio de incubação foram injetados na câmara de reação onde o nitrato reage com o cloreto de vanádio formando NO, o qual, por sua vez reage com o O₃ formando dióxido de nitrogênio (NO₂⁻). O NO₂⁻ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. Isso gera uma corrente de elétrons que é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico digital, dando origem ao traçado gráfico. A área contida no traçado é então demarcada e quantificada pelo programa NOAnalysisTM Software (version 3.00PNE) de funcionamento exclusivo do sistema de análise. O coeficiente de correlação para as curvas padrões variou entre 0,98 a 1,0 e a dose mínima detectável foi de 0,5 µM. (Hampl, e cols., 1996)

3.3.4 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma) como padrão. A leitura foi feita em leitor de placas num comprimento de onda de 595nm.

Essa técnica consistiu na realização de uma curva padrão com albumina de 2000 µg/ml - 31,2µg/ml - (7 diluições seriadas 1:2), após a realização da curva padrão com quantidades conhecidas de proteína, pipetou-se 10µl destas diluições na placa de Elisa. As amostras de tecido (10 µl) foram pipetadas em duplicata, e em seguida diluiu-se o corante

(Bio-Rad Protein Assay- Cat.500-006) em H₂O MilliQ (1:5), essa solução foi filtrada e o volume de 200 µl foi pipetado em todos os poços da placa, reservou-se por 5 min e após este período foi realizada a quantificação das proteínas em leitor de microplaca- Elisa (Espectra-Max-250- Soft Max-Pro).

3.4. Análise estatística dos resultados:

Estatística descritiva: Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Estatística comparativa: O teste estatístico realizado foi ANOVA seguido de teste Newman-Keuls, para comparações entre grupos. A determinação das diferenças estatisticamente significantes levam em conta $p < 0,05$ (5% de probabilidade para a igualdade) sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para comparações com o grupo controle e + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ para comparações entre grupos tratados. O teste T, foi utilizado para análise de tratamentos com apenas 2 grupos, também com $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 Efeitos de variações de osmolalidade sobre a liberação de ANP e nitrato

Uma relação direta entre a secreção de ANP ou inversa entre a síntese de nitrato e variações de osmolalidade do meio foi observada, sendo que a diferença mais significativa foi favorável à diminuição (42%) em detrimento do aumento (23 %) para ANP e relativamente equilibrada para NO (Figura 6).

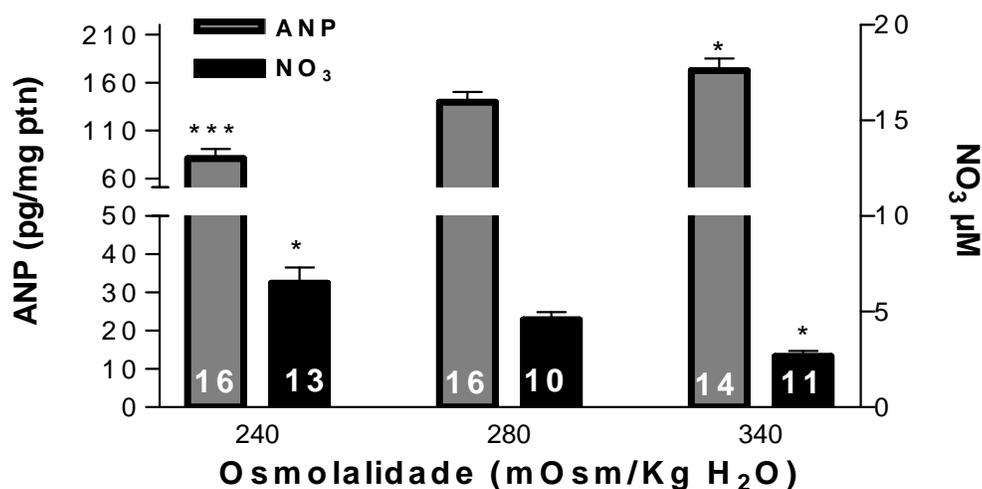


Figura 6. Efeitos de variação de osmolalidade sobre a liberação de ANP e nitrato. Os dados são apresentados como média±EPM. *p < 0,05, ***p < 0,001 para comparações entre os grupos 280 versus 240 ou 340 mOsm/Kg H₂O.

4.2. Efeito do aumento da osmolalidade sobre a atividade da sintase de óxido nítrico

O aumento da osmolalidade provocou uma diminuição na atividade da NOS (18%) no BO *in vitro*, verificada através da medida de citrulina marcada que reflete produção equimolar de NO (Figura 7).

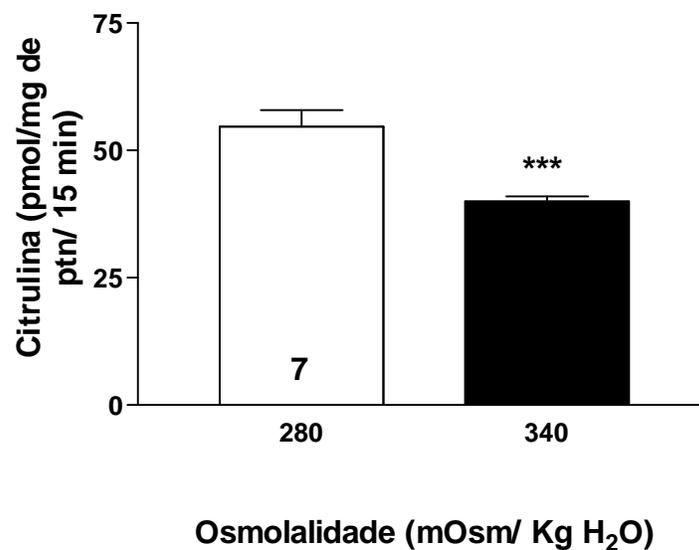


Figura 7. Efeito do aumento da osmolalidade (340 mOsm/ Kg de H₂O) sódio dependente sobre a atividade da sintase de óxido nítrico no bulbo olfatório. *** P<0,001 em Teste dos estudantes (test T)

4.3. Efeito de doadores de NO

Diminuição da liberação de ANP foi observada após a adição dos doadores de NO: Nitroprussiato de Sódio (SNP) e Cloreto de 3-Morpholinylsydnoneimine (SIN-1), não havendo diferenças de potência de efeito entre as concentrações testadas (Figura 8 e 9, respectivamente).

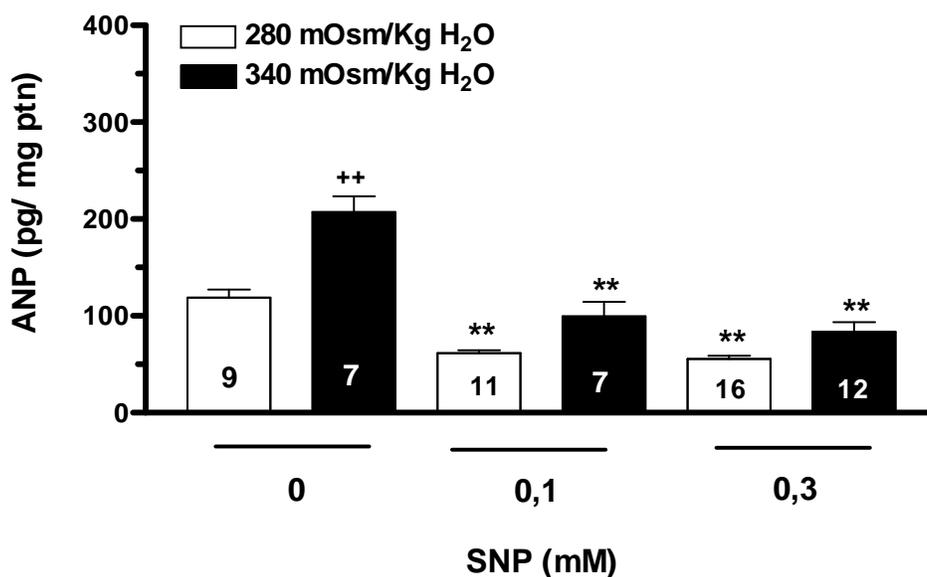


Figura 8. Efeitos de SNP (0,1 ou 0,3 mM) sobre a liberação de ANP basal ou estimulada por hipertonicidade salina. Os dados são apresentados como média±EPM. ** p<0,01 para comparações entre o grupo tratado *versus* controle. ++ p<0,01 para comparações entre os grupos 280 versus 340 mOsm/Kg H₂O.

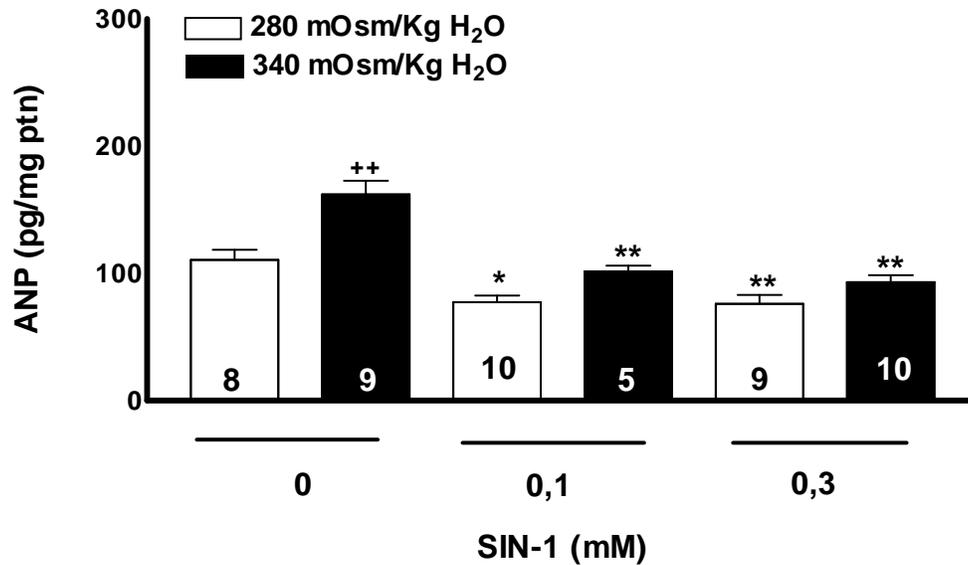


Figura 9. Efeitos de SIN-1 (0,1 ou 0,3 mM) sobre a liberação de ANP basal ou estimulada por hipertonicidade salina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ para comparações entre o grupo tratado *versus* controle. ++ $p < 0,01$ para comparações entre os grupos 280 versus 340 mOsm/Kg H₂O.

Devido o SIN-1 causar um aumento na produção de radicais superóxido e, por este motivo, produzir efeitos inespecíficos sobre a secreção de ANP, administramos superóxido dismutase para neutralizar qualquer efeito tóxico resultante da formação desses radicais livres. Nenhuma interferência significativa foi observada sobre os efeitos induzidos por SIN-1 em ambas as condições (Figura 10 A – basal, 10 B- hiperosmótica).

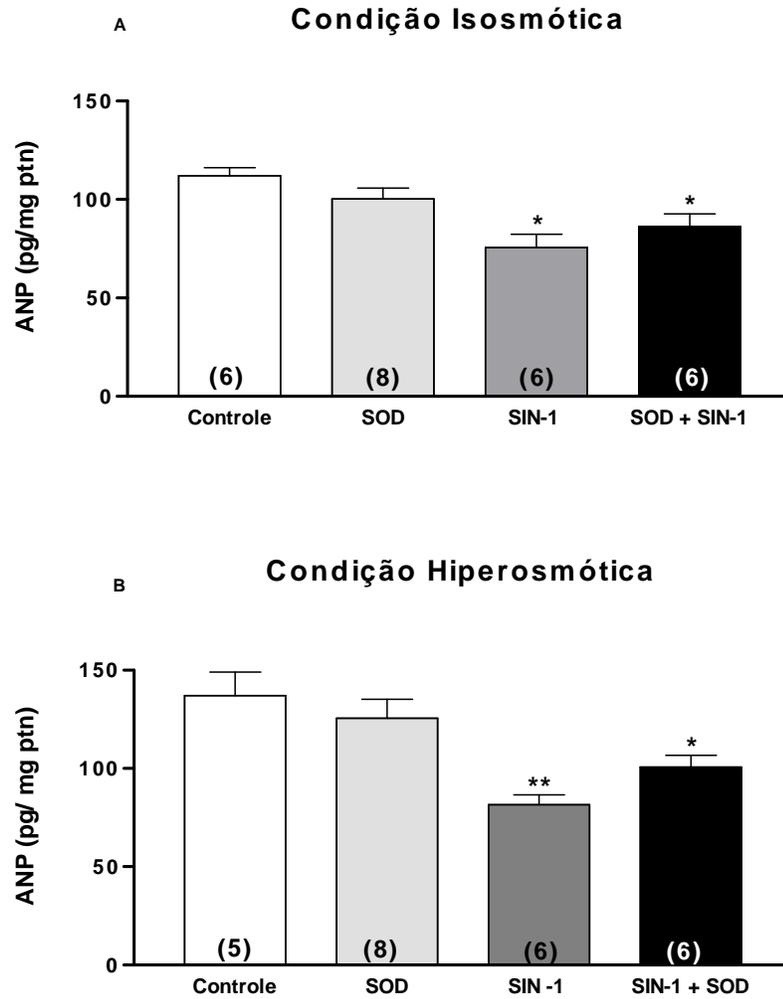


Figura 10 Efeitos de SOD (10 U/ml) sobre a liberação de ANP basal (A) ou estimulada por hipertonidade salina (B). Os dados são apresentados como média± EPM. * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ para comparações entre o grupo tratado *versus* controle.

4.4 Efeitos de Inibidor da Guanilato Ciclase (GC) associado a doador de NO

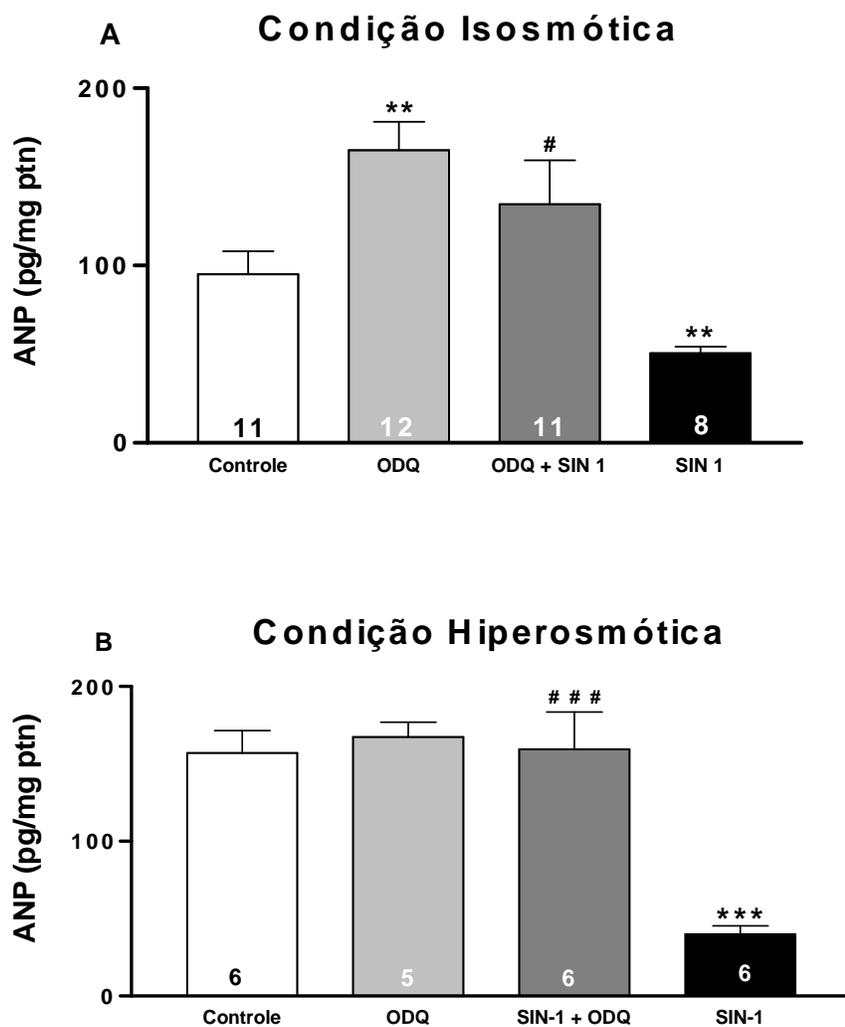


Figura 11. Efeitos de ODQ (50 μ M) ou sua associação com SIN-1 (0,3 mM) sobre a liberação de ANP basal (A) ou estimulada por hipertonicidade salina (B). Os dados são apresentados como média \pm EPM. ** p<0,01. *** p<0,001 para comparações entre o grupo tratado *versus* controle. #p<0,01. ### p<0,001 para comparações entre os grupos ODQ *versus* SIN-1+ODQ.

Um inibidor específico de GC solúvel, (1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one) ODQ (50 μ M), bloqueou a inibição induzida por SIN-1 (0,3 mM) sobre a liberação de

ANP nas duas condições experimentais (Figura 11. A – condição basal; B- condição estimulada).

4.5. Efeitos de Inibidor de NOS

Estimulação significativa da secreção de ANP foi obtida após adição de inibidor inespecífico da NOS, NG-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), em ambas as condições experimentais (Figura 12).

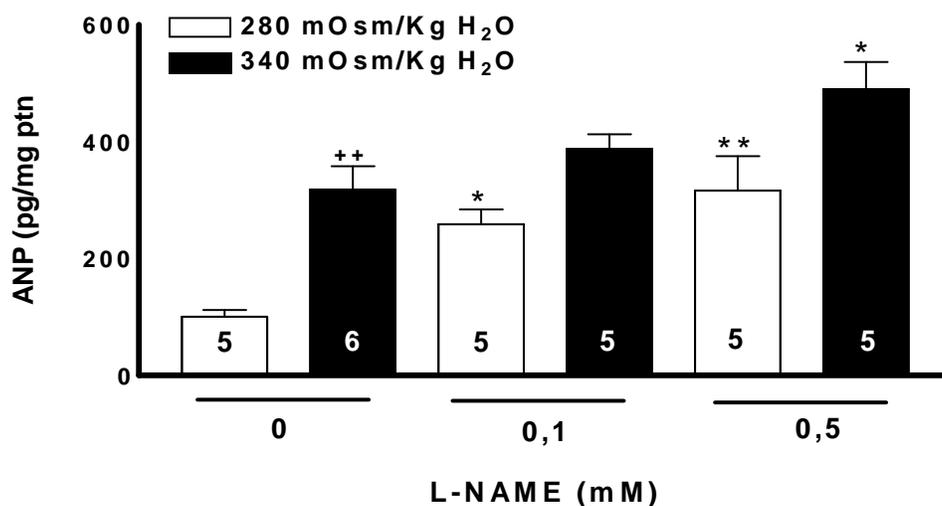


Figura 12. Efeitos de do L-NAME (0,1 ou 0,5 mM). Os dados são apresentados como média±EPM. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ para comparações entre o grupo tratado *versus* controle (0). ++ $p < 0,01$ para comparações entre 280 versus 340 mOsm/Kg H₂O.

4.6. Efeitos de Inibidor da Enzima Heme-Oxigenase

Diminuição da liberação de ANP e o aumento da produção de citrulina ocorreram em ambas às condições experimentais após adição de ZNDPBG, um inibidor da atividade da enzima heme oxigenase que sintetiza CO (Figura 13 e 14).

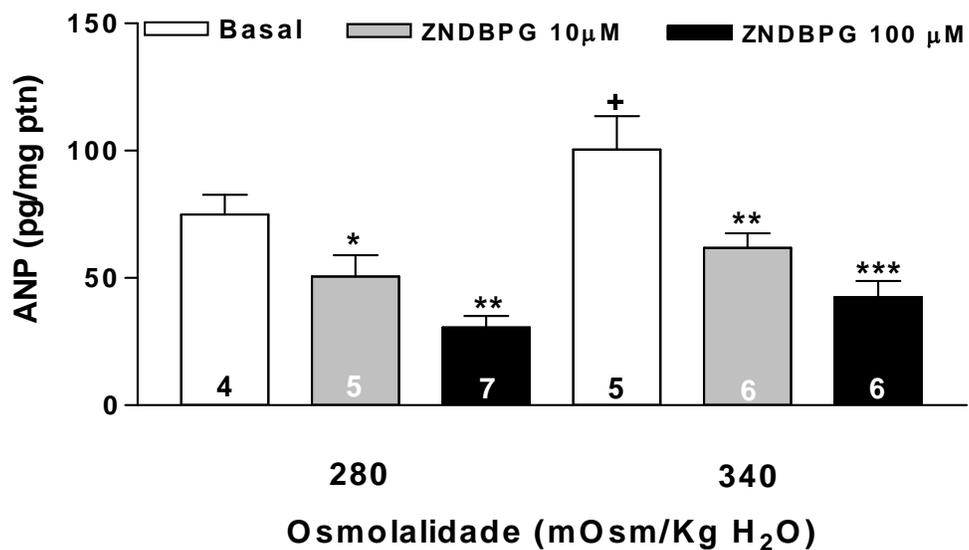


Figura 13. Efeitos do ZNDPBG (10µM e 100µM) sobre a liberação de ANP a partir do BO. * p<0,05. ** p<0,01 para comparações entre o grupo tratado *versus* controle. ++p< 0,01 entre os basais.

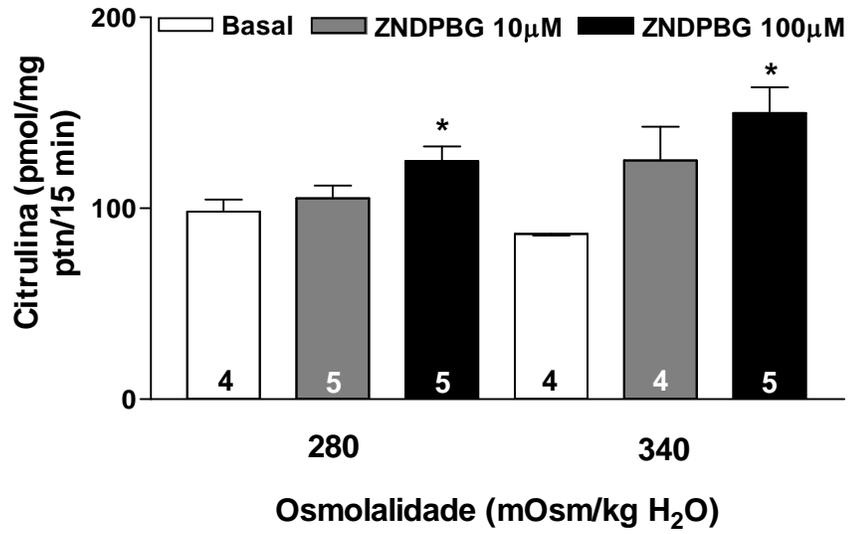


Figura 14. Efeitos de ZNDPBG (10 ou 100 μM) sobre conteúdo tecidual de ^{14}C citrulina. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,01$. para comparações entre o grupo tratado *versus* controle (0). ++ $p < 0,01$ para comparações entre os tratamentos 280 (basal) *versus* 340 (hiperosmótico) mOsm/Kg H_2O .

5 – DISCUSSÃO

Este estudo mostrou relação direta entre variações na concentração de sódio (0,13, 0,15 e 0,19 M) que se refletiu em variações de osmolalidade (240, 280 ou 340 mOsm/ Kg H₂O) e liberação de ANP a partir de explantes de BO *in vitro* (figura 6), sendo que a diferença mais significativa foi favorável a diminuição (42%) em detrimento do aumento (23 %), sugerindo uma maior sensibilidade ao controle inibitório para liberação de ANP em déficits da oferta de sódio, o que facilitaria a atividade de circuitos extrabulbares eliciadores de ingestão seletiva para sódio.

Essas considerações preliminares são reforçadas por estudos *in vivo* que evidenciaram ingestão exacerbada de solução de NaCl hipertônico em animais (normohidratados ou privados de água e alimento por 24 h) que sofreram lesões eletrolíticas em diversas regiões do BO (Chiaraviglio, 1969). A ação tônica inibidora do BO sobre a ingestão preferencial de sódio pode resultar da atividade aumentada de neurônios secretores de ANP, como demonstrado em estudos com linhagem de ratos hipernatriófagos (que ingerem espontaneamente mais sódio), os quais mostraram relação inversa entre o conteúdo de ANP no BO e ingestão exacerbada de sódio, curiosamente não observado em outras estruturas hipotalâmicas e hipofisárias clássicas reguladoras do balanço de sódio (Glass e cols., 1997). Considerando que estes neurônios ANPérgicos atuam reconhecidamente como inibidores da ingestão de água e/ou sódio (Antunes-Rodrigues e cols., 1985 e 1986), seria plausível propor que a modulação inibidora bulbo olfativa dependeria, em parte, da sinalização ANPérgica em resposta a incrementos de concentração de sódio no líquido extracelular.

Outras evidências sugerem a interferência de OT, outro neuropeptídeo inibidor da ingestão de sódio, a qual atuaria inibindo neurotransmissão aferente a partir do BO. A estimulação elétrica no PVN provocou liberação de OT no BO, que bloqueou atividade

originária em células mitrais e amplificou a atividade gerada em células granulares, resultando em diminuição da transmissão eferente a partir do BO (Yu e cols. 1996). A OT, por conseguinte, teria um papel de selecionar ativação de vias inibidoras para fora do BO, desde que células mitrais podem funcionar como o tronco de informação de saída do BO e sofrer retro-inibição de células granulares.

Nosso estudo mostrou que a liberação de ANP a partir do BO é sensível a variações da concentração de sódio *in vitro*, assim como ocorreu no hipotálamo anterior (Gomes, e cols. 2004) e no coração (Jin, e cols. 2004), sugerindo que informações sobre aumentos da oferta de sódio por ingestão ou por incrementos na osmolalidade do líquido extracelular seriam processadas no BO e ali receberiam reforço inibitório para correções locais ou em áreas supra-olfativas.

O aumento da liberação de ANP para o meio em resposta ao aumento da concentração extracelular de sódio e, por conseqüência, da osmolalidade, confirma estudos *in vivo* e contribuem para validar nossa abordagem *in vitro* como alternativa viável para o estudo de mecanismos relacionados à regulação da secreção de ANP em resposta a incrementos da concentração extracelular de sódio e conseqüentes reflexos sobre a tonicidade do meio.

Nossos resultados mostraram também que a produção de NO variou em resposta a alterações da osmolalidade dependente sódio, sendo que de forma inversamente proporcional, refletindo uma regulação nitrérgica em contraposição àquela observada para o ANP (figura 6), confirmando uma tendência já demonstrada para outras regiões que operam com circuitos ANPérgicos modulados por NO em modelos *in vivo* (Carnio, e cols., 2004; Gomes e cols., 2004). Idem para similar preparação com explantes de hipotálamo medial, quando demonstrou que o sistema nitrérgico pode manter uma inibição tônica sobre

a liberação de ANP na condição de hipertonicidade do meio (Gomes, e cols. 2004), mas não na condição isosmótica, diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, que mostrou efeitos moduladores nitrérgicos igualmente significativos.

Uma idéia atraente considera a possibilidade de essas diferenças regulatórias refletirem o papel modulador limitante do BO para a ingestão excessiva de sódio, o qual deve ser eficientemente desativado na premência da reposição em condições de déficit de sódio. Logo, em contraposição a um possível tônus inibidor resultante a atividade anpérgica contínua, tônus inibidor nitrérgico sobre essa atividade, não só limitaria os efeitos da saciedade, prejudicial a perda contínua de água e eletrólitos, como permitiria que sua atividade adicional na condição de privação desses elementos resultasse em retirada do “freio bulbofativo” liberando áreas eliciadoras da sede, as quais teriam agora suas ações amplificadas.

Como exemplo, na condição de desidratação resultante a transudação e/ou evaporação, a hipertonicidade do líquido extracelular ativa osmoreceptores ou sensores de sódio que sinalizam para a correção da osmolalidade com sede hipotônica e num segundo momento com sede hipertônica (ou busca por sal). A secreção aumentada de ANP em resposta a esta hipertonicidade funcionaria como uma inibição temporária e competitiva com ações dipsogênicas disparadas pelo hipotálamo e outras regiões reguladoras da reposição de água livre até a correção da osmolalidade aumentada. A produção adicional de NO resultaria em inibição adicional da liberação de ANP, liberando circuitos seletivos para reposição de sódio adicional a reposição de água, em condições de isosmolalidade, mas com déficit de massa total de sódio não corrigida pela reposição hipotônica anterior, equilibrando assim as perdas ocorridas pela desidratação.

De fato, significativo aumento da liberação de ANP para o meio foi observado após o uso de L-NAME, um inibidor específico para NOS. Em contrapartida, diminuição da liberação de ANP ocorreu após tratamento com SNP ou SIN-1, ambos doadores para a síntese de NO, confirmando no BO a ação efetora inibitória do NO sobre a liberação de ANP em condição basal ou estimulada por hipertonicidade salina. Estes resultados mostraram que a simples inibição da síntese de NO é capaz de estimular a liberação de ANP sugerindo um mecanismo tônico inibidor do NO sobre a liberação basal ou estimulada de ANP. É pertinente ressaltar, no entanto, que o efeito da inibição da síntese de NO foi mais eficaz na condição isosmótica, confirmando que a disponibilidade de NO está menor, como mostrado para os níveis diminuídos de nitrato, sugerindo que algum mecanismo inibidor deva estar limitando a produção de NO. Adicionalmente, é possível que o freio inibidor de ANP, proposto como mecanismo efetor para a ação inibidora do BO sobre a ingestão seletiva de sódio, dependa pelo menos de forma parcial da liberação do freio inibidor exercido pelo NO para ocorrer.

O mecanismo utilizado pelo NO para produzir esse efeito inibidor pode depender da síntese de GMPc via ativação da enzima guanilato ciclase solúvel a partir do GTP disponibilizado no citoplasma, que por sua vez pode agir diminuindo os níveis de cálcio livre no citoplasma (Those, e cols. 1995), como demonstrado pelo aumento da liberação de ANP resultante a adição de ODQ, um inibidor específico dessa enzima. O GMPc regula preponderantemente de forma inibitória o metabolismo celular por interferir negativamente em sinalizações estimuladoras cuja resultante é o aumento da concentração do íon cálcio livre no citoplasma (Domek-Lopacinska & Strosznajder, 2005). Portanto, a atividade de vias neuronais excitatórias pode induzir no neurônio pós-sináptico a síntese de NO como um mecanismo de excitoproteção neuronal (Barãnano, e cols., 2001) por limitar a

hiperestimulação e estresse metabólico resultante da elevada atividade neurotransmissora. Esse mecanismo intrínseco neuronal, aparentemente inespecífico para sistemas reguladores extracelulares, pode ser recrutado por aumento da concentração de íons cálcio proveniente do meio extracelular, via canais dependentes de voltagem (tipo L) ativados por aumento da concentração intersticial de sódio (Those e cols., 1995). Em células sensíveis a pequenos aumentos da concentração de sódio como neurônios angiotensinérgicos dos órgãos circunventriculares da lamina terminal, a resultante é ativação de neurônios pós-sinápticos eliciadores de comportamento de ingestão hídrica (Fitzsimons, 1998). Nesse caso, a sinalização neuronal opera com um circuito reforçador e se sobrepõem à ação nitrérgica intrínseca à atividade celular, se houver (se expressar NOS). A alternativa favorável seria um relevante reforço provocado por inibição nitrérgica sobre a liberação de ANP (via inibidora da sede).

Outras evidências reforçam a presença de NADPH- diaforase em células granulares do BOA, sugerindo o NO pode ser produzido a partir destas células (Nakamura, e cols. 1999). De fato, em outro estudo em desenvolvimento por nosso grupo, observamos que a administração de L-NOARG, um inibidor inespecífico da NOS, inibiu e SNP estimulou a sede seletiva para sódio em ratos privados por 36 h após sua administração no (BOA), confirmando a participação do NO como um possível mecanismo facilitador da ingestão seletiva de sódio a partir de estruturas bulbo olfativas (dados não publicados do grupo).

O aumento da disponibilidade de GMPc no citoplasma é suficiente para inibir a liberação de ANP, desde que a administração de 8-bromo GMPc, um análogo que permeia a membrana celular, induziu diminuição da liberação de ANP em coração perfundido isolado *in vitro* (Favareto, e cols. 1997), sugerindo que a liberação de ANP pode ser influenciada por mecanismos que ativem a síntese de GMPc independentemente da

interferência nitrérgica. Caso específico de efeitos do próprio ANP no BO, desde que esse hormônio pode atuar via ativação de uma guanilato ciclase ligada a membrana e independente da produção de NO (Rosenzweig, 1991). De fato algumas evidências mostraram menor disponibilidade associado ao aumento de afinidade de receptores de ANP (ANP-A) e da síntese de GMPc no BO de animais espontaneamente hipertensos (SHR) comparados a animais normotensos, sugerindo que alterações nas propriedades e funções de receptores de ANP nessas áreas poderia contribuir em parte para a gênese da hipertensão nesses animais, desde que essa atividade aumentada no BO poderia significar retirada da inibição bulbo olfativa sobre outras áreas eliciadoras de sede salina. (Woodard e cols., 2003)

Por outro lado, a ação do NO pode ser limitada por outro mediador gasoso, o CO, que também pode ser produzido no BO, a partir de sua enzima de síntese HO-2 que está presente em células mitrales (Verma e cols., 1993), o qual pode modular a ação nitrérgica por inibir a atividade de NOS (Turcanu e cols., 1998; Gomes, e cols., 2004) ou a interação do NO com a GCs, resultando em diminuição da produção de GMPc induzida por NO (Ingi e cols., 1996), pois o CO também pode se ligar a GCs, embora a potência de ativação da GCs pelo CO seja cerca de 30 vezes menor comparada com o NO (Stone & Marlette, 1994). A interação desses dois moduladores é muito interessante visto um aumento da inibição de NO estimula, por sua vez um aumento da atividade HO (Willis, e cols., 1995), demonstrando uma ação inibidora recíproca dependendo da localização, essa característica pode ser de suma importância devido à manutenção da via GCs- GMPc. Embora exista uma diminuição da produção de GMPc, desta enzimas ou das interrelações celulares a ação do CO pode ser disparada pelo próprio NO que ativa a HO, a enzima de síntese do CO, sugerindo um efeito autolimitante para a regulação nitrérgica.

Em células granulares do cerebelo a inibição da produção de CO, também promoveu um aumento da geração de GMPc induzida por NO e por outro lado a adição de CO promoveu um bloqueio desta geração de GMPc (Ingi e cols, 1999). Nosso estudo mostrou que essa ação do CO pode estar ocorrendo para a regulação nitrérgica da liberação de ANP desde que a adição de um inibidor da heme oxigenase, o ZNDPBG, inibiu a liberação de ANP para o meio associada à inibição da atividade de NOS (Figura 13 e 14). Ao que parece esses achados estão de acordo com os estudos de Gomes e cols, 2004, os quais mostraram ações antagonistas entre esses gases neuromoduladores sobre a liberação de ANP hipotalâmico.

Por fim, podemos sugerir que a secreção de ANP a partir do BO pode responder a variações da concentração de sódio, possivelmente para gerar saciedade à ingestão desse íon via inibição de outras regiões extra bulbofativas eliciadoras da ingestão preferencial de sódio. Essa resposta secretora de ANP, por sua vez, parece sofrer regulação do sistema nitrérgico, que manteria um tônus inibidor basal ou responderia à hipertonicidade salina causando diminuição da liberação de ANP via GMPc como segundo mensageiro. O limite para esses efeitos nitrérgicos sobre a liberação de ANP pode depender da ação antagônica do CO sobre a síntese de GMPc.

O balanço final determinante para a liberação de ANP de origem bulbo olfativa a partir dos resultados obtidos por este estudo, pode depender de pelo menos 3 fatores: A condição de tonicidade do meio; a atividade da NOS e NO produzido; a ativação da HO e CO produzido. No entanto, novas abordagens experimentais deverão ser conduzidas visando avaliar com mais profundidade essa relação de dependência ou co-regulação entre esses mensageiros gasosos e seu papel na regulação de ANP no BO.

6 - CONCLUSÃO

O estudo realizado nos levou as seguintes conclusões:

1. A liberação de ANP está relacionada à diminuição da produção de NO em resposta ao aumento da concentração de sódio no meio.

2. O NO regula de forma inibitória e dependente da ativação de GCs/GMPc a liberação de ANP na condição basal ou estimulada por aumento da concentração de sódio no meio.

3. O CO pode estimular a liberação de ANP ao inibir a síntese de NO, na condição basal ou estimulada por aumento da concentração de sódio no meio.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, WK, COOPER, CE AND KNOWLES, RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615, 2001
- ANTUNES-RODRIGUES, J., CASTRO, M., ELIAS, L.L., VALENÇA, M.M., MCCANN, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metalism. *Physiol. Rev.*, 84: 169- 208, 2004.
- ANTUNES-RODRIGUES J, MACHADO BH, ANDRADE HA, MAUAD H, RAMALHO MJ, REIS LC, SILVA-NETTO CR, FAVARETTO AL, GUTKOWSKA J, MCCANN SM. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 6828-31, 1992.
- ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S.M. Chemical stimulation of water, sodium chloride and food intake by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third brain ventricle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138: 1464-1470, 1970.
- ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM, ROGERS LC, AND SAMSON K. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 8720-8723, 1985.
- ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S.M., SAMSON, W.K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. *Endocrinol.*, 118 (4):1726-8, 1986.
- ANTUNES-RODRIGUES, J., MARUBAYASHI, U., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M. Essential role of hypothalamic muscarinic and a-adrenergic receptors in atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10240-10244, 1993a.
- ANTUNES-RODRIGUES J, PIKANÇO-DINIZ DWL, FAVARETTO ALV, GUTKOWSKA J, AND MCCANN SM. Brain atrial natriuretic peptide neurons

- play an essential role in volume expansion-induced release of atrial natriuretic peptide and natriuresis. *Neuroendocrinol.*, 58: 696-700, 1993b.
- ARIMA H, KONDO K, KAKIYA S, NAGASAKI H, YOKOI H, YAMBE Y, MURASE T, IWASAKI Y, OISO Y. Rapid and sensitive vasopressin heteronuclear RNA responses to changes in plasma osmolality. *J Neuroendocrinol.*, 11; 337-41, 1999
- ARMS, P.G., OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the jugular vein. *J. Apply. Physiol.*, 36: 391-392, 1974.
- ARMSTRONG, W.E. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog. Neurobiol.*, 47: 291-339, 1995.
- ARMSTRONG, W.E., STERN, J.E. Electrophysiological distinctions between oxytocin and vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 449: 67-77, 1998.
- ARTINIAN, L.R., DING, J.M. & GILLETTE, M.U. Carbon monoxide and nitric oxide: interacting messengers in muscarinic signaling to the brain's circadian clock. *Experim. Neurology*, 171: 293-300, 2001.
- BALDISSERA, S., MENANI, J.W., SANTOS, L.F.S.D., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., TURRIN, M.Q.A., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of the hypothalamus in the control of atrial natriuretic peptide release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9621-9625, 1989
- .
- BARAÑANO, D.E., FERRIS, C.D., SNYDER, S.H. Atypical neural messengers. *TRENDS in Neurosc.*, 24: 99-106, 2001.
- BHAT, GK, MAHESH, VB, LAMAR CA, PING L, AGUAN, K & BRANN DW. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association of gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 62: 187-197, 1995.

- BARBERIS C & AUDIGIER, S. Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system of the rat. *Ann Endocrinol (Paris)*, 46: 35-9, 1985.
- BASTOS, R., FAVARETTO, A.L., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Alpha-adrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Brain Res.*, 895: 80-88, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v.72, p.248-254, 1976.
- BRANN DW, BHAT GK, LAMAR CA, MAHESH VB. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* 65(6):385-95. 1997.
- BREDT, D.S., HWANG, P.M., SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347: 768-770, 1990.
- BROWNSTEIN, M.J., RUSSELL, J.T., GAINER, H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Scienc.*, 207: 373-378, 1980.
- BURANARUGSA, P., HUBBARD, J.I. Excitatory effects of atrial natriuretic peptide on rat subfornical organ neurons in vitro. *Brain Res. Bull.*, 20: 621-631, 1988.
- BUSH, PA, GONZALEZ NE, GRISCAVAGE JM AND IGNARRO L. Nitric Oxide from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys.Res. Commun.*, 185: 960-6, 1992.
- CAMARGO, L.A.A., SAAB, W.A., SILVA-NETTO, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R. Effect of beta-adrenergic stimulation of the septal area on renal excretion of electrolytes and water in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 11: 141-144, 1979.

- CAMARGO, L.A.A., SAAB, W., SILVA-NETTO, C.H., GENTIL, C.G., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R. Effects of catechol-amines injected into the septal area of the rat brain on natriuresis, kaliuresis and diuresis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 54: 219-228, 1976.
- CARNIO, E.C., RETTORI, V., DEL BEL, E.A., MACCANN, S.M. ANTUNES-RODRIGUES, J. Hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition activates the atrial natriuretic peptide (ANP) system. *Regulatory Peptides*, 117: 117-122, 2004.
- CHARLES, C.J., TANG, F., CAMERON, V.A., RICHARDS, A.M., ESPINER, E.A. Intracerebroventricular atrial natriuretic factor (ANF) antiserum inhibits volume-induced ANF in sheep: evidence for the brain's regulation of ANF secretion. *Endocrinol.*, 129: 2225-2230, 1991.
- CHIARAVIGLIO, E. Effect of lesions in the septal area and olfactory bulbs on sodium chloride intake. *Physiol. Behav.*, 4: 693-7, 1969.
- CHO, HJ, XIE Q, CALAYCAY J, MUMFORD, RA, ET AL. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 176: 599-604, 1992
- CHRIGUER, R.S., ROCHA, M.J., ANTUNES-RODRIGUES, J., AND FRANCI, C.R. Hypothalamic ANP and secretion of OT. *Brain Res.*, 889: 239-242, 2001
- COVIAN, M.R., ANTUNES-RODRIGUES, J. Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. *Am. J. Physiol.*, 205 (5): 922 –26, 1963.
- COVIAN, M.R. Apetito de las ratas suprarrenoprivas para el cluoruro de sodio. *Ver. Soc. Arg. Biol.*, 22: 283 –93, 1946.
- COX, J.R., CRUZ, C.E., RUGER, J. Effects of total amigdalectomy uppon regulation of salt in rats. *Brain Res. Bull.*, 3: 431-35, 1978.

- DAWSON, TM, BREDT, DS, FORTUHI, M, HWANG, PM & SNYDER SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7797-7801, 1991.
- DAWSON, TM, SNYDER, SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and Carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14: 5147-5159, 1994.
- DOMEK-LOPACINSKA, K. & STROSZNAJDER, J.B. Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J. of Physiol. And Pharmacol.*, 56: 15-34, 2005.
- DORN, A., ANTUNES-RODRIGUES, J., AND MCCANN, S.M. Natriuresis in the rat following intraventricular carbachol. *Am. J. Physiol.*, 219: 1292-1298, 1970.
- DORN, S., PORTER, J.C. Diencephalic involvement in sodium excretion in the rat. *Endocrinol.*, 86: 1112-1117, 1970.
- EHRlich, K.S., FITTS, V.A. Atrial natriuretic peptide in the subfornical organ reduces drinking induced by angiotensin or in response to water deprivation. *Behav. Neurosci.*, 104: 365-372, 1990.
- FAVARETTO AL, BALLEJO GO, ALBUQUERQUE-ARAUJO WI, GUTKOWSKA J, ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*; 18: 1377-1381, 1997.
- FITTS, D.A. MASSON, D.B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav. Neurosci.*, 103: 865-872, 1989.
- FITZSIMONS, J.T. Interactions of intracranially administered renin or angiotension and other thirst stimuli on drinking. *J. Physiol.*, 210: 152, 1970.

- FITZSIMONS, J.T., STRICKER, E.M. Sodium appetite and the renin-angiotensin system. *Nat. New. Biol.*, 231: 58-60, 1971.
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. *Physiol. Rev.*, 78: 582-673, 1998.
- FRANCI, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J., SILVA-NETTO, C.R., CAMARGO, L.A.A., SAAD, W.A. Identification of pathways involved in the natriuretic, kaliuretic and diuretic responses induced by cholinergic stimulation of the medial septal area (MSA). *Physiol. Behav.*, 30: 65-71, 1983.
- FRANCI, C.R., SILVA-NETTO, C.R., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction between the lateral hypothalamic area (LHA) and the medial septal area (MAS) in the control of sodium and potassium excretion in rat. *Physiol. Behav.*, 25: 801-806, 1980.
- GEERLING, J.C. LOEWY, A.D. Central regulation of sodium appetite. *Exp. Physiol.* 93: 177-209, 2008
- GENTIL, C.G., ANTUNES-RODRIGUES, J., NEGRO-VILLAR, A. E COVIAN, M.R. Role of amygdaloide complex in sodium chloride and water intake in the rat. *Physiol. Behav.* 3: 981- 85, 1968.
- GIBSON TR, WILDEY GM, MANAKER S, GLEMBOTSKI CC. Autoradiographic localization and characterization of atrial natriuretic peptide binding sites in the rat central nervous system and adrenal gland. *J Neurosci.*; 6 (7):2004-11, 1986.
- GLASS, H., GUTKOWSKA, J., FAVARETO, A.L.V., ANTUNES-RODRIGUES, J. Correlations between ANP concentrations in atria, plasma and cerebral structures and sodium chloride preference in Wistar rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 65-68, 1997.
- GOMES D. A., REIS, W. L., VENTURA, R. R., GIUSTI-PAIVA, A., ELIAS, L.L.K, CUNHA, F.Q. E ANTUNES-RODRIGUES, J. The role pf carbon monoxide and

- nitric oxide in the hyperosmolality-induced atrial natriuretic peptide release by hypothalamus *in vitro*. *Brain Res.*, 1016:33-39, 2004.
- GRINDSTAFF, R.R., GRINDSTAFF, R.J., CUNNINGHAM, J.T. Effects of right atrial distension on the activity of magnocellular neurons in the supraoptic nucleus. *Am. J. Physiol.*, 278: 1605-1615, 2000.
- GRISCAVAGE JM, FUKUTO JM, KOMORI Y, IGNARRO LJ. Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J Biol Chem.* 269:21644-9. 1994.
- GROSSMAN, S.P. A neuropharmacological analysis of hypothalamic and extrahypothalamic mechanisms concerned with the regulation of food and water intake. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 157: 902-917, 1969.
- GROSSMAN, S.P. Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of hypothalamus. *Scienc.*, 132: 301-302, 1960.
- GUTKOWSKA, J. Natriuretic peptides in the rat olfactory system. *Rev. Brasil. Biol.*, 56: 79-88, 1996.
- GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S.M. Atrial natriuretic peptide in Brain and Pituitary Gland. *Physiol. Rev.*, 77: 465-515, 1997.
- GUTKOWSKA G, THIBAUT P, JANUSZEWICZ M, CANTIN JG. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 31: 593-601, 1984.
- HAANWINCKEL, M.A., ELIAS, L.K., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc. Natl. Acad. USA*, 92: 7902-7906, 1995.

- HAMPL V, WALTERS CL, ARCHER SL. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Feelisch M, Stamler JS (Eds), *Methods in Nitric Oxide Research*. Wiley, New York, 1996, p 309–318.
- HATTON, G.I. Oxytocin and vasopressin neurones: vive la difference! *J. Physiol.*, 500: 284, 1997.
- HATTORI, Y., RASAI, M., UESUGI, S., KAWATA, M., YAMASHITA, I. Atrial natriuretic polypeptide depresses angiotensin II induced excitation of neurons in the rat subfornical organ in vitro. *Brain Res.*, 443: 355-359, 1988.
- INGI, T., CHENG, J., RONNETT, G.V. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron*. 16: 835-842, 1996.
- IMURA, H., NARAO, K., ITOH, H. The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions. *Front. Neuroendocrinol.*, 13: 217-249, 1992.
- ITOH, H., NAKAO, K., YAMADA, T., SHIRAKAMI, G., KANGAWA, R.I., MINAMINO, N., MATSUO, H., IMURA, H. Antidipsogenic action of a novel peptide brain natriuretic peptide" in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 150: 193-196, 1988.
- JIN JY, WEN JF, LI D, CHO KW. Osmoregulation of atrial myocytic ANP release: osmotransduction via cross-talk between L-type Ca²⁺ channel and SR Ca²⁺ release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 287: R1101-R1109, 2004
- JOHNSON AK, GROSS PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.*, 7: 678-86, 1993.
- KADOWAKIT, K, KISHIMOTOS J., LENG G., & EMSONQ, PC. Up-Regulation of Nitric Oxide Synthase (NOS) Gene Expression Together with NOS Activity in the Rat Hypothalamo-Hypophysial System after Chronic Salt Loading: Evidence of a Neuromodulatory Role of Nitric Oxide in Arginine Vasopressin and Oxytocin Secretion. *Endocrinol.*, 134:1011-7, 1994.

- KATSUURA G, NAKAMURA M, INOUE K, KONO M, NAKAO K, IMURA H.
Regulatory role of atrial natriuretic polypeptide in water drinking in rats. *Eur J Pharmacol.*, 121: 285-7, 1986.
- KAWATA M, NAKAO K, MORII N, KISO Y, YAMASHITA H, IMURA H, SANO Y.
Atrial natriuretic polypeptide: topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neurosci*; 16 (3):521-46, 1985.
- LAMBERT, R.C., MOOS, F.C., RICHARD, P. Action of endogenous oxytocin within the paraventricular or supraoptic nuclei: a powerful link in the regulation of the bursting pattern of oxytocin neurons during milk-ejection reflex in rats. *Neurosci.*, 57: 1027-1038, 1993.
- LIU H, TERRELL ML, BUI V, SUMMY-LONG JY, KADEKARO M. NO and angiotensin II effects on blood pressure and fluid homeostasis. *J. Neuroendocrinol.* 545-529 (7),1997.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *TIBS.* 14:488-492, 1989.
- MARKS, G.S. BRIEN, J.F. NAKATSU, K. MCLAUGHLIN, B.E. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 185– 188. 1991.
- MASOTTO, C., NEGRO-VILAR, A. Inhibition of spontaneous or angiotensin II-stimulated water intake by atrial natriuretic factor. *Brain Res. Bull.*, 15: 523-526, 1985.
- MCCANN, S.M. Hypothalamic releasing and inhibiting hormone. In: Elsevier's Encyclopedia of Neuroscience. G. Adelman and BH Smith (eds), pp. 927-930, 1999.

- MCCANN, S.M. The ACTH-releasing activity of extracts of the posterior lobe of the pituitary in vivo. *Endocrinol.*, 60:664-676, 1957.
- MCCANN, S.M., MACK, R., GALE, C. The possible role of oxytocin in stimulating the release of prolactin. *Endocrinol.*, 64:870-889, 1959.
- MENANI, J.V., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R., ABRÃO-SAAD, W. Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ in water intake. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 20: 301-306, 1984.
- MENANI, J.V., THUNORST, R.L., JOHNSON, A.K. Lateral Parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am. J. of Physiol.*, 270: 162-168, 1996.
- MENDELSSOHN FA, ALLEN AM, CHAI SY, SEXTON PM, FIGDOR R. Overlapping distributions of receptors for atrial natriuretic peptide and angiotensin II visualized by in vitro autoradiography: morphological basis of physiological antagonism. *Can J Physiology Pharmacology*, 65: 1517-21. 1987.
- MORRIS, M., MCCANN, S.M., ORIAS, R. Evidence for hormonal participation in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline and norepinephrine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152: 95-98, 1976.
- MORRIS, M., MCCANN, S.M., ORIAS, R. Role of transmitters in mediating hypothalamic control of electrolyte excretion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55: 1143-1154, 1977.
- 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.

- NAKAMURA, H., ITOH, K. KAWABUCHI, M. NADPH-diaphorase and cytosolic urea cycle enzymes in the rat accessory olfactory bulb. *J. of Chemical Neuroanatomy* 17:109-117, 1999.
- ORIAS, R., MCCANN, S.M. Natriuretic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in hypophysectomized or, adrenalectomized reats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139: 872-876, 1972a.
- ORIAS, R., MCCANN, S.M. Natriuretic effect of α -MSH in the water-loaded rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133: 469-474, 1970a.
- ORIAS, R., MCCANN, S.M. Natriuretic effect of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) in hypophysectomized or adrenalectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139: 872-878, 1972b.
- ORIAS, R., MCCANN, S.M. Natriuresis induced by alpha and beta melanocyte stimulating hormone (MSH) in rats. *Endocrinol.*, 90: 700-706, 1970b.
- OSAKO, Y., OTSUKA, T., TANIGUCHI, M., OKA, T., KABA, H. Oxytocin depresses spontaneous gamma-aminobutyric acid-ergic inhibitory postsynaptic currents in cultured mitral cells of the rat olfactory bulb by a presynaptic mechanism. *Neurosc. Lett.*, 289 (1): 25-8, 2000.
- OSAKO, Y., OTSUKA, T., TANIGUCHI, M., OKA, T., KABA, H. Oxytocin enhances presynaptic and postsynaptic glutamatergic transmission between rat olfactory rat neurons in culture. *Neurosc. Lett.*, 299 (1-2): 65-8, 2001.
- PALKOVITS, M., ESKAY, R.L., ANTONI, F.A. Atrial natriuretic peptide in the median eminence is of paraventricular nucleus origin. *Neuroendocrinol.*, 46: 542-544, 1987.
- PAXINOS, G., WATSON, C. THE rat brain in stereotaxic coordinates, New York: Academic Press, Spiral Bound, 1998.

- PEREZ, S.E., SILVA-NETTO, C.R., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction between cholinergic and osmolar stimulation of the lateral hypothalamic area (LHA) on sodium and potassium excretion. *Physiol. Behav.*, 32: 191-194, 1984.
- PORTER, J.C., SISSOM, J.F., ARITA, J., REYMOND, M.J. Hypothalamic-hypophysial vasculature and its relationship to secretory cells of the hypothalamus and pituitary gland. *Vitam. Horm.*, 40: 145-174, 1983.
- RYAN MC, GUNDLACH A.L. Anatomical localisation of preproatrial natriuretic peptide mRNA in the rat brain by in situ hybridisation histochemistry: novel identification in olfactory regions. *J Comp Neurol.*, 356:168-182, 1995.
- RENAUD, L.P., BOURQUE, C.W.. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog. Neurobiol.*, 36: 131-169, 1991.
- RICHTER, C.P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. *Am. J. Physiol.*, 115: 155-61, 1936.
- ROCHA, M.J.A., BELTZ, T.G., DORNELLES, R.C., JOHNSON, A.K., AND FRANCI, C.R. Anteroventral third ventricle (AV3V) lesions alter c-fos expression induced by salt loading. *Brain Res.*, 829: 197-200, 1999.
- ROCHA, M.J., FRANCI, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MAS) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). *Physiol. Behav.*, 41: 23-28, 1985.
- RODRIGO J., SPRINGALL, DR, UTTENTHAL, O, BENTURA ML, ABADIA-MOLINA, F. ET AL. Localization of Nitric Oxide Synthase in the adult rat brain. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 29: 175-221, 1994.

- ROSENZWEIG, A. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 229-55, 1991.
- SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., GRAEFE, F.G., SILVA-NETTO, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R. The role of central muscarinic and nicotinic receptors in the regulation of sodium and potassium renal excretion. *Gen. Pharmacol.*, 7: 145-158, 1976.
- SAAD, W. A., CAMARGO, L.A., SAAD, R., PEREIRA, A.F., SIMÕES, S. Effect of injection of L-NAME on drinking response. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 1413-1416, 1999.
- SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., SILVA-NETTO, C.R., GENTIL, C.G., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R. Natriuresis, kaliuresis and diuresis in the rat following microinjections of carbachol into the septal area. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 3: 985-992, 1975.
- SEDLAKOVA, E., LICHARDUS, B., CORT, J.H. Plasma saluretic activity: its nature and relation to oxytocin analogs. *Scienc.*, 164: 580-582, 1969.
- SOARES, T.J., COIMBRA, T.M., MARTINS, A.R., PEREIRA, A.G., CARNIO, E.C., BRANCO, L.G., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W.I., DE NUCCI, G., FAVARETTO, A.L., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 278-83, 1999.
- STERN, J.E., ARMSTRONG, W.E. Changes in the electrical properties of supraoptic nucleus oxytocin and vasopressin neurons during lactation. *J. Neurosci.*, 16: 4861-4871, 1996.
- STONE, J.R., MARLETTA, M.A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33:5636–5640, 1994.

STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Interaction of osmotic and volume stimuli in the regulation of neurohypophysial secretion in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 250: R267–R275, 1986.

STRICKER, E.M.; HOSUTT, J.; VERBALIS, J.G. Neurohypophysial secretion in hypovolemic rats: inverse relation to sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 252: R889–R896, 1987.

STRICKER, E.M.; SCHREIHOFFER, A.M.; VERBALIS, J.G. Sodium deprivation blunts hypovolemia-induced pituitary secretion of vasopressin and oxytocin in rats. *Am J Physiol*, 267: 1336-41, 1994.

STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul. Pept.*, 66: 83-5, 1996.

SUMMY-LONG JY, BUI V MANTZ S, KOEHLER E, WEISZ J. KADEKARO M. Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration. *Neurosci Lett*, 152. 190-3,1993

TARJAN, E., DENTON, D.A., WEISINGER, R.S. Atrial natriuretic peptide inhibits water and sodium intake in rabbits. *Regul. Pept.*, 23: 63-75, 1988.

THOSE N, NAKAYA H, TAKEDA Y, KANNO M. Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca²⁺ channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. *Br J Pharmacol*; 114: 1076-1082, 1995.

- TURCANU, V., DHOUIB, M. POINDRON, P. Heme oxygenase inhibits nitric oxide synthase by degrading heme: a negative feedback regulation mechanism for nitric oxide production. *Transplant. Proceed.*, 30: 4184-4185, 1998.
- VENTURA, R.R., GOMES, D.A., REIS, W.L., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M., VALENÇA, M.M., CARNIO, E. C., RETTORI, V., McCANN e ANTUNES-RODRIGUES, J. Nitrenergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Braz. J Med. Biol. Res.*, 35: 1101-9, 2002
- VERMA, A.; HIRSCH, D.J.; GLATT, C.E.; RONNETT, G.V.; SNYDER, S.H. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 259: 381-384, 1993.
- VINCENT, S.R. DAS, S. MAINES, M.D. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons, *Neuroscience* 63: 223– 231. 1994.
- WEISINGER, R.S., BLAIR-WEST, J.R., DENTON, D.A., TARJAN, E. Central administration of atrial natriuretic peptide suppresses sodium and water intake of sheep. *Brain Res.*, 579: 113-118, 1992.
- WILLIS, D., TMLINSON, A., FREDERICK, R., PAUL-CRARK, M.J., WILLOUGHBY, D.A. Modulation of heme oxygenase activity in rat brain and spleen by inhibitors and donors of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 214: 1152-1156, 1995.
- XI, D., KUSANO, K., GAINER, H. Quantitative analysis of oxytocin and vasopressin messenger ribonucleic acids in single magnocellular neurons isolated from supraoptic nucleus of rat hypothalamus. *Endocrinol.*, 140: 4677-4682, 1999.
- YOSHIMURA, R., KIYAMA, H., KIMURA, T., ARAKI, T., MAENO, H., TANIZAWA, O., TOHYAMA, M. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinol.*, 133: 1239-1333, 1993.

ZHU, B., HERBERT, J. Central antagonism of atrial natriuretic peptides on behavioral and hormonal responses to angiotensin II: mapping with c-fos. *Brain Res.*, 734: 55-60, 1996.

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](#)