

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

**SILVIA GRACIELA RUGINSK LEITÃO**

**Efeitos do sistema canabinóide endógeno sobre a secreção hormonal, ativação neuronal e expressão de RNA mensageiro em resposta à expansão isotônica e hipertônica do volume extracelular.**

**Ribeirão Preto  
2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

SILVIA GRACIELA RUGINSK LEITÃO

**Efeitos do sistema canabinóide endógeno sobre a secreção hormonal, ativação neuronal e expressão de RNA mensageiro em resposta à expansão isotônica e hipertônica do volume extracelular.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Ribeirão Preto  
2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Leitão, Silvia Graciela Ruginsk

Efeitos do sistema canabinóide endógeno sobre a secreção hormonal, ativação neuronal e expressão de RNA mensageiro em resposta à expansão isotônica e hipertônica do volume extracelular. Ribeirão Preto, 2010.

120 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Antunes-Rodrigues, José.

1. Endocanabinóides. 2. Vasopressina. 3. Ocitocina. 4. Anandamida. 5. Rimonabanto.

**LEITÃO, S.G.R. Efeitos do sistema canabinóide endógeno sobre a secreção hormonal, ativação neuronal e expressão de RNA mensageiro em resposta à expansão isotônica e hipertônica do volume extracelular.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

***Dedico** este trabalho a meus pais, **Alice e Walter**, e ao meu marido **Diego**, que acompanhou, desde o início, a minha trajetória científica e me apoiou e incentivou em cada passo que eu dei nesta caminhada.*

**Agradeço**, primeiramente, ao **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues**, por sua orientação segura e compreensiva, bem como pela confiança em mim depositada, e à Profa. Dra. Lucila L. K. Elias, pelas considerações sempre oportunas ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Neuroendocrinologia, sejam eles pós-graduandos ou funcionários, pela ajuda no desenvolvimento das tarefas e por propiciarem um ambiente sempre divertido, no trabalho ou fora dele.

Aos demais colegas, funcionários e docentes do Departamento de Fisiologia, pela cooperação, convivência e troca de experiências.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”*

***Albert Einstein***

## RESUMO

LEITÃO, S.G.R. **Efeitos do sistema canabinóide endógeno sobre a secreção hormonal, ativação neuronal e expressão de RNA mensageiro em resposta à expansão isotônica e hipertônica do volume extracelular.** 2010. 120 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

O sistema endocanabinóide é composto por mediadores que participam de inúmeras respostas homeostáticas e neuroendócrinas, dentre elas a modulação do sistema hipotalâmico magnocelular. Diversas evidências sugerem que a grande maioria dos efeitos centrais produzidos por estas substâncias sejam mediados pela ativação do receptor CB<sub>1</sub>. Portanto, o presente estudo visou avaliar os efeitos da administração de anandamida (AEA, 100ng/4µl, i.c.v.), um dos principais agonistas endógenos do sistema canabinóide, ou de rimonabanto (10mg/kg, p.o.), um antagonista seletivo dos receptores CB<sub>1</sub>, sobre diversos eventos relacionados à síntese e secreção de ocitocina (OT) e vasopressina (AVP) induzidas pelo estímulo de expansão do volume extracelular (EVEC). Nosso trabalho mostrou que a EVEC hipertônica (NaCl 0.3M, 2ml/100g p.c., e.v.) promoveu um aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT, além de aumentar o número de neurônios magnocelulares duplamente marcados para c-Fos/OT e c-Fos/AVP, bem como a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de AVP e OT nos núcleos supra-óptico (NSO) e paraventricular (NPV) do hipotálamo. Ao contrário disso, a EVEC isotônica (NaCl 0.15M, 2ml/100g p.c., e.v.) estimulou a secreção de OT e diminuiu as concentrações plasmáticas de AVP, produzindo efeitos correspondentes no número de neurônios ocitocinérgicos e

vasopressinérgicos ativados e na expressão de RNAm para OT e AVP nestes núcleos. O pré-tratamento com AEA reduziu significativamente a secreção de OT induzida pela EVEC hipertônica, porém não alterou as concentrações plasmáticas de AVP, tampouco o número de neurônios magnocelulares ativados e a expressão de RNAm em resposta à EVEC. Por outro lado, a prévia administração de rimonabanto potencializou a secreção hormonal de ambos os peptídeos, assim como o número de duplas marcações para c-Fos/OT e c-Fos/AVP no NSO e NPV de animais submetidos à EVEC hipertônica. Contrariamente, a expressão de RNAm de AVP e OT foi inibida em animais pré-tratados com rimonabanto e submetidos à EVEC. Considerando a participação das vias glutamatérgicas na ativação dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos em resposta ao aumento de volume e/ou osmolalidade do líquido extracelular, o presente estudo mostrou ainda que tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica induziram um aumento no conteúdo total de glutamato no NPV e NSO, sendo que este efeito foi potencializado em animais pré-tratados com AEA e inibido nos grupos que receberam previamente rimonabanto. Além disso, os estudos que utilizaram a administração central de AEA indicaram que o sistema canabinóide endógeno possa interagir, possivelmente de maneira independente à ativação do receptor CB<sub>1</sub>, com a via do óxido nítrico (NO) na modulação das respostas induzidas pela EVEC. Em conjunto, estes dados sugerem que o receptor CB<sub>1</sub> participe do controle da secreção e síntese hormonal induzidas notadamente pelo estímulo hipertônico, e que a AEA não seja o principal canabinóide endógeno envolvido em tais respostas.

**Palavras-chave:** EVEC, neurônios magnocelulares, AVP, OT, glutamato, NO, RNAm, AEA, rimonabanto.

## ABSTRACT

LEITÃO, S.G.R. **Effects of the endocannabinoid system on the modulation of hormone secretion, neuronal activation and mRNA expression induced by isotonic and hypertonic blood volume expansion.** 2010. 120 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

The endocannabinoid system includes important signaling molecules that are involved in several homeostatic and neuroendocrine functions, including the modulation of the hypothalamic magnocellular neurosecretory system. Several evidences suggest that most of the central effects induced by these substances are mediated by the activation of the CB<sub>1</sub> receptor. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of anandamide (AEA, 100ng/4µl, i.c.v.), one of the main cannabinoid endogenous agonists, or rimonabant (10mg/kg, p.o.), a selective CB<sub>1</sub> antagonist, previous administration on several events related to oxytocin (OT) and vasopressin (AVP) synthesis and secretion in response to blood volume expansion (BVE). Our results showed that hypertonic (H-) BVE (NaCl 0.3M, 2ml/100g b.w., e.v.) induced an increase in AVP and OT plasma concentrations, in the number of double labeled neurons for c-Fos/OT and c-Fos/AVP, as well as in AVP and OT mRNA expression in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei of the hypothalamus. Conversely, isotonic (I-) BVE (NaCl 0.15M, 2ml/100g b.w., e.v.) increased OT but decreased AVP plasma concentrations, producing similar effects on oxytocinergic and vasopressinergic neuronal activation as well as OT and AVP mRNA expression in these hypothalamic nuclei. Pretreatment with AEA significantly reduced OT secretion induced by H-BVE, but did not alter AVP plasma

concentrations, vasopressinergic or oxytocinergic neuronal activation, or AVP and OT mRNA expression induced by stimulus. On the other hand, the previous administration of rimonabant potentiated both AVP and OT secretion, as well as the number of double labeled neurons for c-Fos/OT and c-Fos/AVP in the SON and PVN of animals submitted to H-BVE, although decreased AVP and OT mRNA expression was found in the hypothalami of rimonabant pretreated groups. Concerning the participation of glutamatergic pathways in the activation of the magnocellular neurosecretory system induced by changes in extracellular volume and/or osmolality, the present study also showed that both I- and H-BVE induced an increase in total glutamate content in the PVN and SON. Interestingly, this effect was significantly potentiated by AEA pretreatment and decreased in rimonabant pretreated groups. Furthermore, the results obtained from central administration of AEA indicated that the endocannabinoid system may interact, possibly in a CB<sub>1</sub> independent manner, with nitric oxide (NO) in the modulation of BVE effects. Taken together, these data suggest that the CB<sub>1</sub> receptor may modulate several events that contribute to the development of appropriate responses to increased fluid volume and osmolality and that AEA may not be directly related to most of the responses observed under these experimental conditions.

**Key words:** BVE, magnocellular neurons, AVP, OT, glutamate, NO, mRNA, AEA, rimonabant.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
ANIMAIS.....	26
CIRURGIAS.....	27
Canulação do ventrículo lateral direito.....	27
Canulação da veia jugular .....	28
DROGAS .....	28
EXPANSÃO ISOTÔNICA OU HIPERTÔNICA DO VOLUME EXTRACELULAR .....	29
DOSAGENS HORMONAIS .....	29
DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE TOTAL DE GLUTAMATO E NITRATO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	30
IMUNOISTOQUÍMICA .....	31
REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL .....	33
Microdissecção e extração de RNA.....	33
Análise semi-quantitativa de expressão gênica por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real (Taqman®-pcr) .....	33
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>PROCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
1 - DOSAGENS HORMONAIS .....	36
1A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB <sub>1</sub> (AEA, 100ng/4µl) sobre a secreção de corticosterona, AVP, OT e PRL em resposta à EVEC isotônica e hipertônica .....	37

1B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB <sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre a secreção de corticosterona, AVP, OT e PRL em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.....	42
2 - CONTEÚDO HIPOTALÂMICO DE GLUTAMATO.....	46
2A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB <sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre o conteúdo hipotalâmico de glutamato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica .....	47
2B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB <sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre o conteúdo hipotalâmico de glutamato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica .....	50
3 - CONTEÚDO HIPOTALÂMICO DE NITRATO .....	54
3A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB <sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre o conteúdo hipotalâmico de nitrato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica .....	55
3B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB <sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre o conteúdo hipotalâmico de nitrato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica .....	59
4 - IMUNOHISTOQUÍMICA .....	62
4A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB <sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre a expressão da proteína c-Fos no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. ....	63
4B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB <sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre a expressão da proteína c-Fos no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.....	73
5 - REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL.....	83

5A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB <sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre a expressão de RNAm no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. ....	84
5B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB <sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre a expressão de RNAm no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. ....	88
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>

**INTRODUÇÃO**

Uma característica crucial ao surgimento da vida, e aperfeiçoada ao longo da evolução, foi a capacidade desenvolvida pelos organismos de manter em estado de relativo equilíbrio o volume e a concentração de eletrólitos do meio interno, definida como homeostase hidroeletrólítica. Nesta condição, os líquidos e solutos apresentam um movimento contínuo e controlado entre os meios externo e interno, assim como entre os subcompartimentos internos (intravascular e intersticial). Quando alguma alteração de volume ou osmolalidade é detectada por sistemas especializados (osmorreceptores, receptores de sódio, quimiorreceptores e barorreceptores), o organismo recruta mecanismos e vias neurais seletivas para o controle da ingestão e excreção de água e eletrólitos, visando à adequada manutenção das funções orgânicas.

Os osmorreceptores são sensores situados em estruturas estrategicamente posicionadas em regiões cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica. Os chamados órgãos circumventriculares (OCV) compreendem a lâmina terminal, estrutura prosencefálica à qual estão associados o órgão subfornicial (SFO), o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), assim como a área postrema (AP), a eminência mediana (EM), a região pineal e o órgão subcomissural. Em presença de hiperosmolalidade do líquido extracelular (LEC), estas células são despolarizadas, o que leva à ativação de neurônios localizados nos núcleos supra-ópticos (NSO) e paraventriculares (NPV) do hipotálamo, relacionados à secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (Oliet & Bourque, 1993). Além disso, recentes descobertas baseadas em estudos pioneiros têm apontado para a existência de um mecanismo sódio-sensível de controle da osmolalidade, caracterizado pela presença de receptores específicos para este íon no SFO (Andersson, 1978, Denton *et al*, 1996; Goldin *et al*, 2000; Hiyama *et al*, 2002

e 2004; Weisinger *et al*, 2004). Ainda segundo tais estudos, uma segunda classe de neurônios sensíveis ao sódio estaria localizada na porção vasopressinérgica do NSO. Frente ao estímulo de aumento do conteúdo extracelular de sódio, estes neurônios seriam capazes de controlar a permeabilidade da membrana plasmática a este íon, assim como modificar a expressão do gene que codifica o canal de sódio presente nestas células (Voisin & Bourque, 2002).

Diferentemente dos receptores de sódio e osmorreceptores, os barorreceptores são ativados pelo estiramento de suas terminações neuronais que ocorre em virtude de um aumento no volume circulante. Eles estão localizados no seio carotídeo, na parede do arco aórtico, nas arteríolas renais e na região cardiopulmonar. A geração de impulsos por esta via promove a ativação do núcleo do trato solitário (NTS), localizado na área bulbar do tronco cerebral; desta região, os impulsos são enviados, por via multisináptica, às estruturas hipotalâmicas e à região ântero-ventral do 3º ventrículo (AV3V). Estudos mostraram que a estimulação elétrica do NPV, além de promover a secreção de OT e AVP, leva à ativação de projeções descendentes para o NTS (Landgraf *et al*, 1990).

Os dois principais estímulos à secreção de AVP e OT são a hipovolemia e a hiperosmolalidade do LEC. Eles exercem efeitos aditivos quando aplicados simultaneamente, entretanto, uma discreta diminuição da osmolalidade plasmática é capaz de diminuir a secreção de OT e AVP a despeito da presença de uma redução no volume plasmático equivalente a 30%. Dessa forma, o controle da osmolalidade plasmática parece ser o fator limitante quando os dois estímulos são apresentados simultaneamente (Stricker & Verbalis, 1986).

A OT tem suas principais ações descritas no aparelho reprodutor feminino, especificamente no trabalho de parto (ação uterotônica) e na lactopoiese. Em 1958,

Brooks & Pickford atribuíram, pela primeira vez, uma ação natriurética a este hormônio. Posteriormente, Soares *et al* (1999) demonstraram o envolvimento do sistema GMP cíclico nesta via e propuseram uma ação direta da OT sobre o átrio cardíaco, estimulando a secreção do peptídeo natriurético atrial (ANP), de ação natriurética mais potente. Dessa forma, um aumento na concentração plasmática de OT causado pela hiperosmolalidade do LEC, além de promover diretamente a natriurese, amplifica este sinal estimulando a liberação de ANP do átrio direito (Antunes-Rodrigues *et al*, 1991). Estudos posteriores mostraram que receptores para OT são transcritos no coração, reforçando a hipótese de que este hormônio desempenha função fisiológica neste sítio (Jankowski *et al*, 1998).

A AVP, por sua vez, é mais conhecida por seu efeito antidiurético e vasoconstritor; porém também possui ação termorreguladora. Além disso, desempenha a função de secretagogo fraco do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por meio dos receptores  $V_{1b}$ . Os receptores vasopressinérgicos do subtipo  $V_{1a}$  estão envolvidos no controle da pressão arterial, enquanto que os receptores  $V_2$  localizam-se predominantemente nas células principais dos dutos coletores renais. Suas funções estão ligadas ao efeito antidiurético da AVP e, quando ativados, levam à inserção da proteína aquaporina 2 na membrana luminal das células tubulares do néfron distal, promovendo a reabsorção de água. Estudos também sugerem um papel estimulatório para a AVP sobre a secreção de ANP (Mukoyama *et al*, 1987; Elias *et al*, 2000).

O modelo baseado da expansão aguda do volume extracelular (EVEC) tem sido amplamente utilizado com o propósito de compreender os mecanismos que modulam a secreção destes hormônios. Nesta condição experimental, a integridade das vias aferentes e eferentes encontra-se preservada, permitindo a pronta ativação

de sistemas efetores responsáveis pelos ajustes hemodinâmicos, renais e comportamentais observados em resposta às alterações de osmolalidade e volume do líquido circulante. Já foi demonstrado que a EVEC hipertônica (NaCl 0.3M) promove um aumento na concentração plasmática de AVP, OT e ANP e que, ao contrário disso, a EVEC isotônica (NaCl 0.15M), além de estimular a liberação de ANP dos cardiomiócitos e dos terminais hipotalâmicos, promove aumento nas concentrações plasmáticas de OT e diminuição das concentrações plasmáticas de AVP (Haanwinckel *et al*, 1995; Antunes-Rodrigues *et al*, 1991; Ventura *et al*, 2002). Estes resultados também mostraram que ambos os tipos de EVEC estimulam a secreção de corticosterona, sugerindo que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) possa estar envolvido em tais respostas.

De fato, experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a administração de dexametasona, um glicocorticóide sintético, inibe rapidamente a secreção de OT (Durlo *et al*, 2004; Ruginsk *et al*, 2007), mas não de AVP, tanto em resposta à EVEC (Ruginsk *et al*, 2007) quanto em resposta à estimulação colinérgica e angiotensinérgica central (Lauand *et al*, 2007). Além disso, dados imunoistoquímicos revelaram que os neurônios magnocelulares do NSO e NPV, responsáveis pela síntese e secreção de OT e AVP, encontram-se inibidos em animais que receberam dexametasona (Ruginsk *et al*, 2007), mostrando que os glicocorticóides, além de exercer uma grande diversidade de efeitos periféricos, também podem modular a atividade neuronal. Além disso, os glicocorticóides estão envolvidos no controle central de outros sistemas neuroendócrinos, como os eixos gonadal e de crescimento (para revisão, consultar McCann *et al*, 2000).

Sabe-se que, em condições basais, os glicocorticóides encontram-se ligados predominantemente ao receptor de mineralocorticóide (MR), porém quando o eixo

HHA é ativado em situações de estresse ou durante picos ultradianos de secreção, o receptor de glicocorticóide (GR) é recrutado para mediar a resposta desta via (Reul & de Kloet, 1985; Windle *et al*, 1998). Estes dois tipos de receptores apresentam não somente afinidades diferentes dependendo da concentração do ligante, mas também estão distribuídos de forma desigual pelo Sistema Nervoso Central (SNC). Enquanto o GR apresenta uma expressão mais difusa, o MR está restrito a estruturas hipotalâmicas (como o NPV) e ao sistema límbico (hipocampo, amígdala, núcleo septal lateral e algumas áreas corticais) (de Kloet *et al*, 2005). Uma vez ativado, o complexo formado pelo receptor e seu ligante pode se combinar em homo ou heterodímeros e ligar-se a elementos responsivos (GREs) presentes nas regiões promotoras de genes-alvo ou interagir, na forma de monômeros, com fatores de transcrição, controlando indiretamente a transcrição gênica (Beato & Sanchez-Pacheco, 1996).

Por muito tempo esta via genômica foi o único mecanismo descrito, porém, recentemente, foram identificadas algumas ações que independem da ativação destes receptores clássicos (Sandi *et al*, 2006; Orchinik *et al*, 1991; Mikics *et al*, 2004; Limbourg *et al*, 2002). Estes efeitos são observados quase que instantaneamente à secreção hormonal e não podem ser bloqueados por meio da inibição da síntese protéica, portanto eles são descritos como ações não genômicas ou não dependentes de transcrição (Newton, 2000). Nesse sentido, em 2003, Limbourg e Liao demonstraram, no modelo de infarto agudo de miocárdio, que o tratamento com glicocorticóides estimula a síntese rápida de óxido nítrico (NO) em células do endotélio vascular, resultando em uma diminuição da injúria tissular normalmente associada à isquemia. Diversas evidências apontam ainda para a participação desta via rápida de ação dos glicocorticóides sobre a secreção de

hormônios hipotalâmicos, envolvendo diversos sistemas neuromoduladores centrais, dentre eles o sistema canabinóide endógeno, alvo de estudo deste trabalho.

O estudo dos benefícios farmacológicos de substâncias derivadas da planta *Cannabis sativa* surgiu há muito tempo na medicina grega e romana e, mais recentemente, tem se voltado à participação de seus derivados em diversos mecanismos comportamentais. Estudos pioneiros mostraram que a administração exógena destes compostos inibe a atividade de diversos eixos hipotálamo-hipofisários, incluindo o eixo tireoideano, gonadal e de crescimento (Lomax, 1970; Tyrey, 1978; Rettori *et al*, 1990). Somente em 1988 foi descrito o primeiro tipo de receptor no SNC para as chamadas substâncias *cannabis-like*, que corresponde ao atual receptor de endocanabinóides do subtipo CB<sub>1</sub>. A distribuição predominantemente central do receptor CB<sub>1</sub> sugeriu, inicialmente, uma clara correlação anatômica com os sistemas cognitivo, afetivo e motor. Pouco tempo depois, foi caracterizado o segundo tipo (CB<sub>2</sub>), de localização mais periférica e apresentando apenas 44% de homologia estrutural com o primeiro tipo identificado. A partir de então, diversos estudos realizados com o objetivo de identificar os ligantes fisiológicos para esses receptores levaram à descoberta da anandamida (AEA), o primeiro endocanabinóide descrito. Além desta substância, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) também se encontra entre os ligantes endógenos mais comumente estudados. Apesar de normalmente serem descritos em conjunto, a AEA e o 2-AG são produzidos e degradados por vias enzimáticas independentes, além de possuir propriedades farmacológicas distintas (para revisão, consultar Freund *et al*, 2003).

Diversas evidências sugerem que os endocanabinóides possam participar do controle neuroendócrino da função hipotalâmica e hipofisária. Já foi demonstrado

que o RNA mensageiro (RNAm) do receptor CB<sub>1</sub> é expresso no NPV e NSO, bem como na camada externa da EM de roedores (Wittmann *et al*, 2007; Herkenham *et al*, 1991). Além disso, Scorticati *et al* (2003) mostraram que a administração central de AEA inibe a secreção de prolactina (PRL) induzida por estrógeno. O receptor CB<sub>1</sub> foi também identificado nas porções intermediária e anterior da hipófise humana, apesar de sua expressão ser relativamente baixa na hipófise posterior (Pagotto *et al*, 2001). Aliados à evidência da produção local de endocanabinóides pela hipófise (Pagotto *et al*, 2001), estes dados reforçam a hipótese de uma interação direta dos canabinóides endógenos com o controle de componentes do eixo hipotálamo-hipofisário.

Além disso, o receptor CB<sub>1</sub> é expresso no NTS (Tsou *et al*, 1998) e a administração central de agonistas CB<sub>1</sub> afetam a pressão arterial e a frequência cardíaca (Lake *et al*, 1997). A microinjeção de um antagonista CB<sub>1</sub> no NTS resulta em um atraso no retorno aos níveis pressóricos basais após ativação do baroreflexo (Rademacher *et al*, 2003), sugerindo que os endocanabinóides possam não só controlar diretamente a atividade hipotalâmica, mas também modular outras áreas das quais partem projeções diretas ou indiretas para o sistema hipotálamo-hipofisário.

Por outro lado, descobertas recentes de diferentes grupos têm proposto que outros tipos celulares, como os astrócitos, possam ter uma função muito importante na comunicação interneuronal. Esta hipótese é baseada no fato de que astrócitos hipocampais expressam funcionalmente o receptor CB<sub>1</sub>, e respondem com elevação das concentrações intracelulares de cálcio à liberação de neurotransmissores pelos neurônios hipocampais (Navarrete & Araque, 2008).

A participação direta do sistema endocanabinóide no controle hipotalâmico da secreção de AVP e OT também tem sido o foco de diversos estudos. Di *et al* (2003 e 2005) mostraram que os canabinóides endógenos podem agir diretamente em neurônios magnocelulares e parvocelulares do NSO e NPV, participando ainda de diversos mecanismos homeostáticos e de respostas adaptativas ao estresse, como dor (Meng *et al*, 1998) e saciedade (Matias & Di Marzo, 2006). Estes estudos têm sugerido que os endocanabinóides atuem como mensageiros retrógrados em terminais pré-sinápticos do NPV e NSO, inibindo, *in vitro*, a liberação de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, bem como facilitando a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), de ação inibitória (Di *et al*, 2003 e 2005). Além disso, existem diversos estudos mostrando que outros mecanismos autócrinos e parácrinos possam modular a atividade neuronal no NPV e NSO. Entre eles, os experimentos desenvolvidos por Oliet e colaboradores (2007), bem como McDonald *et al* (2008), sugerem que a OT liberada de dendrites para o espaço extracelular pode regular a liberação de GABA e endocanabinóides, modulando a excitabilidade dos terminais pós-sinápticos.

Utilizando-se de técnicas que avaliam os efeitos centrais e periféricos observados em resposta ao aumento do volume e/ou da osmolalidade do LEC, este trabalho visa contribuir para a avaliação do papel exercido pelos endocanabinóides sobre a ativação neuronal, síntese e secreção dos hormônios neuro-hipofisários no modelo experimental de EVEC.

**OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração de um agonista (AEA) ou de um antagonista (rimonabanto) dos receptores canabinóides do subtipo CB<sub>1</sub> sobre a síntese e secreção de corticosterona, AVP, OT e PRL em ratos submetidos à EVEC isotônica e hipertônica.

Especificamente, este trabalho se propôs a:

1. Avaliar os efeitos da administração prévia de um agonista (AEA, 100ng/4μl, por via intracerebroventricular (icv)) ou de um antagonista (Rimonabanto 10mg/kg, por via intragástrica (gavagem)) dos receptores de canabinóides do subtipo CB<sub>1</sub> sobre a secreção hormonal de corticosterona, AVP, OT e PRL em resposta à EVEC isotônica e hipertônica;
2. Avaliar os efeitos da administração prévia de um agonista (AEA, 100ng/4μl, por via intracerebroventricular (icv)) ou de um antagonista (Rimonabanto 10mg/kg, por via intragástrica (gavagem)) dos receptores de canabinóides do subtipo CB<sub>1</sub> sobre o conteúdo hipotalâmico de glutamato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.
3. Avaliar os efeitos da administração prévia de um agonista (AEA, 100ng/4μl, por via intracerebroventricular (icv)) ou de um antagonista (Rimonabanto 10mg/kg, por via intragástrica (gavagem)) dos receptores de canabinóides do subtipo CB<sub>1</sub> sobre o conteúdo hipotalâmico de nitrato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.
4. Avaliar os efeitos da administração prévia de um agonista (AEA, 100ng/4μl, por via intracerebroventricular (icv)) ou de um antagonista (Rimonabanto 10mg/kg, por via intragástrica (gavagem)) dos receptores de canabinóides do subtipo CB<sub>1</sub> sobre a marcação nuclear da proteína c-Fos e de sua eventual co-localização fenotípica com os hormônios AVP e OT em neurônios

magnocelulares do NPV e NSO de animais submetidos à EVEC isotônica e hipertônica;

5. Avaliar os efeitos da administração prévia de um agonista (AEA, 100ng/4μl, por via intracerebroventricular (icv)) ou de um antagonista (Rimonabanto 10mg/kg, por via intragástrica (gavagem)) dos receptores de canabinóides do subtipo CB<sub>1</sub> sobre o conteúdo de RNA mensageiro para OT e AVP no NPV e NSO de animais submetidos à EVEC isotônica e hipertônica.

***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 250-330g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina (FMRP – USP), em ambiente com temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luz controlada (das 7 às 19 horas). O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Campus da USP de Ribeirão Preto, sob o protocolo nº 073/2006.

Após a habituação, os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos segundo o protocolo e divididos em diferentes grupos experimentais. Para os experimentos de injeção central, foram utilizados animais portadores de cânula no ventrículo lateral direito e na veia jugular externa. No dia do experimento, os animais foram submetidos à administração icv de AEA (100ng/4 $\mu\text{l}$ ) 10 minutos antes da indução da EVEC isotônica ou hipertônica. Foram considerados controles os animais injetados centralmente com o veículo da respectiva droga em volume equivalente. Para os experimentos com o antagonista canabinóide Rimonabanto (10mg/kg), os animais foram habituados ao procedimento de gavagem por, no mínimo, 3 dias, e, em seguida, submetidos à canulação da veia jugular externa. No dia do experimento, 60 minutos antes da EVEC, foi realizada a administração oral de Rimonabanto (10mg/kg) ou de seu veículo em volume equivalente.

## **CIRURGIAS**

### **Canulação do ventrículo lateral direito:**

Foram utilizadas para confecção das cânulas agulhas de aço inoxidável de 0,7 mm de diâmetro externo, 0,4 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento. Os animais foram previamente anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol a 2,5% (TBE, 1ml/100g de peso corporal, i.p.) e, a seguir, posicionados no estereotáxico. A calota craniana foi então exposta e os referenciais bregma e lambda foram alinhados no plano horizontal. A canulação do ventrículo lateral foi feita com base nas seguintes coordenadas:

- ântero-posterior: 0,5 mm posterior ao bregma;
- lateral: 1,4 mm para a direita em referência ao bregma.

A partir da determinação deste ponto, por meio de um orifício previamente perfurado com o auxílio de uma broca de dentista, a cânula foi inserida 3,6 mm abaixo da superfície da calota craniana e fixada sobre a mesma por meio de um capacete de acrílico autopolimerizável (Simplex). Para evitar a obstrução de sua luz por detritos e, por ocasião da injeção central, o refluxo das soluções administradas, foi mantido um mandril de aço dentro de cada cânula. Após o término da cirurgia, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (50000 unidades de penicilina G) por via intramuscular.

Ao final da cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso a água e comida, passando por um período de recuperação de 5 a 7 dias, durante o qual eles foram manipulados diariamente a fim de adaptá-los aos procedimentos experimentais.

### **Canulação da veia jugular:**

No dia anterior ao experimento, os animais foram submetidos à canulação da veia jugular direita, seguindo-se a técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). Sumariamente, após a anestesia com TBE (2,5%, 1ml/100g de peso corporal, i.p., Sigma), a cânula de silástico foi introduzida na veia jugular externa e, a seguir, exteriorizada na região cervical dorsal, através de trajeto subcutâneo feito com a ajuda de um trocater. Após sua fixação na pele, a cânula foi lavada com solução isotônica de salina contendo heparina 1:40 (Liquemine, Roche), a fim de evitar obstrução da mesma. A recuperação dos animais foi realizada em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum*.

### **DROGAS**

Para avaliar a modulação do sistema canabinóide endógeno sobre os diversos eventos investigados e descritos anteriormente, foram utilizadas as drogas AEA (Sigma), agonista específico CB<sub>1</sub>, na dose de 100ng/4μl, dissolvida em solução de etanol 0.3% em NaCl 0.15M, para administração icv 10 minutos antes da indução da EVEC. O antagonista CB<sub>1</sub> Rimonabanto (Acomplia®, Sanofi Aventis, 10mg/kg) foi diluído em solução de Tween 80 0.1% em NaCl 0.15M e administrado por via intragástrica (gavagem) 1 hora antes da realização da EVEC.

## **EXPANSÃO ISOTÔNICA OU HIPERTÔNICA DO VOLUME EXTRACELULAR**

No dia do experimento, uma hora antes da EVEC, as cânulas foram lavadas com um volume de 0,1ml de salina isotônica contendo heparina (1:40). A EVEC foi realizada por meio de infusão endovenosa (volume de 2ml/100g de peso corpóreo) de solução de NaCl hipertônica (0.3M) ou isotônica (0.15M), com temperatura controlada (37 a 40°C), durante o período de um minuto.

### **DOSAGENS HORMONAIS**

Para a determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona, AVP, OT e PRL, o sangue foi coletado do tronco, após a decapitação, em tubos de plástico, mantidos sob gelo, contendo heparina (10µl para cada ml de sangue). A coleta foi realizada imediatamente antes (tempo 0) ou 5 minutos após a realização da EVEC. O plasma foi separado por centrifugação (15 minutos, 3000rpm, 4°C) e submetido à extração específica, exceto para a dosagem de PRL. A corticosterona foi extraída a partir de 25µl de plasma utilizando-se 1ml de etanol (Castro *et al*, 1995). Os hormônios AVP e OT foram extraídos a partir de 1ml de plasma utilizando-se acetona e éter de petróleo. As dosagens hormonais de corticosterona, AVP, OT e PRL foram feitas utilizando-se técnicas específicas de radioimunoensaio descritas por Castro *et al* (1995), Hussain *et al*, (1973), Vecsei (1979) e Haanwinckel *et al* (1991), respectivamente. Os coeficientes de variação intra-insaio e entre ensaios foram, respectivamente, 5.7% e 8.4% para corticosterona, 7.7% e 11.9% para AVP, 7% e 12.6% para OT e 5% e 11.7% para PRL.

## DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE TOTAL DE GLUTAMATO E NITRATO EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

Cinco minutos após a realização da EVEC, os animais foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram removidos e mantidos em gelo. Os núcleos hipotalâmicos NPV e NSO (coordenadas: -0.8mm a -2.1mm em relação ao bregma (Paxinos & Watson, 1997)) e a eminência mediana (EM) foram removidos por *punch* (NPV, agulha de 1.5mm de diâmetro interno) ou dissecação (NSO e EM) e homogenizados em 100 µl de solução de ácido perclórico 0.4M. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação (5000 rpm, por 30 min), o sobrenadante foi separado para a análise do conteúdo de nitrato e glutamato e o precipitado foi novamente homeogenizado em 100 µl de água destilada e utilizado para o cálculo da proteína total da amostra por absorbância (Microplate, Biorad) e posterior correlação. Foi realizada a leitura de uma alíquota de 25µl em um sensor enzimático no qual a enzima L-Glutamato Oxidase encontra-se imobilizada (YSI 2700 Biochemical Analyser, YSI Life Sciences). O conteúdo de glutamato da amostra foi obtido de maneira indireta pela determinação da quantidade de um metabólito da reação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), segundo o esquema abaixo:



Alíquotas de 10µl do sobrenadante foram desproteinizadas com 20µl de etanol e mantidas a -20°C por 30 minutos. A seguir, elas foram centrifugadas (10000rpm, 5 minutos) e o conteúdo de nitrato foi determinado em um analisador quimioluminescente (Sievers 280 NO Analyzer). Como o NO é um gás de meia-vida extremamente curta, a dosagem de um de seus metabólitos, neste caso o nitrato, foi

utilizada como ferramenta metodológica para determinar de maneira indireta a produção de NO nas áreas hipotalâmicas de interesse

## **IMUNOISTOQUÍMICA**

Noventa minutos após a indução da EVEC e conforme os protocolos estabelecidos, os animais foram anestesiados com TBE e, a seguir, perfundidos por meio de punção intracardíaca com 250ml de solução de salina contendo heparina (500UI/l), seguida de 500ml de solução de tampão fosfato (PB, pH 7.2) contendo paraformaldeído (PFA) a 4%. A seguir, os cérebros foram removidos e mantidos em PFA 4%. Depois de 4 horas, eles foram colocados em solução de sacarose a 30% (em PB) a 4°C, onde permaneceram durante, no mínimo, 12-14 horas. A seguir, os tecidos cerebrais foram seccionados em cortes de 30µm de espessura, utilizando-se um criostato (Microm, modelo HM 5000M) e armazenados a -20°C em solução *anti-freezing* até o momento do processamento imunoistoquímico.

Inicialmente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03%), seguida pelo bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina (5%). Posteriormente, para visualização da marcação nuclear para a proteína c-Fos, os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 12-14 horas com o anticorpo primário anti-c-Fos (Ab-5, Oncogene, 1:10000) e, a seguir, incubados com o segundo anticorpo biotinilado (goat anti-rabbit, Vector, 1:200) por um período de 1 hora. Para a coloração, foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector, 1:1000), empregando diaminobenzidina (DAB, Sigma), sulfato de níquel e cloreto de cobalto como cromógenos, cuja reação conferiu ao núcleo neuronal uma coloração de violeta escuro a preto.

Logo após a imunomarcação para c-Fos, foram realizados os procedimentos imunohistoquímicos para o estudo de sua possível co-localização fenotípica com AVP e OT. Para tanto, os cortes foram primeiramente incubados com anticorpos anti-AVP (rabbit, Península, 1:20000) ou anti-OT (rabbit, Península, 1:20000) por um período adicional de 48 horas e, em seguida, incubados com o segundo anticorpo biotinilado respectivo (goat anti-rabbit, Vector, 1:200). A coloração foi realizada utilizando-se somente o complexo DAB como cromógeno, cuja reação conferiu ao citoplasma neuronal uma coloração marrom.

Ao término dos procedimentos acima descritos, os cortes foram montados em lâminas, secados à temperatura ambiente, e a seguir desidratados com xileno e cobertos com o meio de montagem (Enthelan). A visualização microscópica do tecido avaliou o padrão espacial de imunomarcação por meio de um sistema de videomicroscopia. As imagens foram capturadas em alta resolução por uma câmera (DC 200, Leica) acoplada a um microscópio, e transmitidas a um computador dotado de um programa digitalizador. O NPV e o NSO foram identificados e delimitados em suas distintas regiões de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). Quatro subpopulações neuronais foram avaliadas no NPV: as porções magnocelular medial (PaMM) (AP: -1.30 mm em relação ao bregma), magnocelular lateral (PaLM) e parvocelular medial (PaMP) (AP: -1.8 mm em relação ao bregma) e parvocelular posterior (PaPO) (AP: -2.12mm em relação ao bregma). Os neurônios duplamente marcados para c-Fos-OT e c-Fos-AVP foram também contados na porção medial do NSO (AP: -1.3 mm em relação ao bregma). Secções representativas de 4 a 6 animais de cada condição experimental foram adquiridas no mesmo nível anatômico. A contagem visual foi realizada unilateralmente em uma secção por

animal e foi repetida ao menos por dois pesquisadores alheios às condições experimentais.

## **REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL**

### **Microdissecção e extração de RNA**

Sessenta minutos após a realização da EVEC, os animais foram decapitados, os cérebros foram coletados em condições *RNAse free*, imediatamente congelados em gelo seco e armazenados a -80°C até o momento da extração. As estruturas cerebrais de interesse foram obtidas em um criostato a partir de secções espessas (1500µm, coordenadas de -0.6 a -2.1 mm em relação ao bregma) pela técnica de dissecção ou *punch* (agulha de 1.5mm de diâmetro interno). A seguir, as estruturas foram coletadas em tubos *RNAse free* contendo 30µl de solução RNAlater. O RNA total de cada amostra foi obtido com o uso de Trizol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado por espectrofotometria UV. A integridade do material extraído foi comprovada por eletroforese em gel de agarose 1.2% (60 min a 60V). O cDNA foi então sintetizado a partir de 500 ng de RNA de cada amostra.

### **Análise semi-quantitativa de expressão gênica por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real (Taqman®-pcr).**

As reações foram realizadas em triplicata em um volume total de 12 µl e água foi utilizada como controle negativo. A expressão quantitativa dos genes de AVP e OT, assim como de dois genes constitutivos, foi determinada para cada amostra de cDNA utilizando-se sondas específicas acopladas a fluoróforos (Rn00564446\_g1 (OT), Rn00566449\_m1 (AVP), Rn00667869\_m1 (beta-actina) e Rn99999916\_s1

(GAPDH), Applied Biosystems). Os dados foram obtidos em tempo real (Real-Time PCR System, Applied Biosystems) e a expressão relativa dos genes-alvo foi calculada pelo método do  $\Delta\Delta\text{CT}$ . Para cada amostra, o ciclo (Ct) em que a quantidade de fluorescência emitida durante as reações ultrapassou o limiar de detecção do sistema foi determinado e normalizado pela média geométrica dos Cts dos controles endógenos ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{\text{controles endógenos}}$ ). O aumento relativo no conteúdo de RNAm da amostra desconhecida foi determinado pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , onde  $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \Delta\text{Ct}_{\text{controle absoluto}}$ . Os dados foram apresentados em expressão relativa ao grupo controle absoluto dos experimentos (veículo sem EVEC).

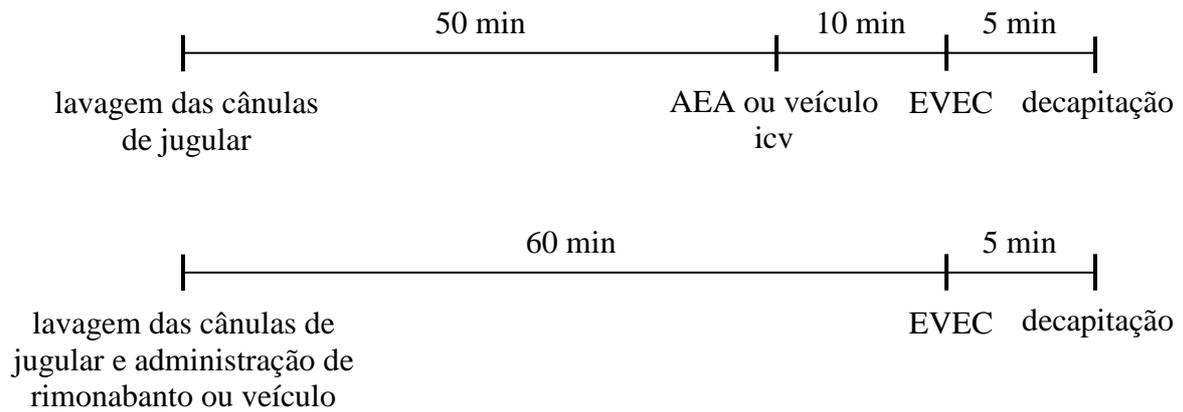
## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram expressos como médias  $\pm$  SEM. Os testes estatísticos utilizados foram: “two way ANOVA” seguido do teste de comparações múltiplas (Newman-Keuls). Foram consideradas variáveis deste estudo a EVEC (isotônica ou hipertônica) e o tratamento utilizado (agonista ou antagonista dos receptores  $\text{CB}_1$ ). O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$ .

***PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS***

## 1 - DOSAGENS HORMONAIS

Abaixo encontram-se esquematizadas as linhas temporais de procedimentos realizados para as dois diferentes tratamentos utilizados neste protocolo experimental.



O sangue coletado do tronco foi utilizado para determinação das concentrações plasmáticas de AVP, OT, PRL e corticosterona por técnicas específicas de radioimunoensaio.

**1A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB<sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre a secreção de corticosterona, AVP, OT e PRL em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

### **1A.1 - Corticosterona**

A Figura 1A.1 representa os valores plasmáticos de corticosterona em animais previamente tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Considerando os grupos que receberam veículo, podemos observar que a EVEC não alterou significativamente a secreção de corticosterona. Nos grupos pré-tratados com AEA, pôde ser observada uma diminuição significativa da secreção de corticosterona tanto nos animais submetidos à EVEC isotônica ( $17.61 \pm 0.99$  vs  $13.37 \pm 1.12$ ,  $p < 0.05$ ) quanto hipertônica ( $17.61 \pm 0.99$  vs  $13.96 \pm 1.45$ ,  $p < 0.05$ ), quando comparados ao grupo não submetido à EVEC. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com veículo e tratados com AEA.

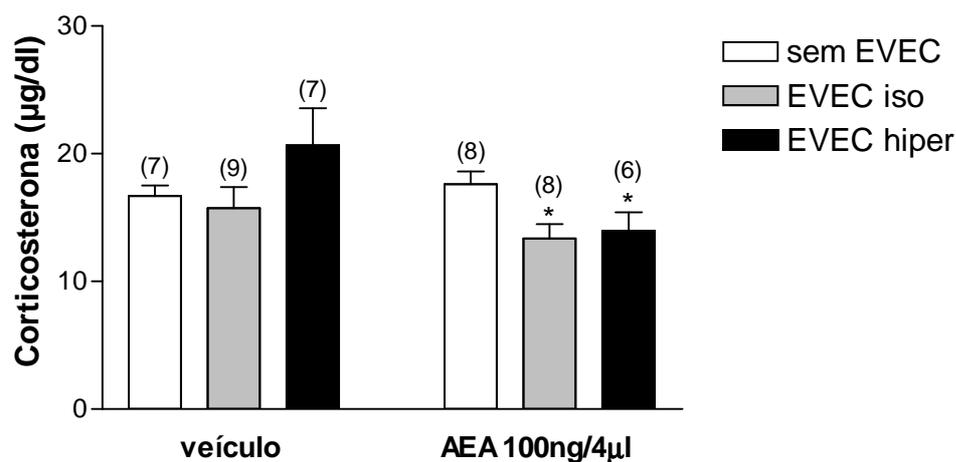


Figura 1A.1 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre a secreção de corticosterona induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.

\* $p < 0.05$  em relação ao grupo AEA sem EVEC.

### 1A.2 - Vasopressina

A secreção de AVP em animais pré-tratados com AEA ou veículo e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica está representada no gráfico a seguir (Figura 1A.2). Os dados mostram que a secreção de AVP não foi alterada pela EVEC isotônica, porém foi aumentada em animais submetidos à EVEC hipertônica ( $1.33 \pm 0.09$  vs  $5.82 \pm 1.09$ ,  $p < 0.001$ ).

A Figura 2 mostra ainda que a secreção de AVP no grupo submetido à EVEC isotônica foi potencializada pelo pré-tratamento com AEA ( $1.14 \pm 0.11$  vs  $1.89 \pm 0.19$ ,  $p < 0.05$ ) e que, por outro lado, a administração prévia de AEA não alterou significativamente a secreção de AVP induzida pela EVEC hipertônica ( $5.82 \pm 1.09$  vs  $8.46 \pm 1.05$ ).

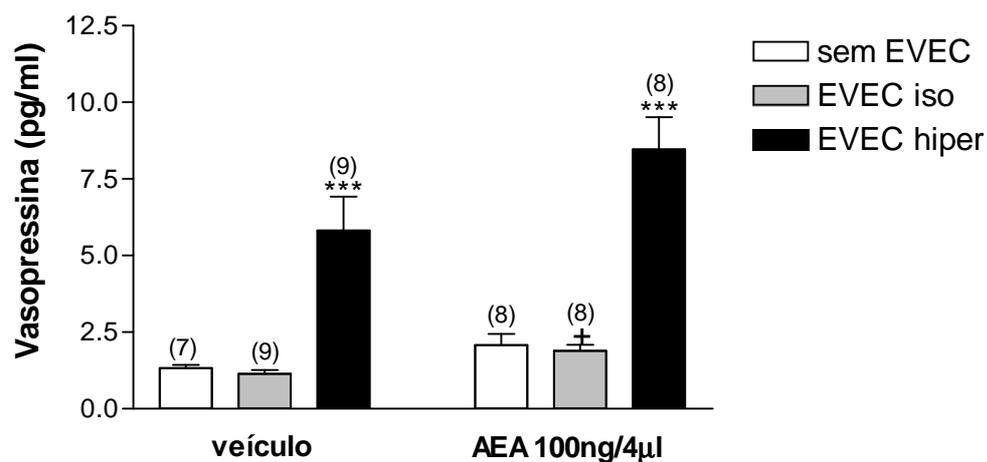


Figura 1A.2 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre a secreção de AVP induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC ou AEA sem EVEC e  $\dagger p < 0.05$  em relação ao grupo veículo + EVEC isotônica.

### 1A.3 - Ocitocina

Na Figura 1A.3 estão representados os valores plasmáticos de OT observados em animais pré-tratados com AEA ou veículo e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Considerando inicialmente os grupos que receberam injeção central de veículo, podemos observar que a secreção de OT não foi significativamente alterada em resposta à EVEC isotônica ( $7.58 \pm 0.39$  vs  $6.43 \pm 1.78$ ). Por outro lado, a EVEC hipertônica induziu um aumento significativo na secreção deste hormônio ( $7.58 \pm 0.39$  vs  $46.82 \pm 5.42$ ,  $p < 0.001$ ).

Nos grupos pré-tratados com AEA, os dados apontam para uma diminuição da secreção de OT em resposta à EVEC isotônica, porém os valores não são estatisticamente diferentes dos encontrados para o grupo não expandido ou tratado com veículo. Por outro lado, os animais previamente tratados com AEA apresentam

uma atenuação da secreção de OT em resposta à EVEC hipertônica ( $46.82 \pm 5.41$  vs  $23.74 \pm 4.67$ ,  $p < 0.05$ ).

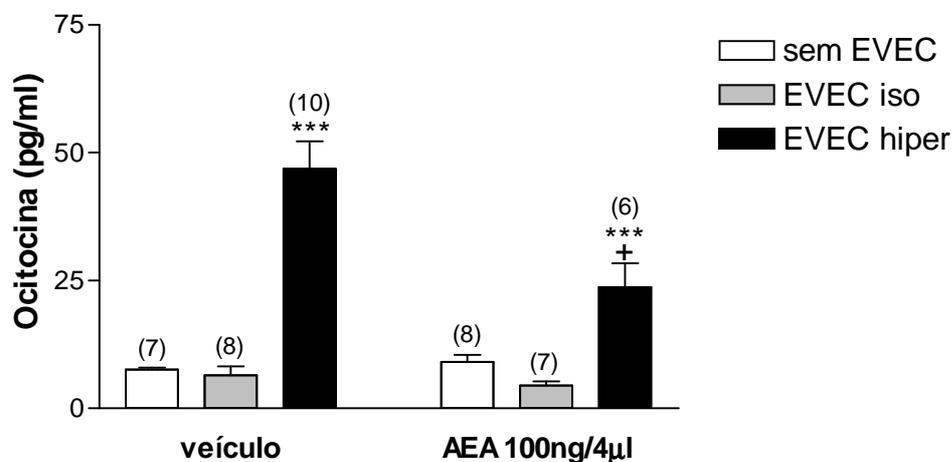


Figura 1A.3 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre a secreção de OT induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo ou AEA sem EVEC, + $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo + EVEC hipertônica.

#### 1A.4 – Prolactina

Na figura 1A.4 estão representados os efeitos da administração central de AEA sobre as concentrações plasmáticas de PRL em animais submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Como pode ser observado, a EVEC hipertônica induziu aumento significativo na secreção de PRL ( $1.86 \pm 0.60$  vs  $6.53 \pm 2.84$ ,  $p < 0.001$ ), resposta que foi abolida pelo pré-tratamento com AEA ( $34.90 \pm 7.98$  vs  $6.53 \pm 2.84$ ,  $p < 0.001$ ). Apesar da aparente redução da secreção de PRL nos animais tratados com AEA e submetidos à EVEC isotônica, quando comparados aos animais que receberam veículo, não foi encontrada diferença significativa em relação ao tratamento.

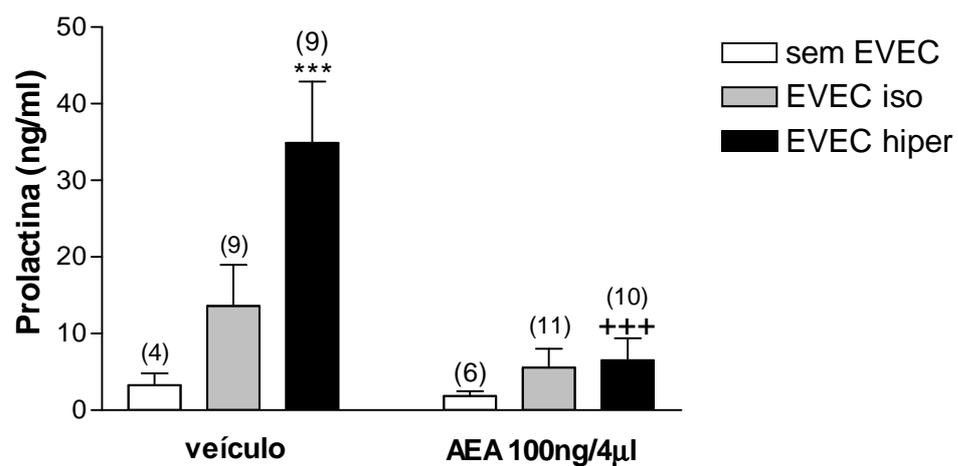


Figura 1A.4 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre a secreção de PRL induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC, +++ $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo + EVEC hipertônica.

**1B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB<sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre a secreção de corticosterona, AVP, OT e PRL em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

**1B.1 - Corticosterona**

A figura 1B.1 mostra os efeitos da administração de rimonabanto sobre a secreção de corticosterona induzida pela EVEC. Como pode ser observado, tanto a EVEC isotônica quanto a EVEC hipertônica induzem um aumento na secreção de corticosterona. Os dados preliminares sugerem que a prévia administração de rimonabanto tenha um pequeno efeito potencializador da secreção de corticosterona induzida pela EVEC. O número de animais apresentado ainda é pequeno, porém todos os experimentos já foram realizados para as dosagens por radioimunoensaio, sendo que os resultados finais serão apresentados oportunamente.

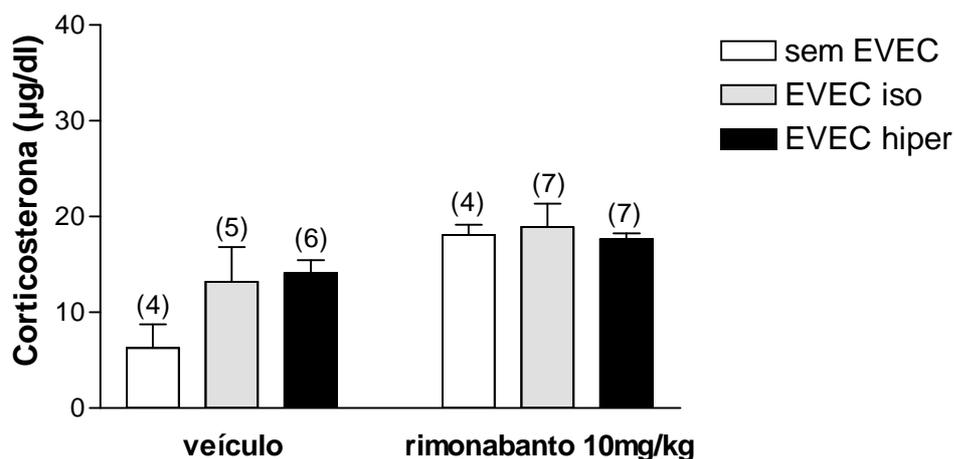


Figura 1B.1 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a secreção de corticosterona induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM.

## 1B.2 - Vasopressina

A figura 1B.2 representa os valores plasmáticos de AVP encontrados em animais pré-tratados com rimonabanto ou veículo e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Os dados mostram que somente a EVEC hipertônica induziu aumento significativo na secreção de AVP ( $1.34 \pm 0.80$  vs  $9.23 \pm 1.15$ ,  $p < 0.05$ ). O pré-tratamento com rimonabanto, contudo, potencializou o efeito da EVEC hipertônica sobre a secreção deste hormônio ( $9.23 \pm 1.15$  vs  $13.29 \pm 2.47$ ,  $p < 0.05$ ).

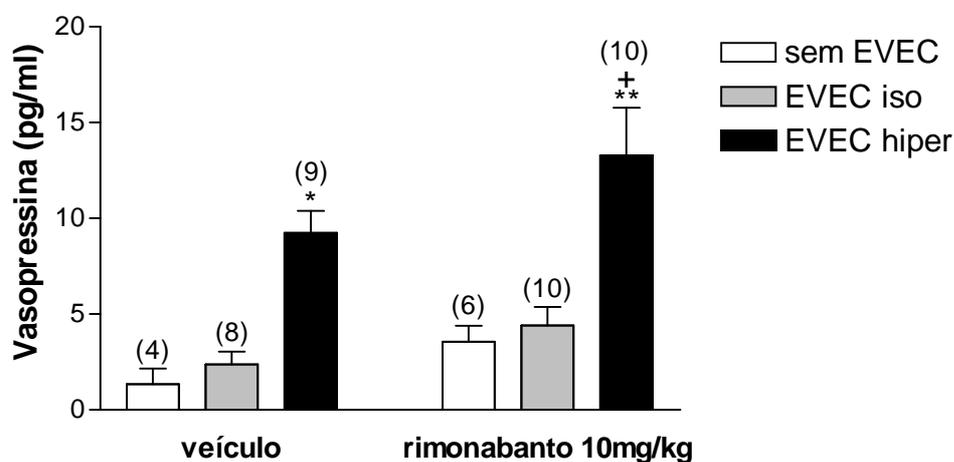


Figura 1B.2 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a secreção de AVP induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo ou rimonabanto sem EVEC. † $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo + EVEC hiper.

## 1B.3 - Ocitocina

O gráfico a seguir (figura 1B.3) representa os efeitos do pré-tratamento com rimonabanto ou veículo sobre os valores plasmáticos de OT em animais submetidos à EVEC. Podemos observar que tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica

aumentam a secreção de OT ( $4.03 \pm 1.50$  vs  $10.81 \pm 1.45$ ,  $p < 0.05$  para a EVEC isotônica;  $4.03 \pm 1.50$  vs  $31.08 \pm 3.04$ ,  $p < 0.01$  para a EVEC hipertônica).

O pré-tratamento com rimonabanto potencializou significativamente a resposta de secreção de OT à EVEC hipertônica ( $31.08 \pm 3.04$  vs  $75.98 \pm 8.72$ ,  $p < 0.001$ ), porém não alterou a secreção deste hormônio induzida pela EVEC isotônica.

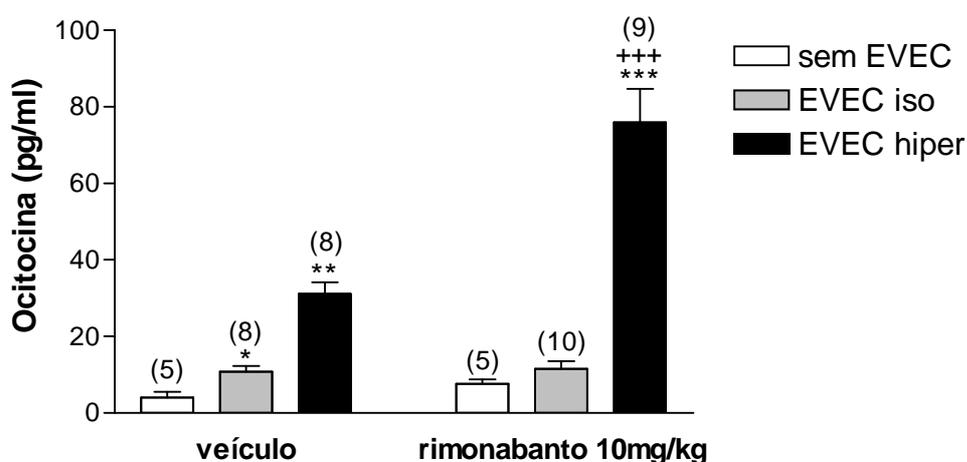


Figura 1B.3 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a secreção de OT induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. +++ $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo + EVEC hiper.

#### 1B.4 – Prolactina

Na figura 1B.4 estão representados os efeitos da administração prévia de rimonabanto sobre as concentrações plasmáticas de PRL em animais submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Os dados mostram que tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica induziram aumento na secreção de PRL, porém esse resultado só foi estatisticamente significativo para o estímulo osmótico ( $6.08 \pm 0.41$  vs  $24.37 \pm 4.45$ ,  $p < 0.01$ ). Esta resposta foi potencializada pelo pré-tratamento com

rimonabanto, sendo apenas significativa no grupo submetido à EVEC isotônica (16.92±2.70 vs 38.19±8.85, p<0.01).

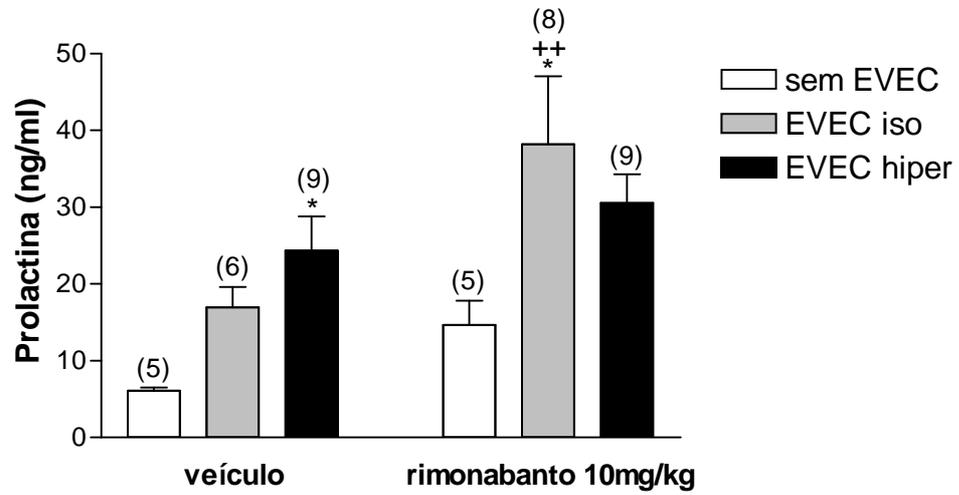
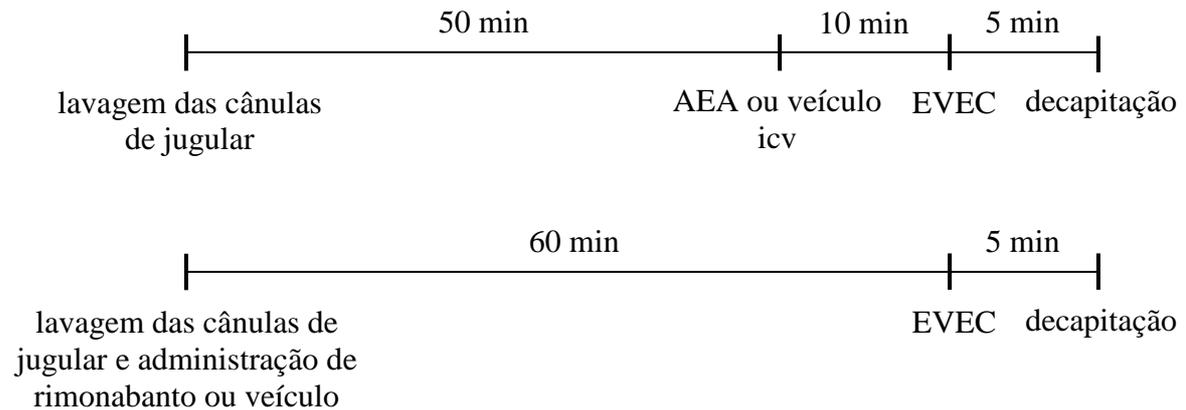


Figura 1B.4 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a secreção de PRL induzida pela EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM. \*p<0.05 em relação ao grupo veículo ou rimonabanto sem EVEC, \*\*p<0.01 em relação ao grupo veículo + EVEC isotônica.

## 2 - CONTEÚDO HIPOTALÂMICO DE GLUTAMATO

Para a realização deste protocolo experimental, os diferentes grupos foram submetidos aos procedimentos esquematizados abaixo:



Após a decapitação, os cérebros foram rapidamente removidos e mantidos em gelo. Os núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO) e a EM foram removidos por *punch* ou dissecção e processados para determinação do conteúdo hipotalâmico de glutamato segundo técnica descrita anteriormente. Os valores de glutamato foram expressos em porcentagem (%) do grupo controle. Considerando o protocolo de injeção central de AEA, os valores basais de conteúdo de glutamato para o grupo veículo sem EVEC foram de  $21.15 \pm 0.67$ ,  $3.00 \pm 1.91$ , e  $3.00 \pm 1.60$  mmol/mg de proteína, respectivamente para o NPV, NSO e EM. Para os experimentos de administração periférica de rimonabanto, foram utilizados para esta normalização os valores de  $0.42 \pm 0.14$  para o NPV,  $0.59 \pm 0.13$  para o NSO e 0 mmol/mg de proteína para a EM.

**2A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB<sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre o conteúdo hipotalâmico de glutamato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

**2A.1 - NPV**

A Figura 2A.1 representa o conteúdo total de glutamato no NPV de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Os dados obtidos mostram que tanto a EVEC isotônica quanto a hipertônica induziram aumento significativo no conteúdo total de glutamato no NPV, quando comparadas ao grupo veículo sem EVEC (100.00±3.19 vs 175.25±16.14, p<0.001 para a EVEC isotônica; 100.00±3.19 vs 193.45±14.39, p<0.001 para a EVEC hipertônica). Este perfil de resposta foi mantido nos animais pré-tratados com AEA, mostrando que a administração central desta droga não altera o conteúdo total de glutamato do NPV.

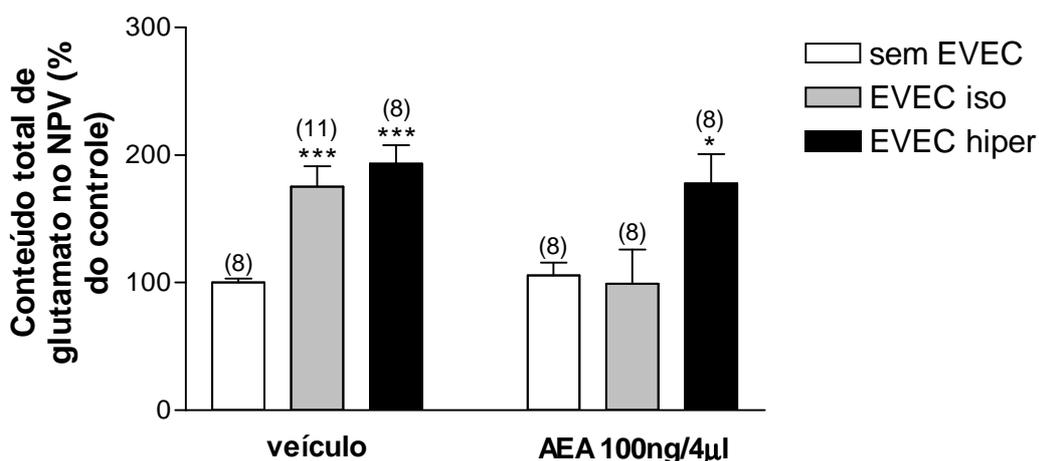


Figura 2A.1 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4μl) ou veículo sobre o conteúdo total de glutamato no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM. \*\*\*p<0.001 e \*p<0.05 em relação ao grupo veículo ou AEA sem EVEC.

## 2A.2 - NSO

O gráfico que avalia o conteúdo glutamatérgico no NSO de animais que receberam previamente AEA ou veículo e submetidos à EVEC está apresentado a seguir (Figura 2A.2). Como podemos observar, a EVEC hipertônica induziu um aumento de aproximadamente 10 vezes no conteúdo de glutamato no NSO ( $100.00 \pm 63.78$  vs  $1194.34 \pm 272.72$ ,  $p < 0.001$ ). O pré-tratamento com AEA potencializou este efeito tanto para a EVEC isotônica ( $467.94 \pm 226.14$  vs  $3006.32 \pm 431.15$ ,  $p < 0.001$ ) quanto para a EVEC hipertônica ( $1194.34 \pm 272.72$  vs  $6824.29 \pm 628.78$ ,  $p < 0.001$ ).

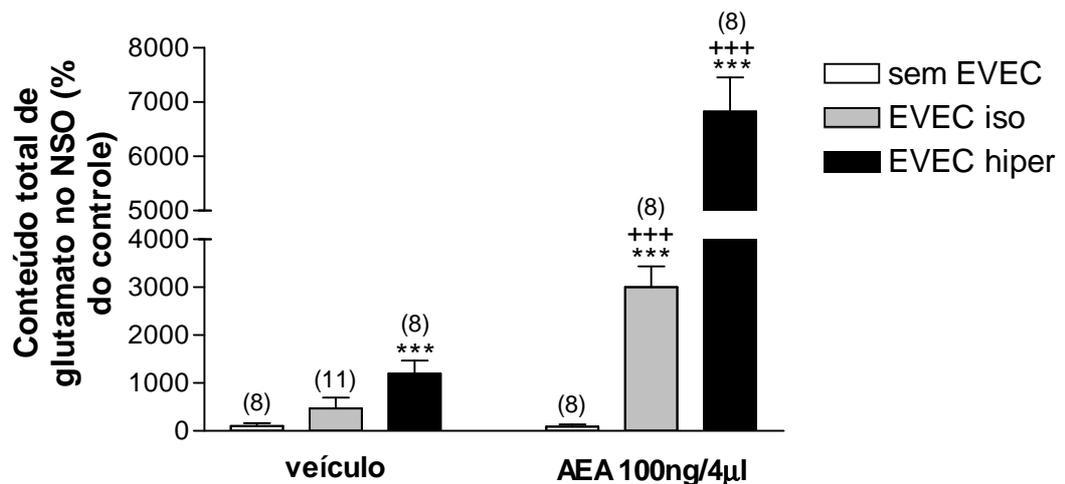


Figura 2A.2 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre o conteúdo total de glutamato no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo ou AEA sem EVEC e +++  $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo + EVEC correspondente.

## 2A.3 - EM

A figura 2A.3 representa o efeito da administração prévia de AEA ou veículo sobre o conteúdo glutamatérgico da EM de animais submetidos à EVEC isotônica ou

hipertônica. Como podemos observar, a EVEC isotônica induziu um grande aumento no conteúdo de glutamato na EM ( $100.00 \pm 53.43$  vs  $2328.88 \pm 508.73$ ,  $p < 0.001$ ). Uma resposta de menor amplitude foi também observada em resposta à EVEC hipertônica, porém estes valores não foram estatisticamente diferentes dos observados para o grupo veículo sem EVEC.

Por outro lado, também pode ser observado que a prévia administração de AEA provocou a inversão destas respostas. Os animais que receberam o agonista  $CB_1$  e que foram submetidos à EVEC isotônica apresentaram uma atenuação da resposta do conteúdo de glutamato, se comparados aos animais que receberam o veículo e que foram submetidos ao mesmo estímulo ( $2328.88 \pm 508.73$  vs  $515.66 \pm 167.86$ ,  $p < 0.001$ ). Contrariamente, o pré-tratamento com AEA potencializou a resposta induzida pela EVEC hipertônica ( $608.00 \pm 187.65$  vs  $1706.66 \pm 389.76$ ,  $p < 0.01$ ).

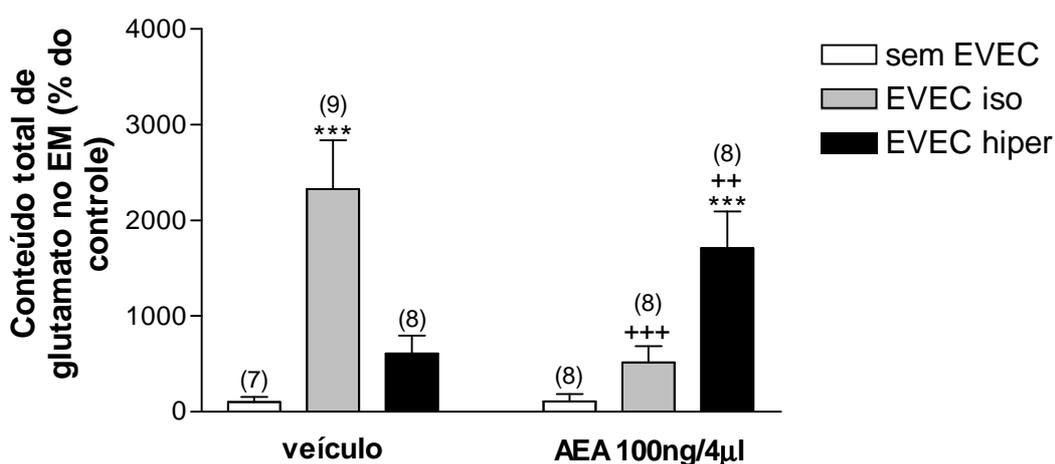


Figura 2A.3 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre o conteúdo total de glutamato na EM em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo ou AEA sem EVEC. ++ $p < 0.01$  e +++ $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo + EVEC correspondente.

**2B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB<sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre o conteúdo hipotalâmico de glutamato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

### **2B.1 - NPV**

De acordo com a Figura 2B.1, pode ser observado que a EVEC hipertônica induziu aumento de cerca de 6 vezes no conteúdo de glutamato no NPV ( $99.99 \pm 33.07$  vs  $625.00 \pm 77.76$ ,  $p < 0.001$ ). Embora a EVEC isotônica também tenha produzido aumento no conteúdo total de neurotransmissor neste núcleo hipotalâmico, não foi observada diferença estatística entre os valores obtidos para este grupo e os de seu respectivo controle.

A figura mostra ainda que o pré-tratamento com rimonabanto depletou o conteúdo de glutamato no NPV, tanto em resposta à EVEC isotônica ( $314.34 \pm 80.74$  vs  $122.99 \pm 57.37$ ,  $p < 0.05$ ) quanto hipertônica ( $625.00 \pm 77.76$  vs  $134.93 \pm 60.55$ ,  $p < 0.001$ ), assemelhando os valores encontrados aos da resposta basal.

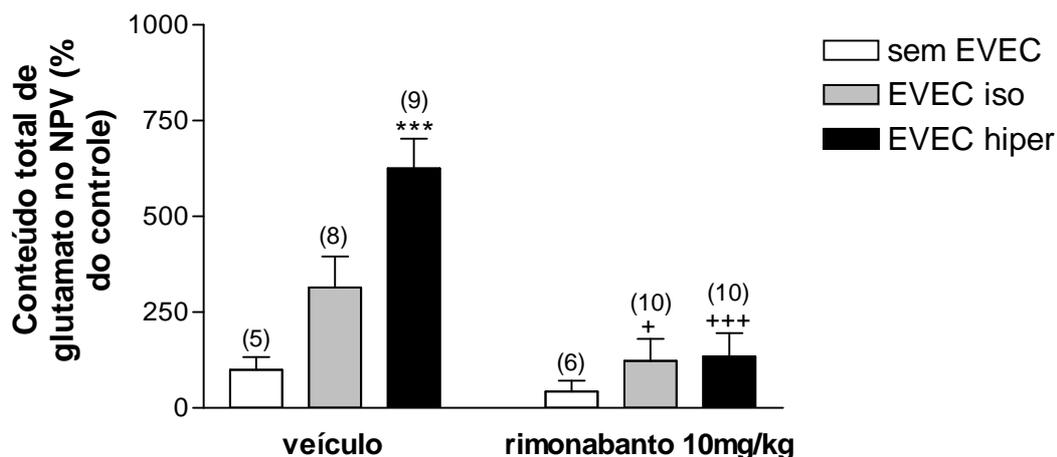


Figura 2B.1 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre o conteúdo total de glutamato no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. + $p < 0.05$  e +++ $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo + EVEC correspondente.

## 2B.2 - NSO

A Figura 2B.2 representa o efeito da administração prévia de rimonabanto sobre o conteúdo de glutamato no NSO de animais submetidos à EVEC. Os dados mostram que ambos os tipos de EVEC induzem um aumento de cerca de 100% no conteúdo de glutamato neste núcleo, porém estes resultados não são estatisticamente diferentes dos obtidos para o grupo veículo sem EVEC. A exemplo do observado para o NPV, o pré-tratamento com rimonabanto impediu o aumento no conteúdo de glutamato induzido tanto pela EVEC isotônica ( $183.24 \pm 25.71$  vs  $70.04 \pm 26.12$ ,  $p < 0.01$ ) quanto hipertônica ( $188.24 \pm 20.59$  vs  $88.10 \pm 24.77$ ,  $p < 0.01$ ).

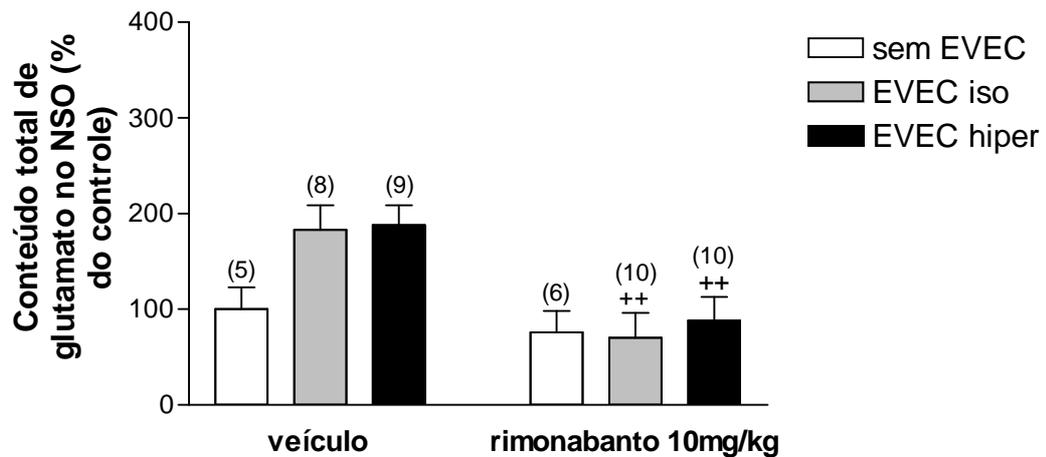


Figura 2B.2 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre o conteúdo total de glutamato no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. ++ $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo + EVEC correspondente.

### 2B.3 - EM

A figura 2B.3 mostra o efeito da administração prévia de rimonabanto ou veículo sobre o conteúdo de glutamato na EM de animais submetidos à EVEC. Como podemos observar, a EVEC induziu um aumento no conteúdo de glutamato na EM, porém estes valores não foram estatisticamente diferentes dos obtidos para o grupo veículo sem EVEC, que apresentou concentrações extremamente baixas de glutamato nesta área. Também pode ser observado que o pré-tratamento com rimonabanto não alterou significativamente a resposta induzida pela EVEC.

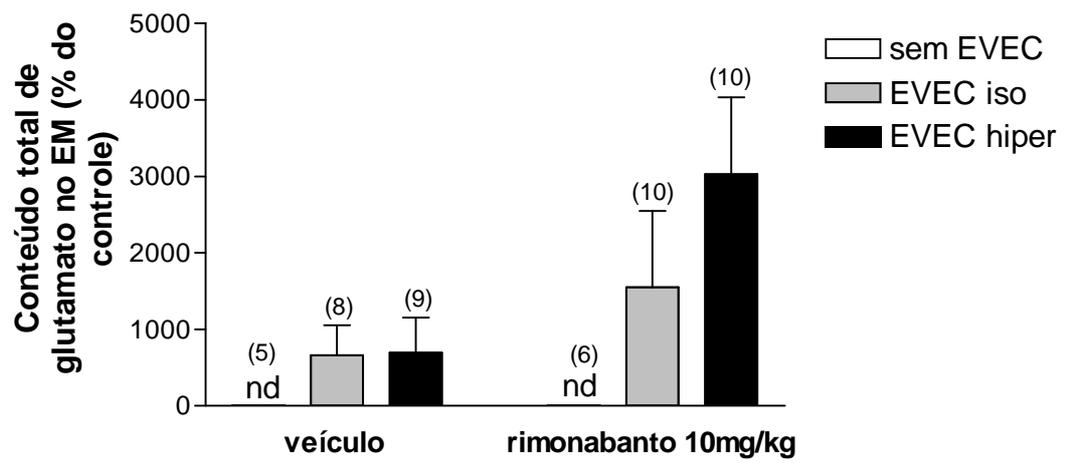
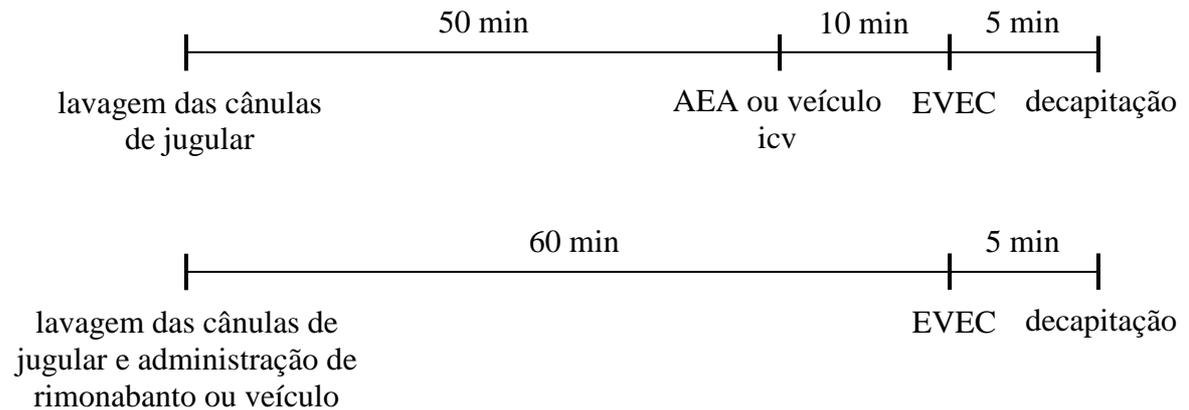


Figura 2B.3 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre o conteúdo total de glutamato na EM em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.nd: não detectável.

### 3 - CONTEÚDO HIPOTALÂMICO DE NITRATO

O desenho experimental utilizado neste protocolo para cada uma das drogas empregadas está representado nos esquemas abaixo:



Após a decapitação, os cérebros foram rapidamente removidos e mantidos em gelo. Os núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO) e a EM foram removidos por *punch* ou dissecação e processados para determinação do conteúdo hipotalâmico de nitrato, conforme descrito anteriormente. Os dados foram expressos em nmol ou  $\mu$ mol de nitrato por mg de proteína.

**3A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB<sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre o conteúdo hipotalâmico de nitrato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

**3A.1 - NPV**

A figura 3A.1, apresentada a seguir, representa o efeito da administração icv prévia de AEA sobre o conteúdo de nitrato no NPV de animais submetidos à EVEC. Como podemos observar, a EVEC isotônica não alterou a concentração de nitrato neste núcleo, porém foi encontrado um aumento no conteúdo de nitrato em animais submetidos à EVEC hipertônica ( $0.10 \pm 0.009$  vs  $0.19 \pm 0.03$ ,  $p < 0.05$ ). Além disso, podemos observar que o pré-tratamento com AEA não alterou significativamente esta resposta.

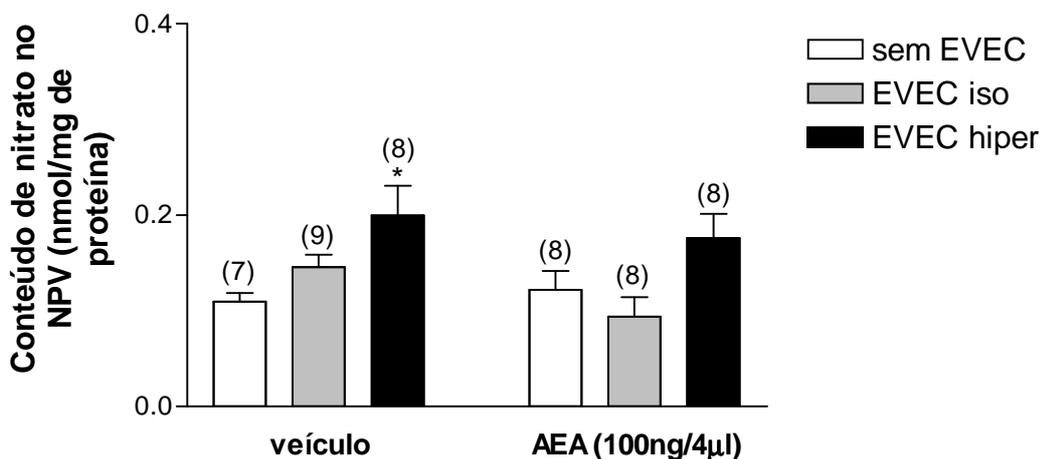


Figura 3A.1 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4μl) ou veículo sobre o conteúdo total de nitrato no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo sem EVEC.

### 3A.2 - NSO

Como pode ser observado na Figura 3A.2, apresentada a seguir, o conteúdo de nitrato no NSO foi aumentado em resposta à EVEC isotônica ( $1.04 \pm 0.17$  vs  $2.62 \pm 0.45$ ,  $p < 0.001$ ), porém não foi alterado pela EVEC hipertônica. O pré-tratamento com AEA bloqueou parte do efeito induzido pela EVEC isotônica ( $2.62 \pm 0.45$  vs  $1.41 \pm 0.12$ ,  $p < 0.001$ ), contudo, a resposta de aumento no conteúdo de nitrato foi mantida se compararmos os grupos AEA sem EVEC e AEA + EVEC isotônica ( $0.61 \pm 0.13$  vs  $1.41 \pm 0.12$ ,  $p < 0.05$ ).

Em animais pré-tratados com AEA, a EVEC hipertônica induziu um aumento no conteúdo de nitrato no NSO quando comparada ao grupo AEA sem EVEC ( $0.61 \pm 0.13$  vs  $2.33 \pm 0.21$ ,  $p < 0.001$ ). Inversamente à resposta observada para a EVEC isotônica, o pré-tratamento com AEA aumentou significativamente a concentração de nitrato no NSO de animais submetidos à EVEC hipertônica ( $1.10 \pm 0.09$  vs  $2.33 \pm 0.21$ ,  $p < 0.001$ ).

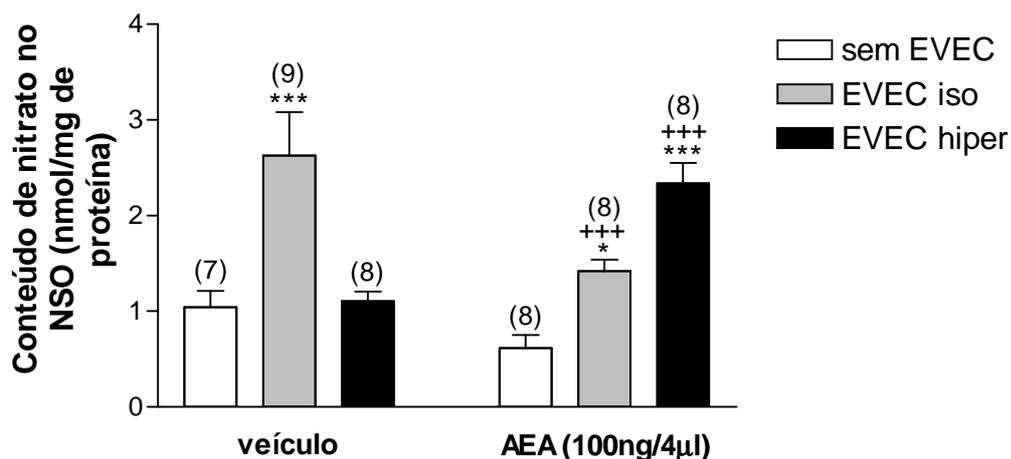


Figura 3A.2 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre o conteúdo total de nitrato no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  e \* $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. +++ $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo + EVEC correspondente.

### 3A.3 - EM

A Figura 3A.3 representa o efeito da administração central de AEA sobre o conteúdo de nitrato na EM de animais submetidos ou não à EVEC. Inicialmente, houve um aumento no conteúdo de nitrato na EM de animais injetados centralmente com veículo e submetidos à EVEC isotônica ( $0.40 \pm 0.06$  vs  $1.18 \pm 0.22$ ,  $p < 0.01$ ), porém nenhuma alteração foi obtida em resposta à EVEC hipertônica.

O pré-tratamento com AEA manteve a resposta obtida para a EVEC isotônica e potencializou significativamente o efeito observado para a EVEC hipertônica, seja comparado ao grupo AEA sem EVEC ( $0.40 \pm 0.06$  vs  $0.72 \pm 0.13$ ,  $p < 0.01$ ) ou ao grupo veículo + EVEC hiper ( $0.72 \pm 0.13$  vs  $1.27 \pm 0.09$ ,  $p < 0.01$ ).

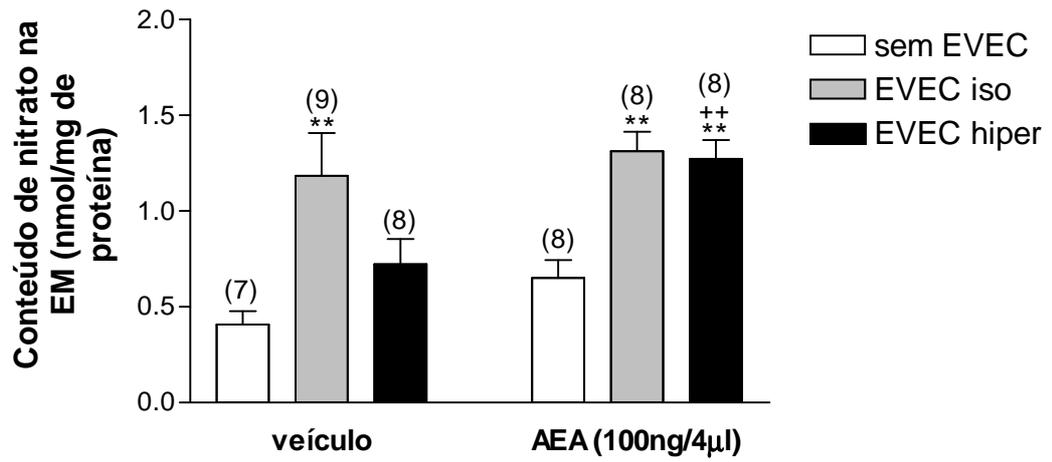


Figura 3A.3 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4μl) ou veículo sobre o conteúdo total de nitrato na EM em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM.

\*\*p<0.01 em relação ao grupo veículo ou AEA sem EVEC. +++p<0.001 em relação ao grupo veículo + EVEC hiper.

### 3B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB<sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre o conteúdo hipotalâmico de nitrato em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.

#### 3B.1 - NPV

A Figura 3B.1 representa os efeitos da administração de rimonabanto sobre o conteúdo de nitrato no NPV de animais submetidos à EVEC. Os resultados mostram que não houve alteração significativa entre os grupos, seja quando consideramos a variável EVEC ou o tratamento com o antagonista CB<sub>1</sub>.

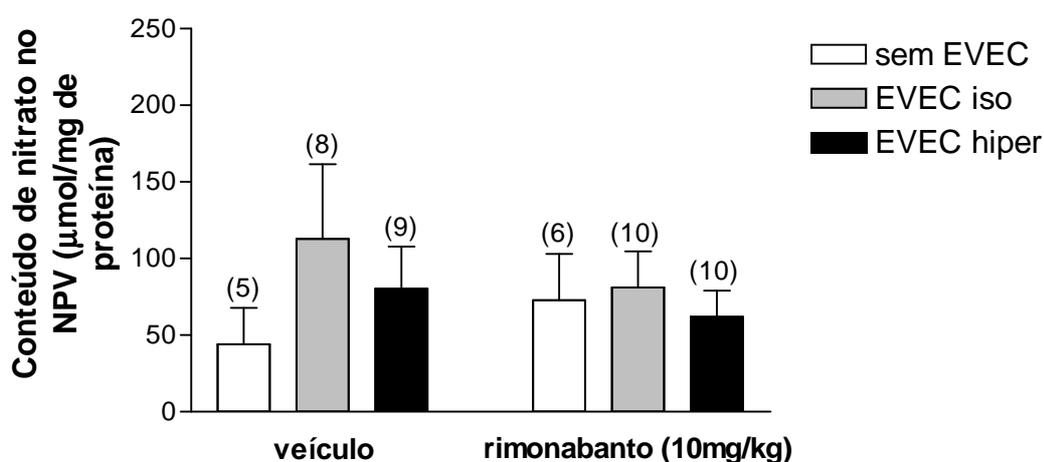


Figura 3B.1 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre o conteúdo total de nitrato no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.

#### 3B.2 - NSO

De acordo com a Figura 3B.2, que representa o efeito da administração de rimonabanto sobre a concentração de nitrato no NSO em resposta à EVEC,

podemos observar que, novamente, as variáveis EVEC e rimonabanto não produziram alteração significativa no conteúdo deste metabólito no núcleo hipotalâmico em questão.

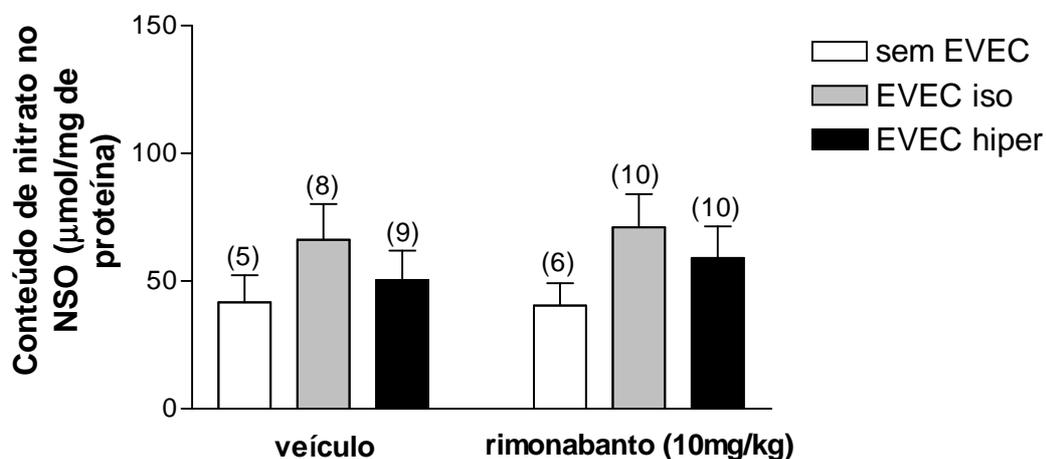


Figura 3B.2 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre o conteúdo total de nitrato no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.

### 3B.3 - EM

A Figura 3B.3 representa os efeitos da administração periférica de rimonabanto sobre o conteúdo de nitrato na EM em resposta à EVEC. A exemplo do observado para o NPV e NSO, os resultados mostram que não houve alteração significativa entre os grupos, seja em resposta à EVEC ou ao tratamento com o antagonista CB<sub>1</sub>.

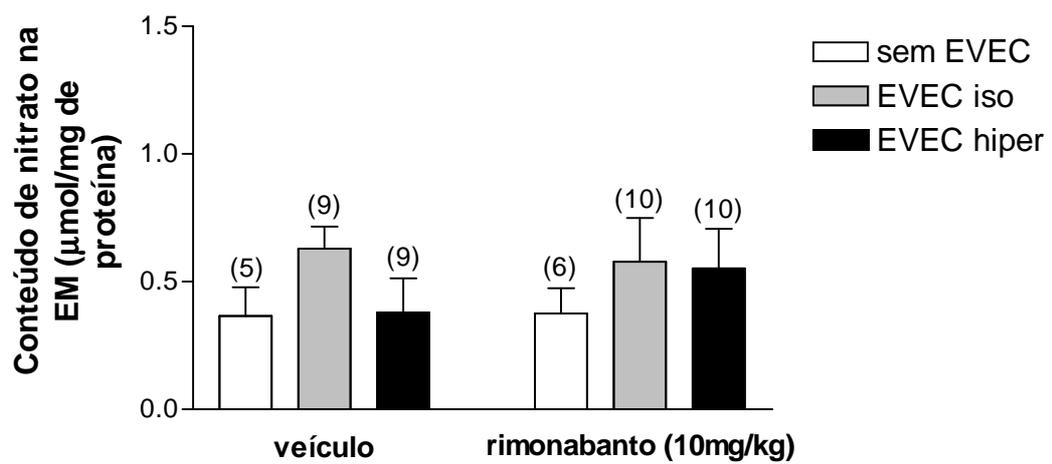
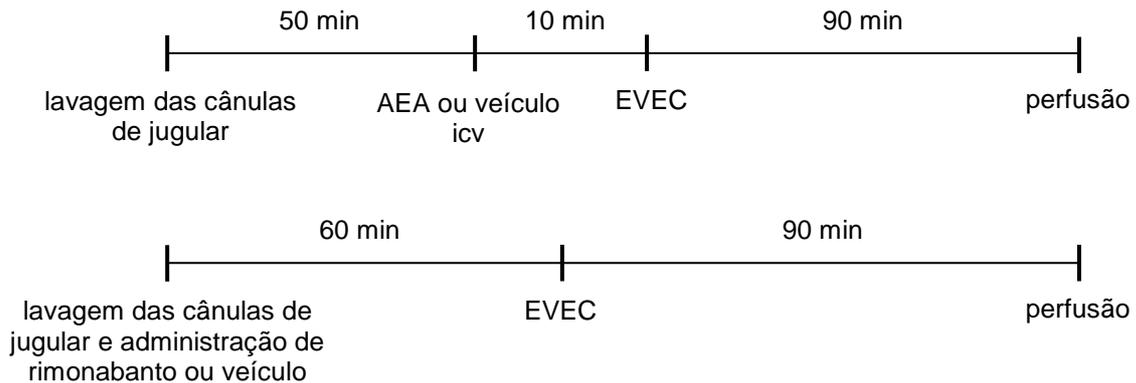


Figura 3B.3 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre o conteúdo total de nitrato na EM em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.

#### 4 - IMUNOISTOQUÍMICA

Para a realização deste protocolo experimental, os animais foram inicialmente submetidos aos procedimentos apresentados nos esquemas abaixo:



Noventa minutos após a EVEC, os animais foram anestesiados, perfundidos e processados para a avaliação da expressão da proteína c-Fos e sua eventual co-localização com os hormônios AVP e OT nas porções magnocelular e parvocelular do NPV e NSO, conforme descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos em número absoluto de duplas marcações e também em porcentagem (%) de ativação, ou seja, a porcentagem de células duplamente marcadas em relação ao número total de células positivas para o fenótipo correspondente.

**4A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB<sub>1</sub> (AEA, 100ng/4µl) sobre a expressão da proteína c-Fos no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

#### **4A.1 - Co-localização com AVP**

De acordo com a Tabela 1, que representa o efeito do pré-tratamento com AEA sobre o número absoluto e sobre a porcentagem de neurônios vasopressinérgicos marcados para c-Fos em animais submetidos à EVEC, o estímulo hipertônico, mas não a EVEC isotônica, induziu aumento na porcentagem de duplas marcações em todos os grupamentos magnocelulares avaliados (PaMM, PaLM e NSO). Além disso, a EVEC hipertônica promoveu um aumento significativo no número absoluto de neurônios duplamente marcados para c-Fos-AVP na região PaMP, sem, no entanto, induzir qualquer alteração no padrão de resposta da região PaPO.

Também pode ser observado que o pré-tratamento com AEA não alterou o número de neurônios vasopressinérgicos ativados em resposta à EVEC na maioria das regiões analisadas, com exceção da porção PaLM, onde a prévia administração do agonista CB<sub>1</sub> induziu uma pequena redução no número de células ativadas em resposta à EVEC hipertônica.

Os resultados numéricos sumarizados na Tabela 1 podem também ser visualizados nas Figuras 4A.1.1 a 4A.1.3, que mostram, respectivamente, fotomicrografias representativas das porções PaMM e PaLM do NPV e do NSO para cada grupo experimental.

**Tabela 1** - Número de duplas marcações para c-Fos+AVP e porcentagem de neurônios c-Fos+AVP nas porções PaMM, PaLM, PaPo and PaMP do NPV e no NSO de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos ou não à EVEC isotônica e hipertônica.

	Veículo			AEA		
	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper
<b><u>PaMM</u></b>						
c-Fos+AVP	1.00±0.40	0.50±0.28	7.00±2.48	2.40±1.20	2.66±2.07	9.16±2.28(c)
% c-Fos+AVP	2.60±1.22	1.15±0.67	18.24±5.56(b)	6.63±2.46	4.34±2.76	20.89±3.14(b)
<b><u>PaLM</u></b>						
c-Fos+AVP	0.25±0.25	0.50±0.50	9.00±3.19(b)	1.00±0.31	0.66±0.49	6.16±2.34
% c-Fos+AVP	0.25±0.25	1.72±1.72	18.37±3.26(a)	2.79±0.76	1.38±1.06	10.52±3.45(c,f)
<b><u>PaMP</u></b>						
c-Fos+AVP	0.25±0.25	0.75±0.75	5.00±1.51(c)	0.80±0.58	0.16±0.16	7.40±3.05
% c-Fos+AVP	0.25±0.25	2.08±2.08	19.36±3.99	3.44±2.76	0.34±0.34	23.67±9.57(b)
<b><u>PaPO</u></b>						
c-Fos+AVP	0.25±0.25	0.20±0.20	1.40±0.67	0.80±0.37	0.80±0.80	1.40±0.74
% c-Fos+AVP	0.25±0.25	0.25±0.25	6.22±2.52	4.10±1.95	3.63±3.63	6.07±2.88
<b><u>NSO</u></b>						
c-Fos+AVP	1.75±0.62	4.00±1.58	36.00±2.54(a)	8.40±5.27	5.83±2.46	34.00±7.11(a)
% c-Fos+AVP	2.32±0.83	7.03±2.78	47.51±0.32(a)	10.41±6.24	7.76±3.19	42.75±8.44(a)

Valores expressos em médias ± EPM (n = 4 a 6 ratos por grupo). PaMM, porção medial magnocelular do NPV; PaLM: porção lateral magnocelular do NPV; PaMP, porção medial parvocelular do NPV; PaPo, porção posterior parvocelular do NPV; (a) p<0.001, (b) p<0.01 e (c) p<0.05 versus veículo ou rimonabanto sem EVEC. (f) p<0.05 versus o grupo veículo + EVEC hipertônica.

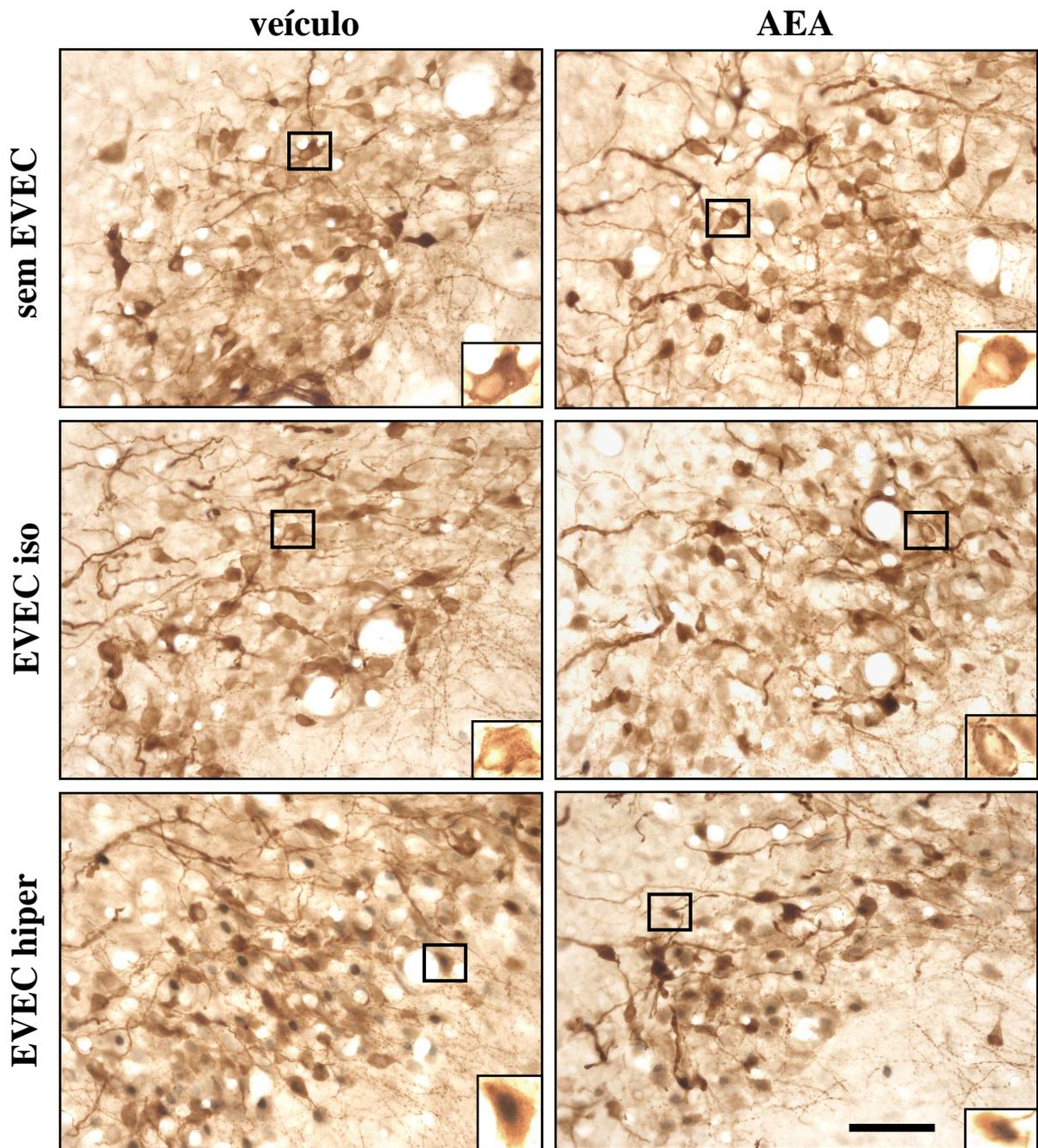


Figura 4A.1.1 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+AVP na porção PaMM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para AVP co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

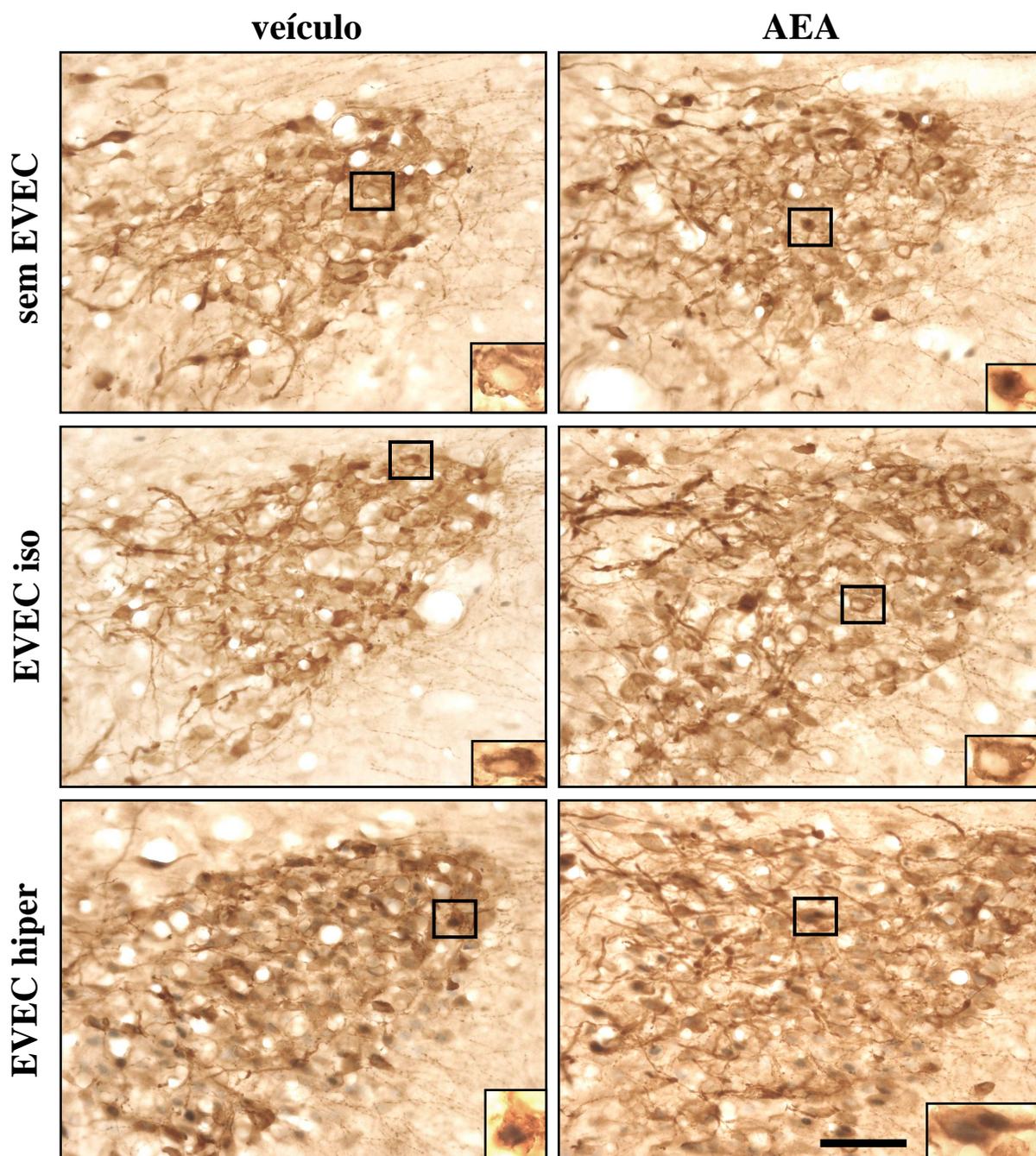


Figura 4A.1.2 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+AVP na porção PaLM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para AVP co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

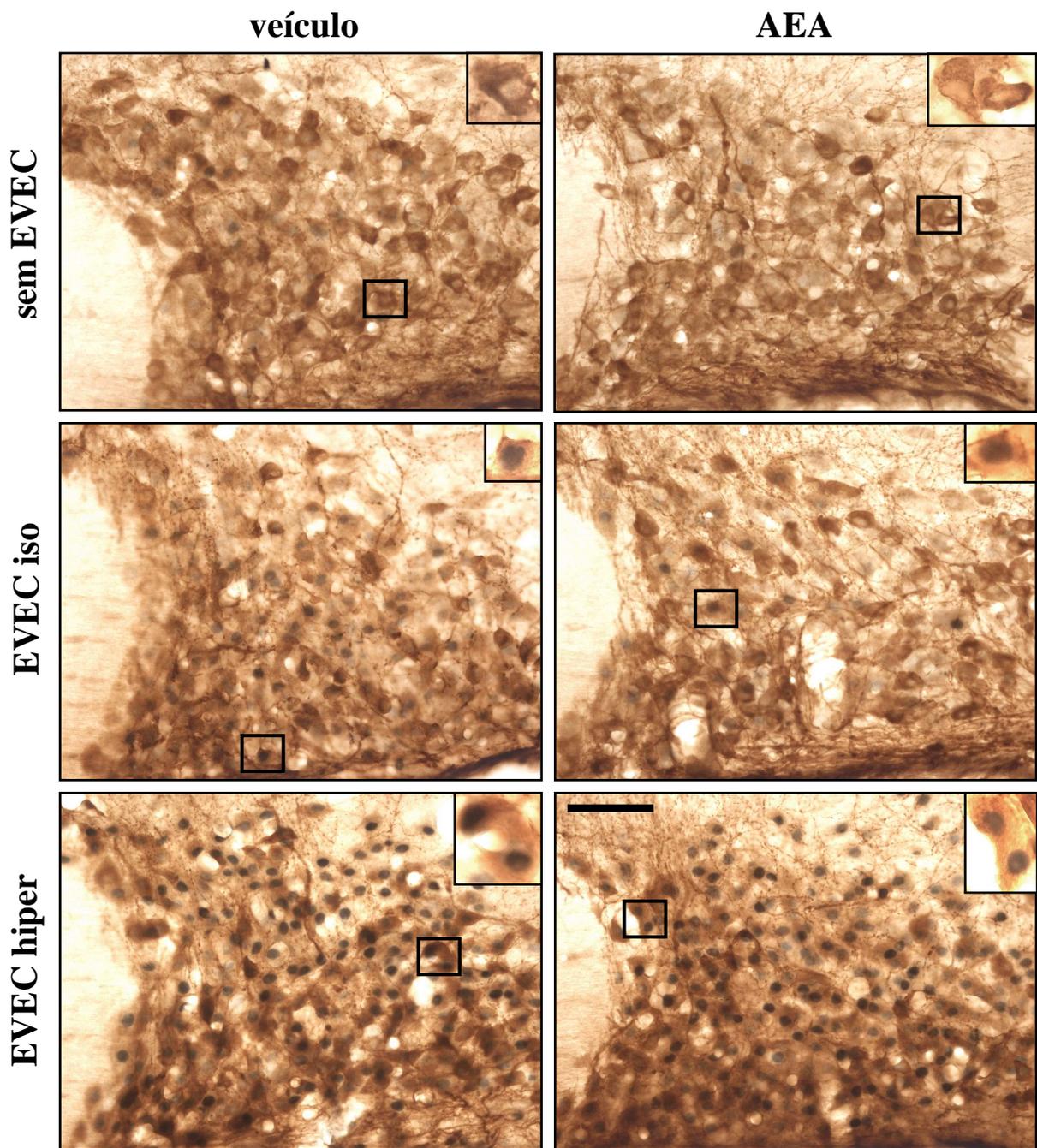


Figura 4A.1.3 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+AVP no NSO de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto superior direito, a marcação citoplasmática para AVP co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100 $\mu$ m.

## **4A.2 - Co-localização com OT**

A Tabela 2 sumariza os efeitos da administração prévia de AEA sobre o número absoluto e porcentagem de neurônios duplamente marcados para c-Fos-OT no NPV e NSO. Como pode ser observado, a EVEC hipertônica induziu aumento na porcentagem de duplas marcações em todas as populações de neurônios magnocelulares avaliadas, porém estes valores somente atingiram relevância estatística para o NSO. Considerando-se a resposta de ativação neuronal das porções parvocelulares, a EVEC não induziu efeito significativo, seja frente ao estímulo isotônico ou ao estímulo hipertônico.

Nos animais pré-tratados com AEA, o padrão de resposta neuronal ocitocinérgica foi mantido, ou seja, a administração de AEA não alterou o número absoluto ou a porcentagem de neurônios positivos para c-Fos-OT no NPV e NSO de animais submetidos à EVEC.

Os resultados apresentados na Tabela 2 estão representados nas Figuras 4A.2.1 a 4A.2.3, que mostram, respectivamente, fotomicrografias obtidas das porções PaMM e PaLM do NPV e do NSO de cada grupo experimental.

**Tabela 2** - Número de duplas marcações para c-Fos+OT e porcentagem de neurônios c-Fos+OT nas porções PaMM, PaLM, PaPo and PaMP do NPV e no NSO de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos ou não à EVEC isotônica e hipertônica.

	Veículo			AEA		
	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper
<b><u>PaMM</u></b>						
c-Fos+OT	2.00±0.81	4.00±1.84	13.60±2.89	4.00±2.14	2.57±0.99	11.83±4.74(c)
% c-Fos+OT	3.43±1.34	6.80±3.44	17.83±5.41	5.71±3.38	3.51±1.29	15.72±4.67
<b><u>PaLM</u></b>						
c-Fos+OT	1.50±0.28	3.16±0.98	5.66±2.64	1.60±0.74	1.50±0.56	7.28±3.21
% c-Fos+OT	3.58±0.94	7.60±2.01	20.09±10.17	3.43±1.83	3.50±1.31	18.66±7.63
<b><u>PaMP</u></b>						
c-Fos+OT	1.50±0.50	1.83±1.04	5.50±1.23	1.20±0.58	1.33±0.33	8.57±2.34(b)
% c-Fos+OT	6.09±2.16	7.83±4.69	20.22±2.73	2.99±1.32	3.61±0.95	26.09±4.48(b)
<b><u>PaPO</u></b>						
c-Fos+OT	2.75±0.62	1.83±0.74	1.16±0.30	0.80±0.37	1.28±0.28	2.00±0.75
% c-Fos+OT	6.89±1.60	4.02±1.68	3.18±0.84	2.07±0.90	3.32±0.77	4.44±1.53
<b><u>NSO</u></b>						
c-Fos+OT	3.50±0.86	7.33±1.76	52.00±3.04(a)	5.60±2.33	4.00±1.96	54.71±4.36(a)
% c-Fos+OT	6.82±1.67	11.18±2.79	67.10±4.03(a)	7.74±3.37	5.35±2.54	62.30±4.81

Valores expressos em médias ± EPM (n = 4 a 6 ratos por grupo). PaMM, porção medial magnocelular do NPV; PaLM: porção lateral magnocelular do NPV; PaMP, porção medial parvocelular do NPV; PaPo, porção posterior parvocelular do NPV; (a) p<0.001, (b) p<0.01 e (c) p<0.05 versus veículo ou rimonabanto sem EVEC.

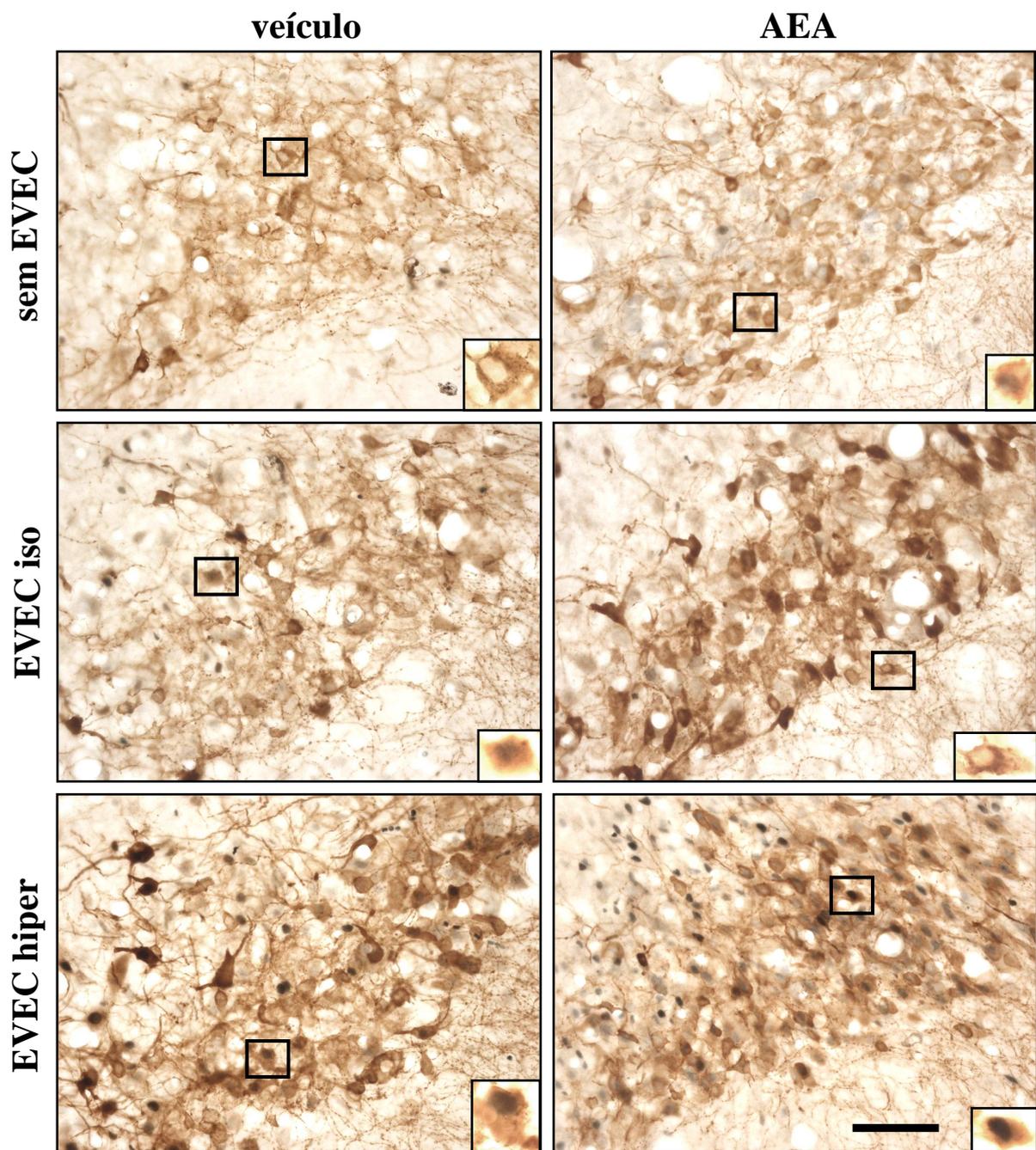


Figura 4A.2.1 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+OT na porção PaMM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para OT co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

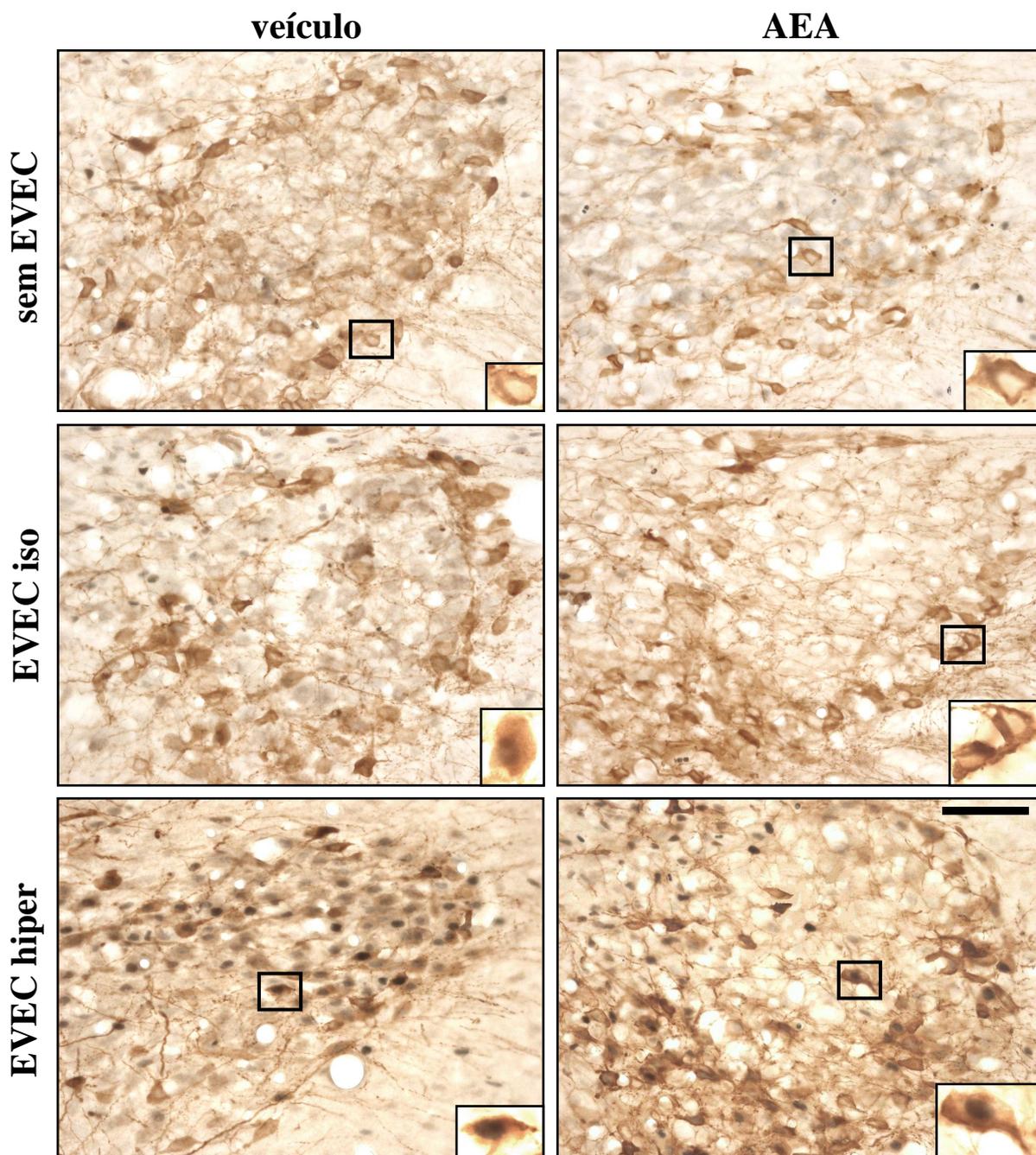


Figura 4A.2.2 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+OT na porção PaLM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para OT co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

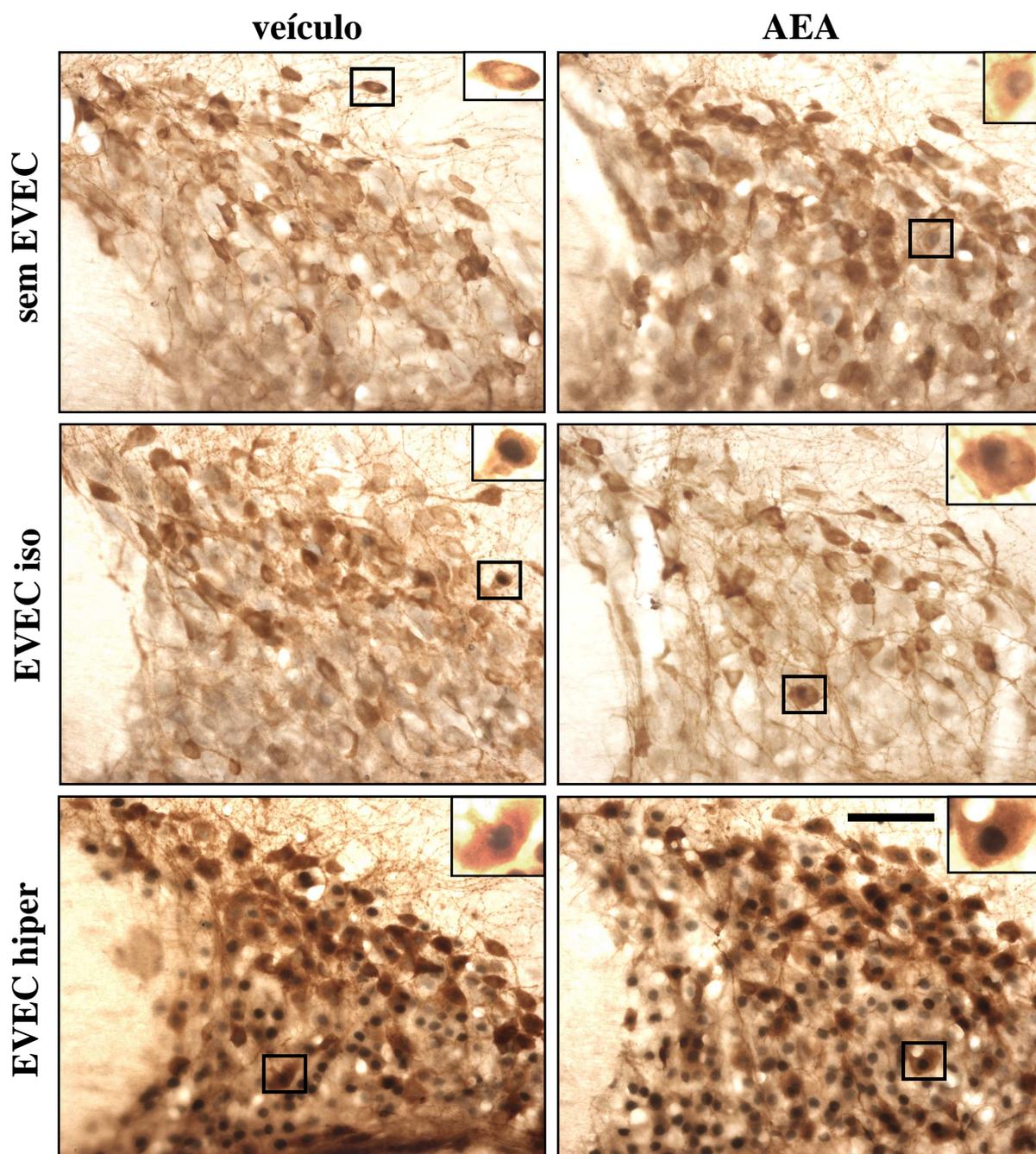


Figura 4A.2.3 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+OT no NSO de animais pré-tratados com veículo ou AEA e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto superior direito, a marcação citoplasmática para OT co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

**4B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB<sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre a expressão da proteína c-Fos no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

#### **4B.1 - Co-localização com AVP**

Como pode ser observado na Tabela 3, apresentada a seguir, a EVEC hipertônica, mas não a EVEC isotônica, induziu aumento na porcentagem de neurônios vasopressinérgicos ativados em todas as populações de neurônios magnocelulares avaliadas (PaMM, PaLM e NSO). Não houve alteração significativa no número de duplas marcações para c-Fos-AVP em nenhuma das porções parvocelulares analisadas.

Por outro lado, o pré-tratamento com rimonabanto potencializou significativamente o número de neurônios vasopressinérgicos ativados em resposta à EVEC hipertônica nas porções PaMM e PaLM, porém não no SON. Além disso, a administração do antagonista CB<sub>1</sub> aumentou o número de neurônios duplamente marcados para c-Fos-AVP na porção PaMP.

Os dados numéricos apresentados na Tabela 3 estão visualmente representados nas Figuras 4B.1.1 a 4B.1.3, que mostram fotomicrografias obtidas das porções PaMM e PaLM do NPV e do NSO de cada grupo experimental, respectivamente.

**Tabela 3** - Número de duplas marcações para c-Fos+AVP e porcentagem de neurônios c-Fos+AVP nas porções PaMM, PaLM, PaPo and PaMP do NPV e no NSO de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos ou não à EVEC isotônica e hipertônica.

	Veículo			rimonabanto		
	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper
<b><u>PaMM</u></b>						
c-Fos+AVP	0.50±0.50	3.50±2.06	11.80±2.51	1.33±0.88	3.83±1.19	18.80±3.96(b,f)
% c-Fos+AVP	1.32±1.31	6.59±3.93	20.34±3.39(c)	8.93±6.81	7.38±1.83	34.37±6.21(a,f)
<b><u>PaLM</u></b>						
c-Fos+AVP	0.75±0.47	0.50±0.22	7.20±1.46	4.25±1.03	2.66±0.76	20.20±3.95(a,d)
% c-Fos+AVP	1.73±1.27	1.24±0.58	14.93±3.16(a)	9.04±2.37	6.20±1.44	31.48±4.50(a,d)
<b><u>PaMP</u></b>						
c-Fos+AVP	1.25±0.62	1.33±0.42	4.80±1.88	1.00±0.57	3.50±0.99	8.16±1.24(a,f)
% c-Fos+AVP	11.85±5.05	7.97±3.13	17.97±6.23	11.80±6.83	14.59±4.84	36.29±4.20(b,f)
<b><u>PaPO</u></b>						
c-Fos+AVP	1.25±0.75	1.33±0.61	1.40±0.24	1.50±0.64	2.16±0.79	1.83±0.40
% c-Fos+AVP	5.12±3.09	7.00±3.26	9.20±2.39	5.33±2.52	10.31±2.96	8.40±2.30
<b><u>NSO</u></b>						
c-Fos+AVP	2.00±1.08	2.50±1.23	51.00±4.65(a)	6.25±1.65	5.50±2.20	47.66±12.28(a)
% c-Fos+AVP	3.94±2.13	3.87±1.57	60.93±6.39(a)	12.45±3.52	7.64±2.54	57.16±9.95(a)

Valores expressos em médias ± EPM (n = 4 a 6 ratos por grupo). PaMM, porção medial magnocelular do NPV; PaLM: porção lateral magnocelular do NPV; PaMP, porção medial parvocelular do NPV; PaPo, porção posterior parvocelular do NPV; (a) p<0.001, (b) p<0.01 e (c) p<0.05 versus veículo ou rimonabanto sem EVEC. (d) p<0.001, (e) p<0.01 e (f) p<0.05 versus o grupo veículo + EVEC correspondente.

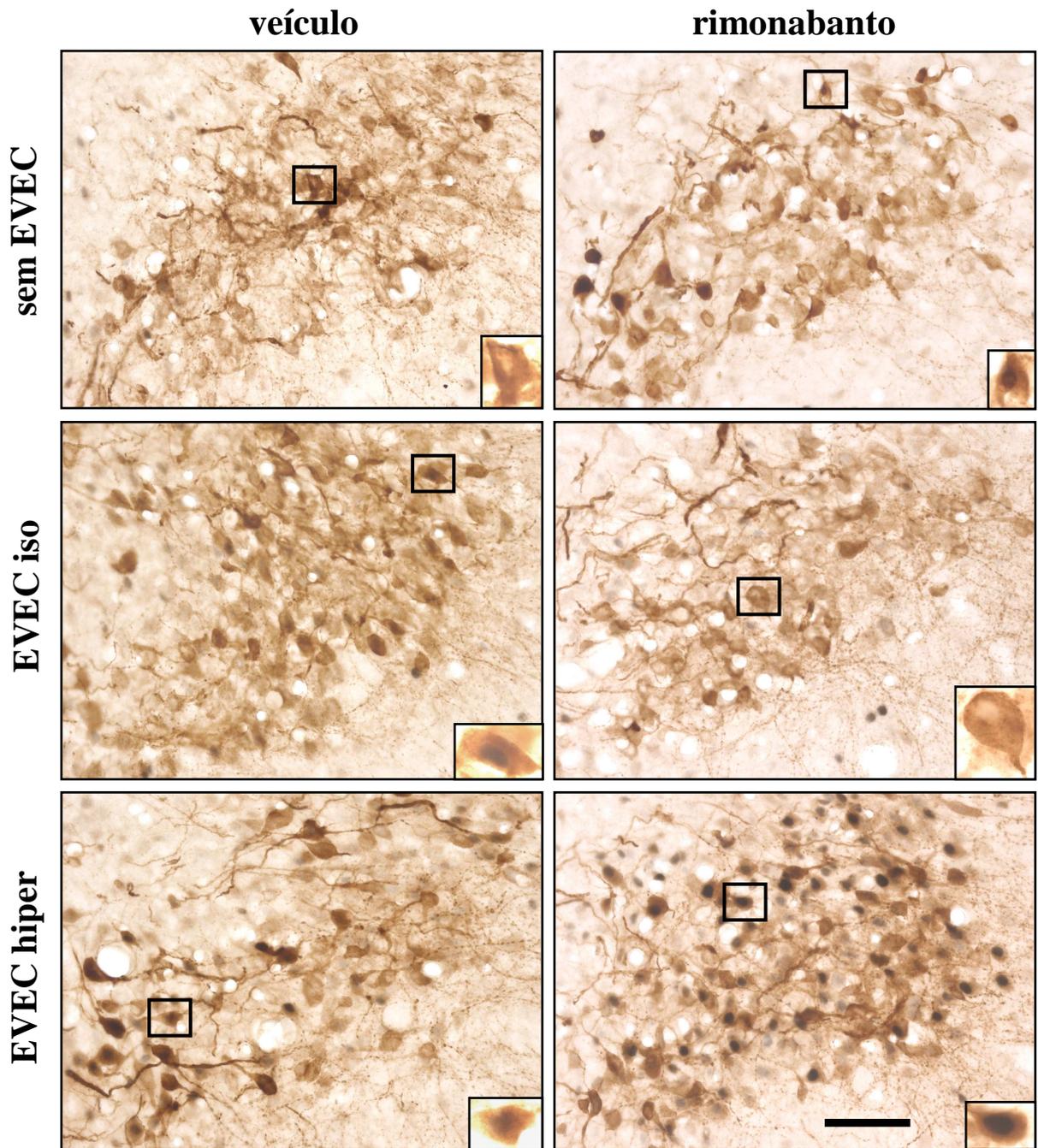


Figura 4B.1.1 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+AVP na porção PaMM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior esquerdo, a marcação citoplasmática para AVP co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

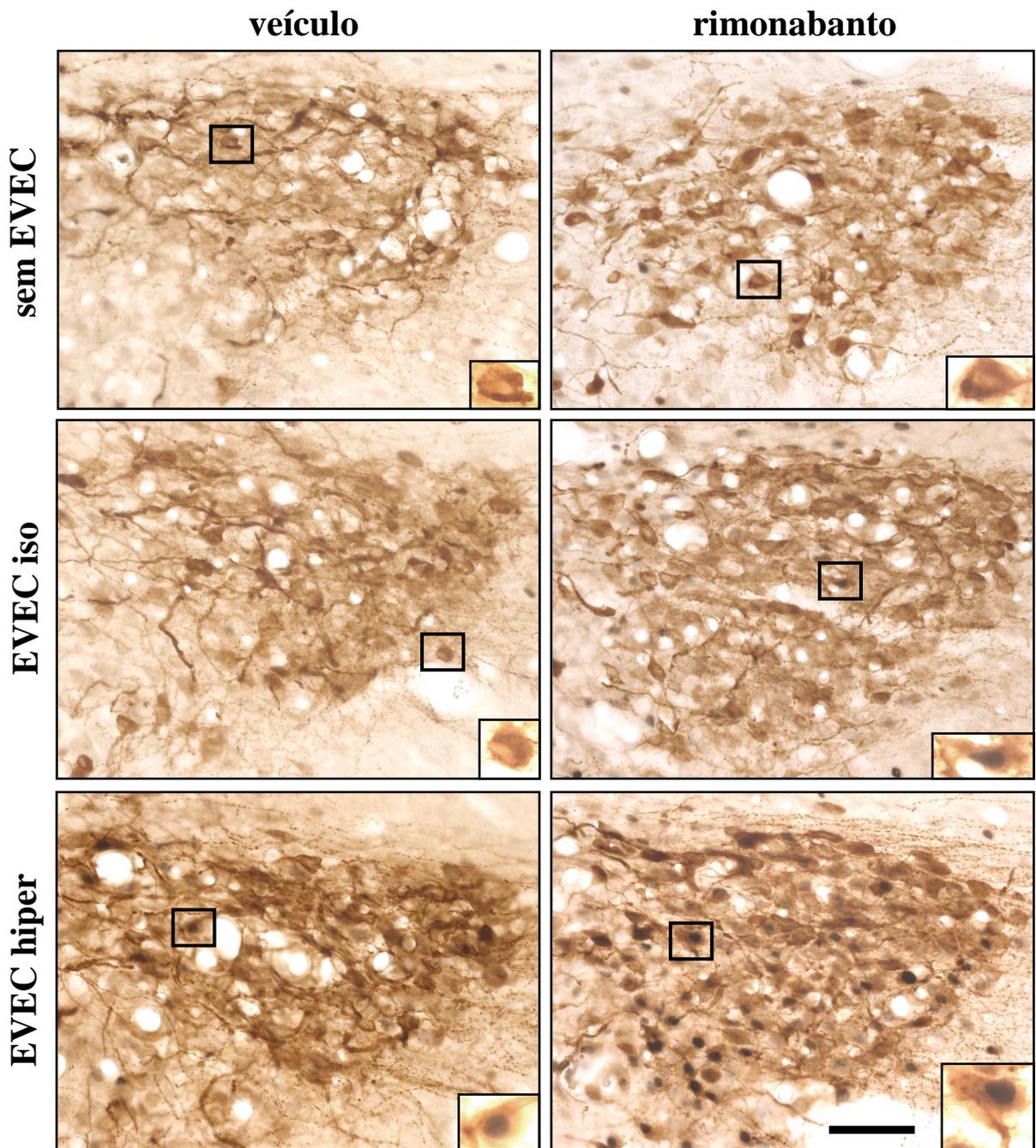


Figura 4B.1.2 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+AVP na porção PaLM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para AVP co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

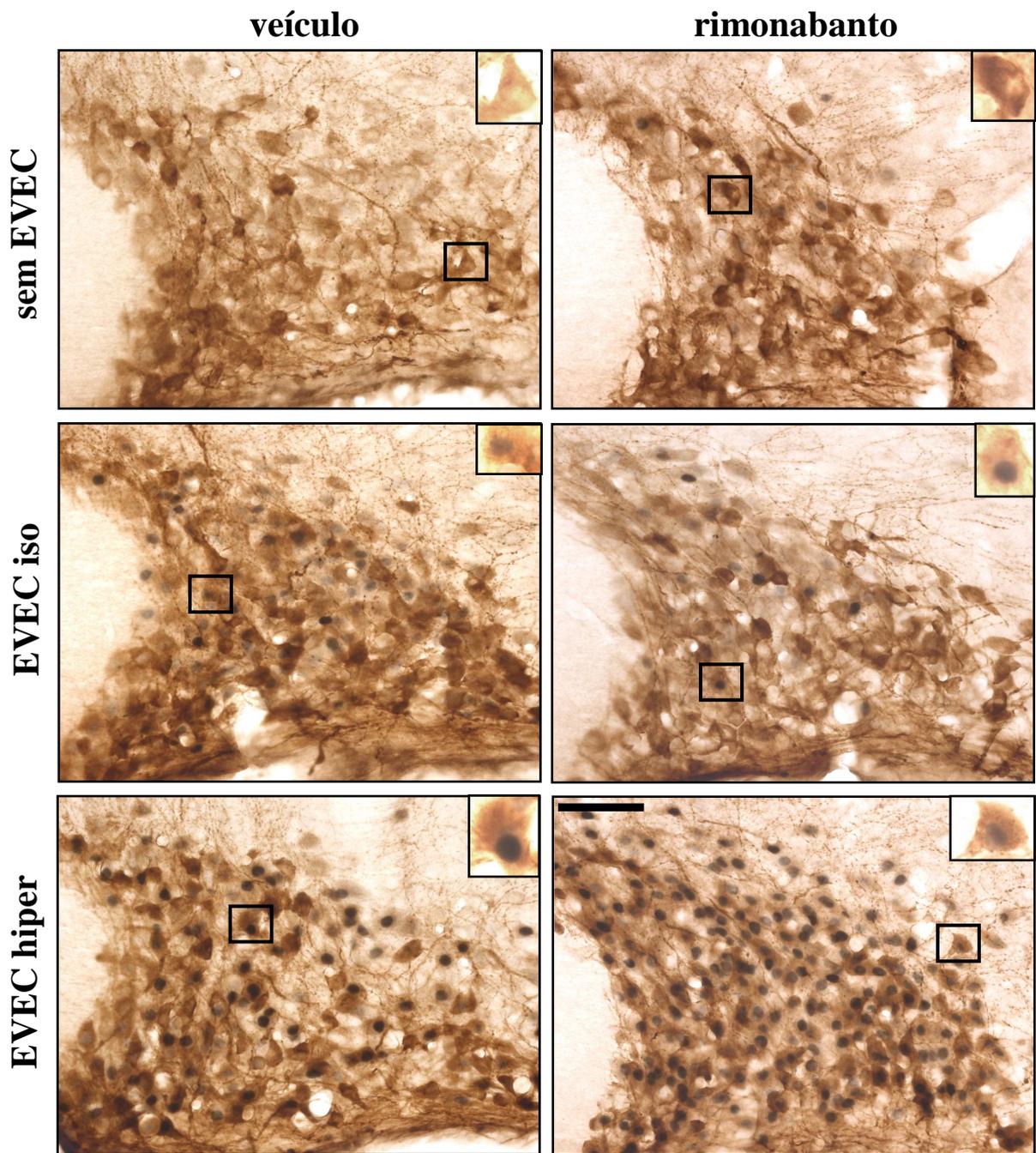


Figura 4B.1.3 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+AVP no NSO de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto superior direito, a marcação citoplasmática para AVP co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

## **4B.2 - Co-localização com OT**

A Tabela 4 representa os efeitos da administração prévia de rimonabanto sobre o número absoluto e porcentagem de neurônios duplamente marcados para c-Fos-OT no NPV e NSO. De acordo com os resultados, a EVEC isotônica induziu aumento significativo na porcentagem de duplas marcações apenas no NSO, enquanto que a EVEC hipertônica aumentou estes valores em todas as populações de neurônios magnocelulares avaliadas (PaMM, PaLM e NSO). Não houve alteração significativa no número de duplas marcações para c-Fos-OT em nenhuma das porções parvocelulares analisadas.

Também pode ser observado que o pré-tratamento com rimonabanto potencializou significativamente o número de neurônios ocitocinérgicos ativados em resposta à EVEC hipertônica em todas as regiões do PVN avaliadas, incluindo nas duas porções parvocelulares (PaMP e PaPO). Esta resposta induzida pelo rimonabanto em animais submetidos à EVEC hipertônica também foi observada no NSO.

Os resultados sumarizados na Tabela 4 estão visualmente representados nas Figuras 4B.2.1 a 4B.2.3, que mostram, respectivamente, fotomicrografias das porções PaMM e PaLM do NPV e do NSO de cada grupo experimental.

**Tabela 4** - Número de duplas marcações para c-Fos+OT e porcentagem de neurônios c-Fos+OT nas porções PaMM, PaLM, PaPo and PaMP do NPV e no NSO de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos ou não à EVEC isotônica e hipertônica.

	Veículo			Rimonabanto		
	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper	Sem EVEC	EVEC iso	EVEC hiper
<b><u>PaMM</u></b>						
c-Fos+OT	0.75±0.25	7.50±1.04	12.00±2.50(a)	2.00±1.26	10.60±5.04(c)	29.00±2.84(a,d)
% c-Fos+OT	1.17±0.39	13.31±3.28	17.21±3.80	2.45±1.40	14.73±6.64	41.25±7.56(a,d)
<b><u>PaLM</u></b>						
c-Fos+OT	0.50±0.28	4.00±1.47	8.60±1.91(c)	2.40±1.20	3.80±1.42	28.20±2.65(a,d)
% c-Fos+OT	1.73±1.02	11.08±4.32	18.52±1.63(c)	7.46±4.30	9.25±3.42	59.06±7.72(a,d)
<b><u>PaMP</u></b>						
c-Fos+OT	1.00±0.40	3.25±0.94	5.80±2.41	2.00±1.14	5.60±3.04	13.50±3.75(c,e)
% c-Fos+OT	2.81±1.15	12.33±3.14	16.16±6.87	5.52±2.94	13.63±6.66	33.33±4.02(a,f)
<b><u>PaPO</u></b>						
c-Fos+OT	1.25±0.47	2.25±0.47	5.00±1.48	1.40±0.74	4.80±1.28	9.75±2.13(a,f)
% c-Fos+OT	2.95±1.12	5.47±0.96	9.59±2.68	3.77±1.98	12.04±3.51(c)	18.04±3.33(a,f)
<b><u>NSO</u></b>						
c-Fos+OT	2.25±0.75	21.50±7.45	47.80±12.00(a)	3.00±1.14	14.00±4.51	91.00±7.66(a,d)
% c-Fos+OT	4.48±1.37	32.08±8.18(b)	58.85±7.71(a)	5.95±2.38	24.75±7.15(c)	83.97±4.41(a,e)

Valores expressos em médias ± EPM (n = 4 a 6 ratos por grupo). PaMM, porção medial magnocelular do NPV; PaLM: porção lateral magnocelular do NPV; PaMP, porção medial parvocelular do NPV; PaPo, porção posterior parvocelular do NPV; (a) p<0.001, (b) p<0.01 e (c) p<0.05 versus veículo ou rimonabanto sem EVEC. (d) p<0.001, (e) p<0.01 e (f) p<0.05 versus o grupo veículo + EVEC correspondente.

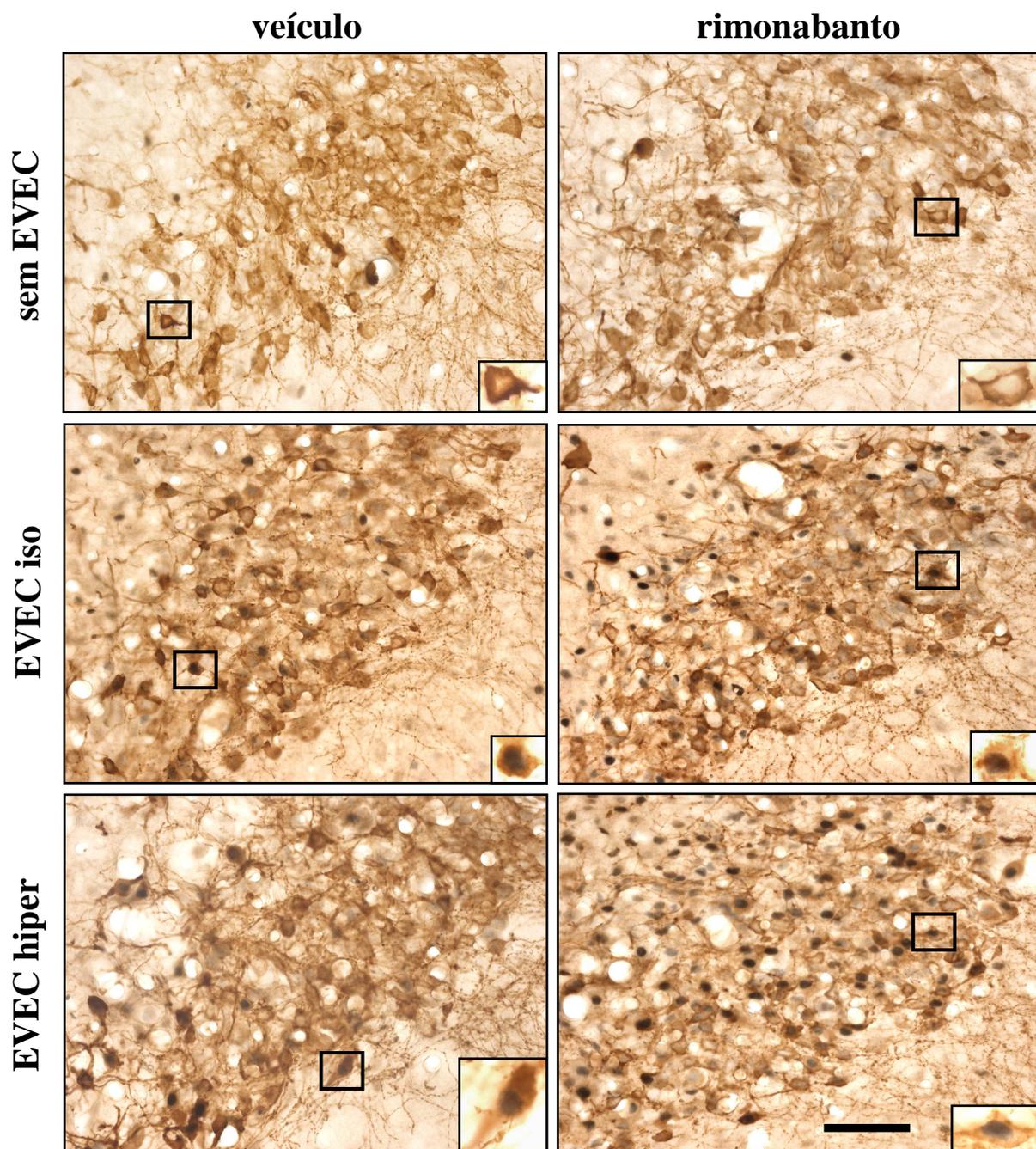


Figura 4B.2.1 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+OT na porção PaMM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para OT co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

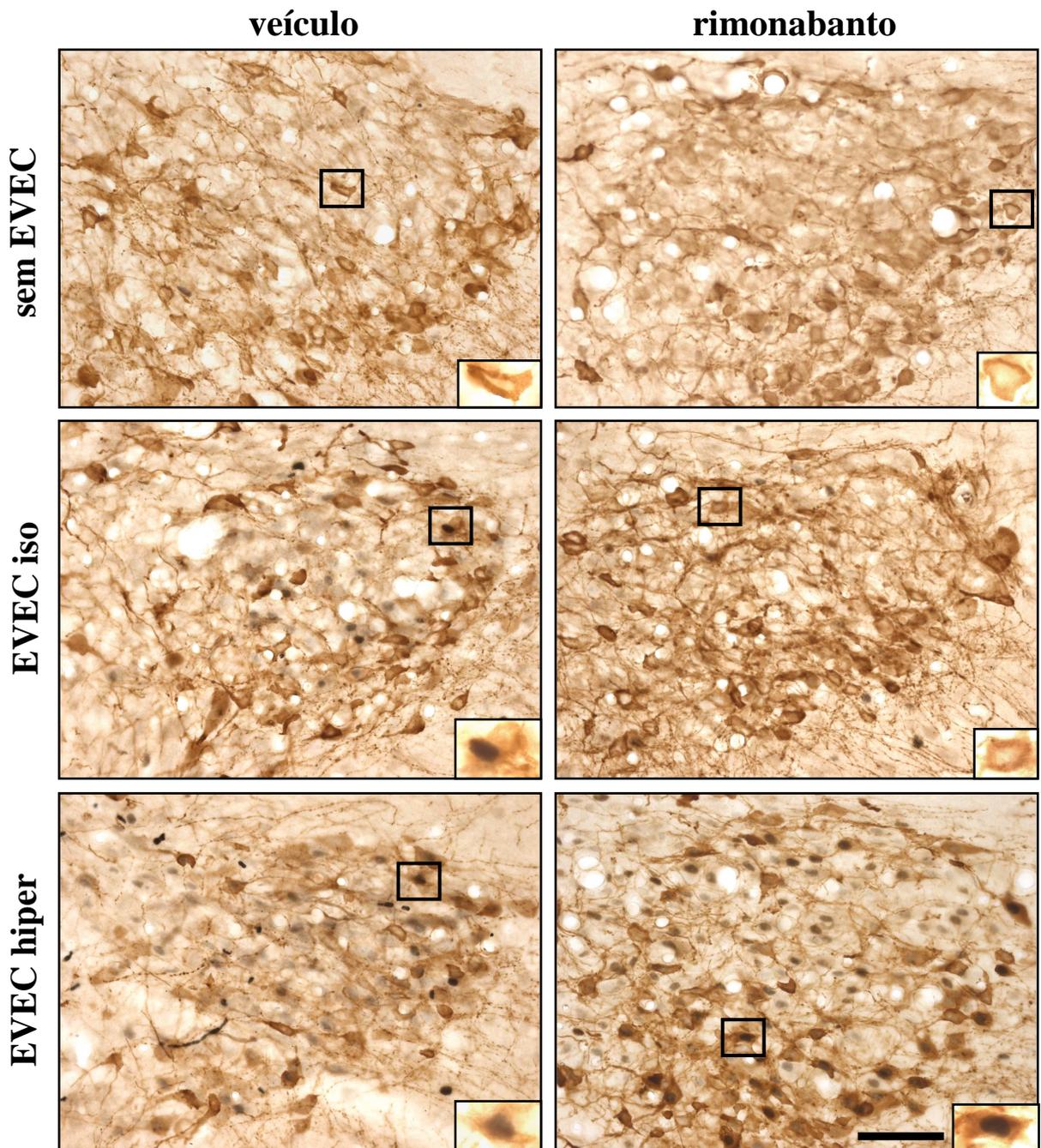


Figura 4B.2.2 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+OT na porção PaLM do NPV de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto inferior direito, a marcação citoplasmática para OT co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

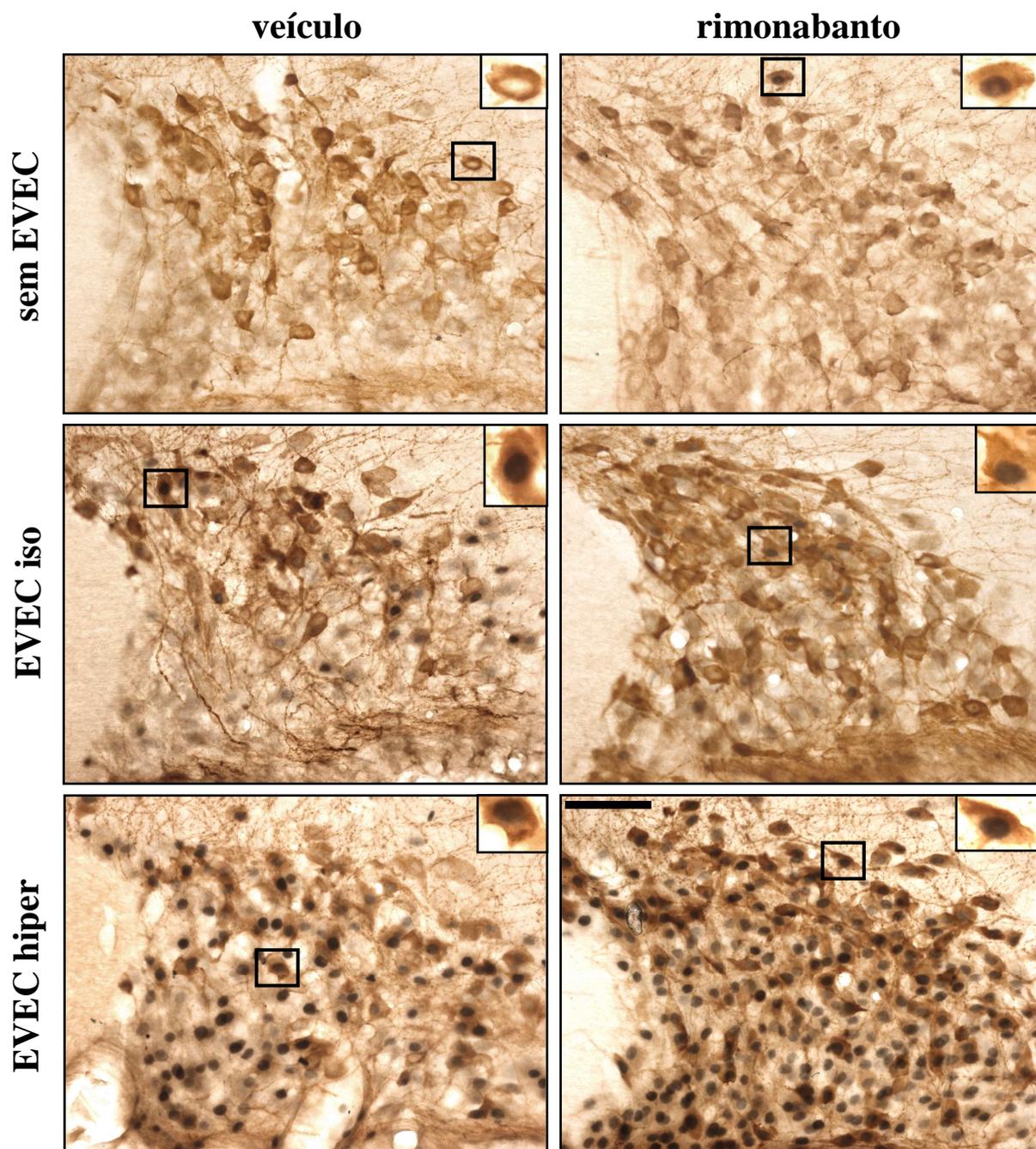
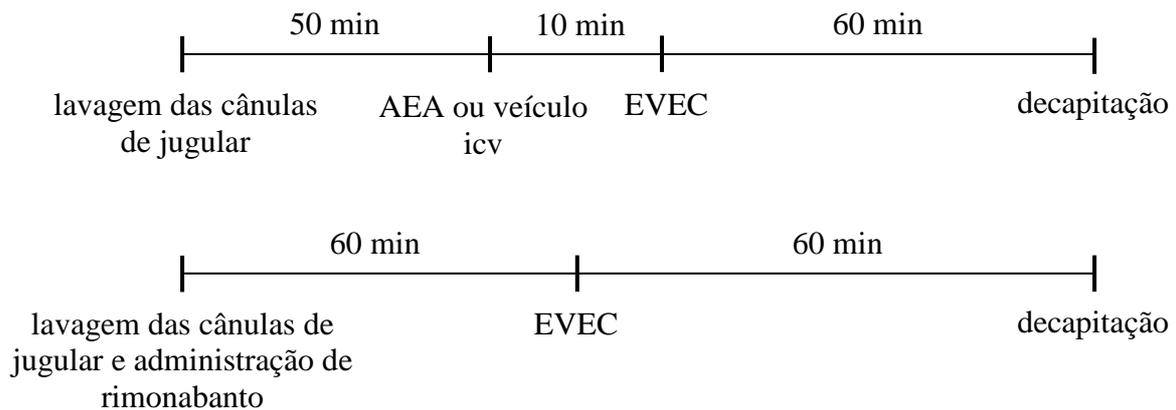


Figura 4B.2.3 - Fotomicrografias representativas de secções coronais do cérebro de rato mostrando a dupla imunorreatividade para c-Fos+OT no NSO de animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto e submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica. Em detalhe no canto superior direito, a marcação citoplasmática para OT co-localizada ou não com a marcação nuclear para c-Fos. Escala: 100µm.

## 5 – REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL

Abaixo encontram-se esquematizadas as linhas temporais de procedimentos realizados para as dois diferentes tratamentos utilizados neste protocolo experimental.



Sessenta minutos a partir da indução da EVEC, os animais foram decapitados e os cérebros foram removidos em condições *RNase free*. Amostras do NPV e NSO foram obtidas e submetidas à análise semi-quantitativa de expressão gênica por meio de reação da transcriptase reversa em tempo real, conforme descrito anteriormente. Os valores são apresentados em expressão relativa dos genes de interesse, que corresponde à expressão do gene-alvo normalizada pela expressão dos genes endógenos e pelo controle absoluto do experimento (grupo veículo sem EVEC correspondente).

**5A - Efeitos da administração icv prévia de um agonista CB<sub>1</sub> (AEA, 100ng/4μl) sobre a expressão de RNAm no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

### **5A.1 - AVP**

A Figura 5A.1.1 representa a expressão relativa do RNAm de AVP no NPV de animais pré-tratados com AEA ou veículo e submetidos ou não à EVEC. Como pode ser observado, nos animais que receberam veículo, a EVEC isotônica não alterou a expressão de RNAm de AVP neste núcleo. Por outro lado, a EVEC hipertônica induziu um aumento nesta variável, porém os dados não atingiram relevância estatística quando comparados aos obtidos para o grupo veículo sem EVEC. Os resultados também mostram que o pré-tratamento com AEA não alterou o padrão de expressão de RNAm para AVP obtido no NPV em resposta à EVEC.

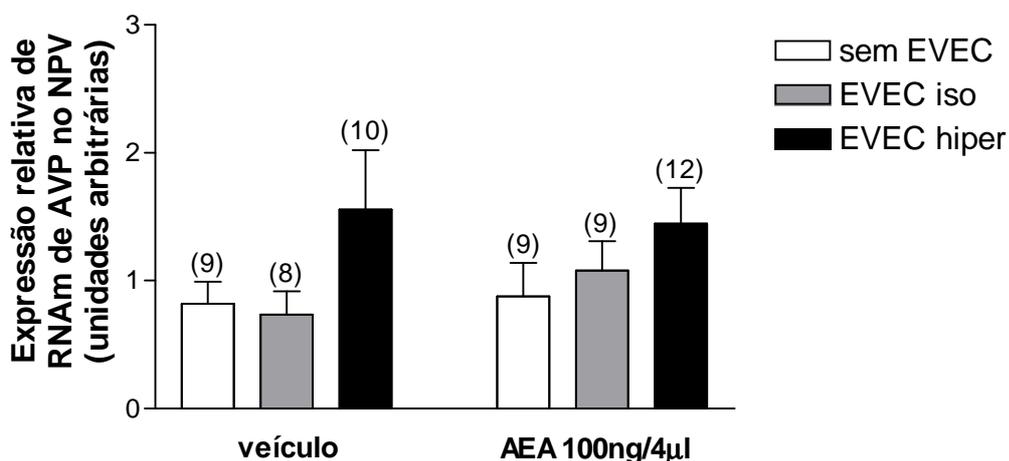


Figura 5A.1.1 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4μl) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para AVP no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias ± EPM.

A expressão relativa do RNAm de AVP no NSO induzida pela EVEC em animais submetidos previamente à injeção icv de AEA ou veículo está representada na Figura 5A.1.2. A exemplo do encontrado para o NPV, a EVEC hipertônica, porém não a isotônica, induziu aumento no conteúdo do RNAm para AVP, que foi significativo quando comparado ao grupo veículo sem EVEC ( $1.02 \pm 0.08$  vs  $1.86 \pm 0.45$ ,  $p < 0.05$ ). A prévia administração central do agonista canabinóide não alterou o padrão de resposta induzido pela EVEC.

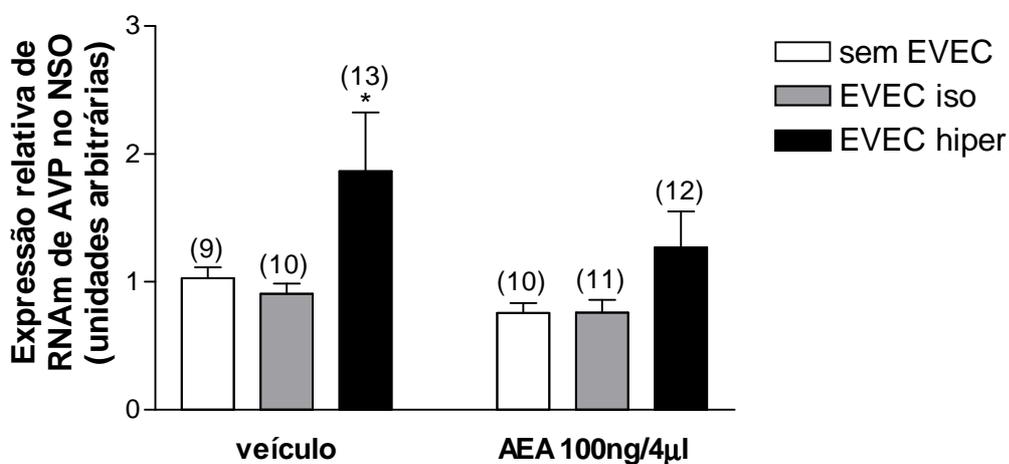


Figura 5A.1.2 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4μl) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para AVP no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo sem EVEC.

## 5A.2 - OT

A expressão relativa do RNAm de OT induzida pela EVEC no NPV de animais que receberam injeção central de AEA ou veículo está representada na Figura 5A.2.1. Considerando inicialmente os animais que receberam veículo, ambos os tipos de EVEC induziram aumento no conteúdo de RNAm para OT, porém os dados não atingiram relevância estatística quando comparados aos obtidos para o grupo veículo sem EVEC. O pré-tratamento com AEA não alterou significativamente o padrão de resposta induzido pela EVEC.

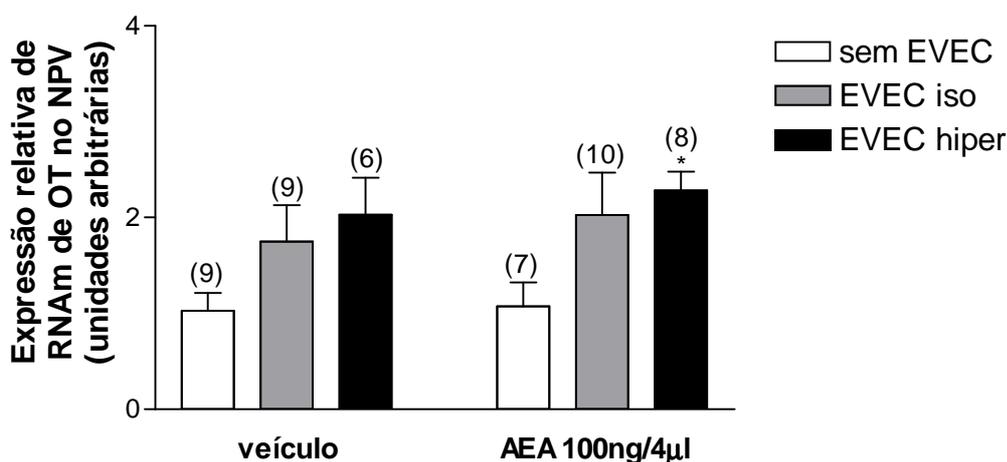


Figura 5A.2.1 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para OT no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo AEA sem EVEC.

De acordo com o que pode ser observado na Figura 5A.2.2, no NSO, a EVEC não alterou significativamente o conteúdo do RNAm para OT, embora os resultados apontem para um aumento no grupo veículo+EVEC hipertônica. A prévia administração central do agonista canabinóide não alterou o padrão de resposta induzido pela EVEC.

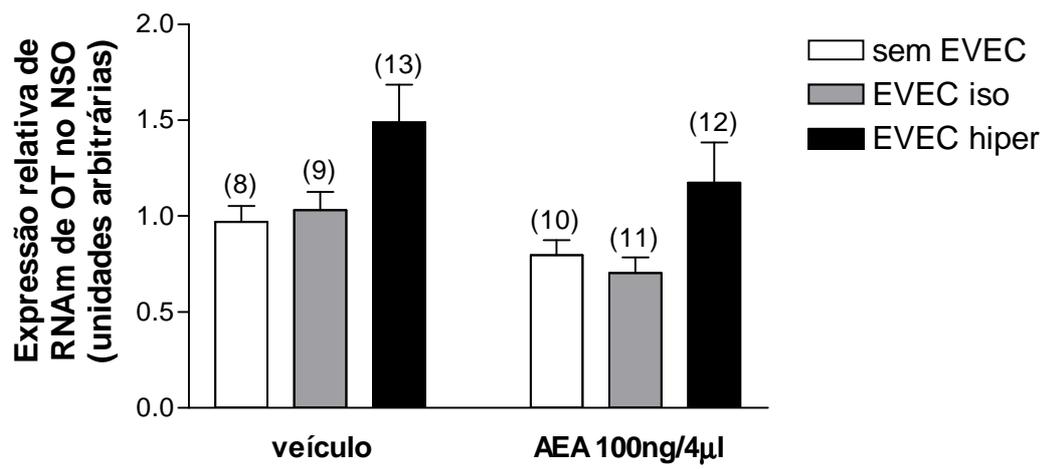


Figura 5A.2.2 – Efeitos da administração prévia de AEA (100ng/4µl) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para OT no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.

**5B - Efeitos da administração intragástrica prévia de um antagonista CB<sub>1</sub> (rimonabanto, 10mg/kg) sobre a expressão de RNAm no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.**

### **5B.1 - AVP**

A Figura 5B.1.1, que representa o efeito da administração prévia de rimonabanto sobre a expressão de RNAm para AVP em resposta à EVEC, mostra que o estímulo hipertônico ( $1.08 \pm 0.16$  vs  $2.05 \pm 0.34$ ,  $p < 0.001$ ), porém não o isotônico, promove aumento na expressão do RNAm para AVP no grupo tratado com veículo. Também pode ser observado que a administração de rimonabanto, por si só, induziu uma redução na expressão do RNAm para AVP no grupo sem EVEC ( $1.08 \pm 0.16$  vs  $0.49 \pm 0.10$ ,  $p < 0.05$ ). A prévia administração do antagonista CB<sub>1</sub> também reduziu significativamente a resposta induzida pela EVEC hipertônica no NPV ( $2.05 \pm 0.34$  vs  $0.58 \pm 0.16$ ,  $p < 0.05$ ). Não foram observadas alterações significativas em relação ao tratamento na expressão do RNAm para AVP nos animais submetidos à EVEC isotônica.

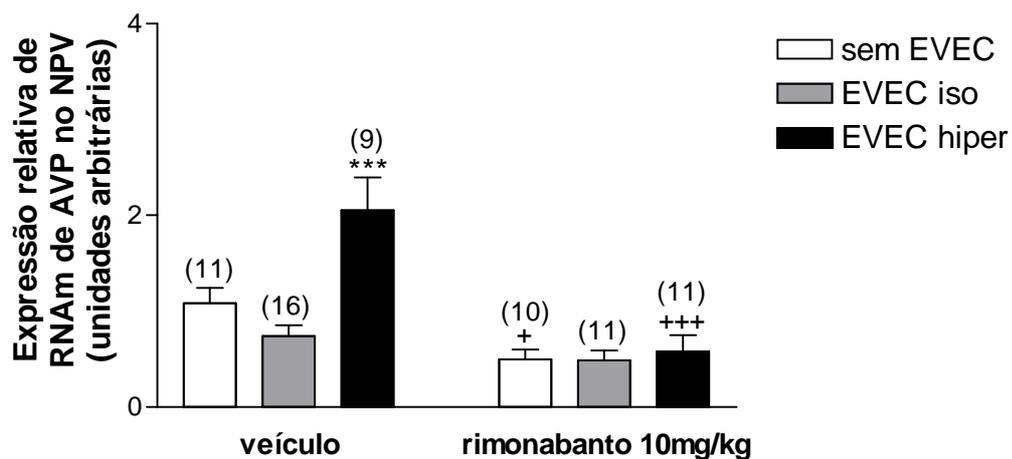


Figura 5B.1.1 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para AVP no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. + $p < 0.05$  e +++ $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC ou veículo + EVEC hiper.

A resposta obtida no NSO foi bastante semelhante à encontrada no NPV. De acordo com a Figura 5B.1.2, a EVEC hipertônica induziu um aumento na expressão do RNAm para AVP no NSO de animais injetados com veículo ( $1.11 \pm 0.11$  vs  $2.38 \pm 0.39$ ,  $p < 0.001$ ). Além disso, o pré-tratamento com rimonabanto reduziu significativamente a resposta induzida pela EVEC hipertônica ( $2.38 \pm 0.39$  vs  $1.46 \pm 0.21$ ,  $p < 0.05$ ). Não foram observadas alterações significativas na expressão do RNAm para AVP nos animais submetidos à EVEC isotônica, seja em relação à EVEC ou ao tratamento.

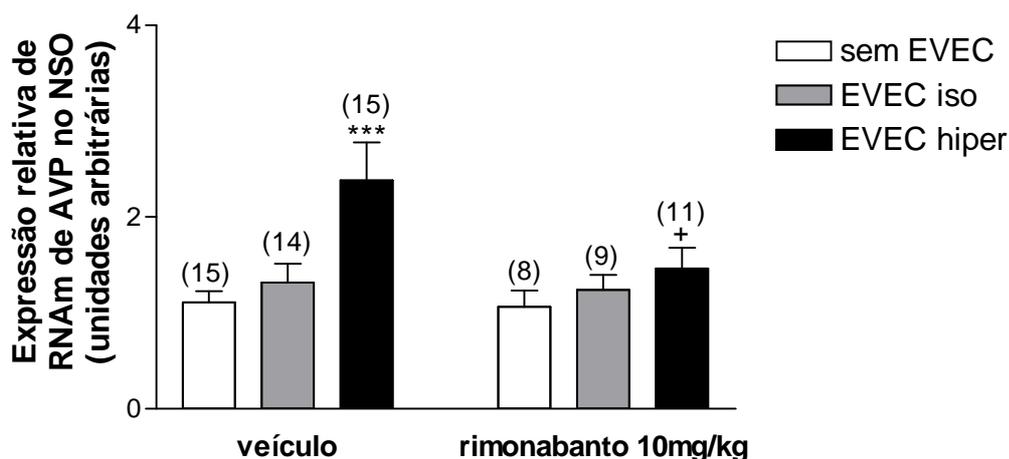


Figura 5B.1.2 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para AVP no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. + $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo + EVEC hiper.

## 5B.2 - OT

A Figura 5B.2.1 mostra a expressão relativa do RNAm para OT no NPV 60 minutos após a EVEC em animais pré-tratados com veículo ou rimonabanto. De acordo com os resultados, tanto a EVEC isotônica quanto a hipertônica induziram um aumento de duas vezes no conteúdo de RNAm para OT ( $0.97 \pm 0.27$  vs  $2.67 \pm 0.50$ ,  $p < 0.01$ ;  $0.97 \pm 0.27$  vs  $2.90 \pm 0.61$ ,  $p < 0.01$ , respectivamente). Contudo, a administração prévia de rimonabanto reduziu de maneira significativa esta resposta para os dois tipos de EVEC ( $2.67 \pm 0.50$  vs  $1.36 \pm 0.26$ ,  $p < 0.05$  para a EVEC isotônica;  $2.90 \pm 0.61$  vs  $1.37 \pm 0.21$ ,  $p < 0.05$  para a EVEC hipertônica).

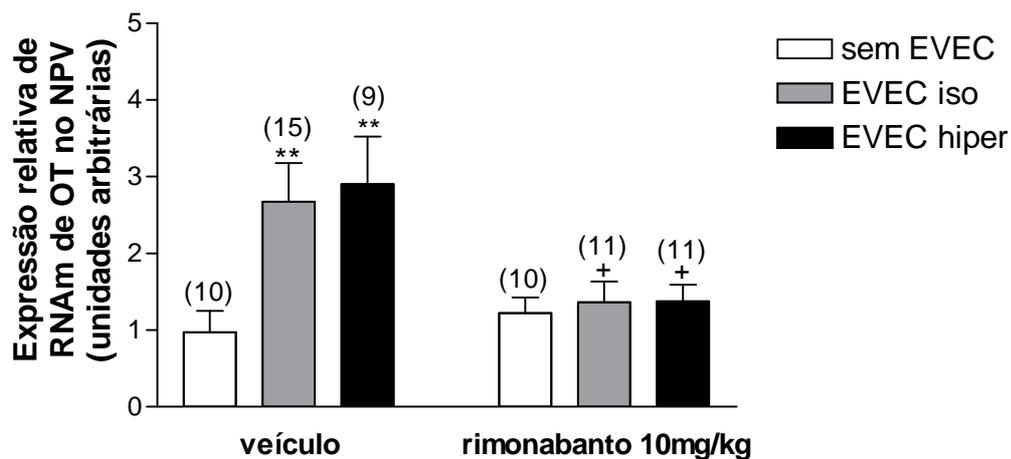


Figura 5B.2.1 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para OT no NPV em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. + $p < 0.05$  em relação ao grupo veículo + EVEC correspondente.

A expressão relativa do RNAm para OT no NSO, representada na Figura 5B.2.2, foi significativamente aumentada pela EVEC hipertônica, quando comparada à expressão basal do grupo veículo sem EVEC ( $0.89 \pm 0.06$  vs  $1.96 \pm 0.22$ ,  $p < 0.01$ ). Também pode ser observado que este efeito foi drasticamente reduzido nos animais pré-tratados com rimonabanto e submetidos à EVEC hipertônica ( $1.96 \pm 0.22$  vs  $1.35 \pm 0.18$ ,  $p < 0.01$ ).

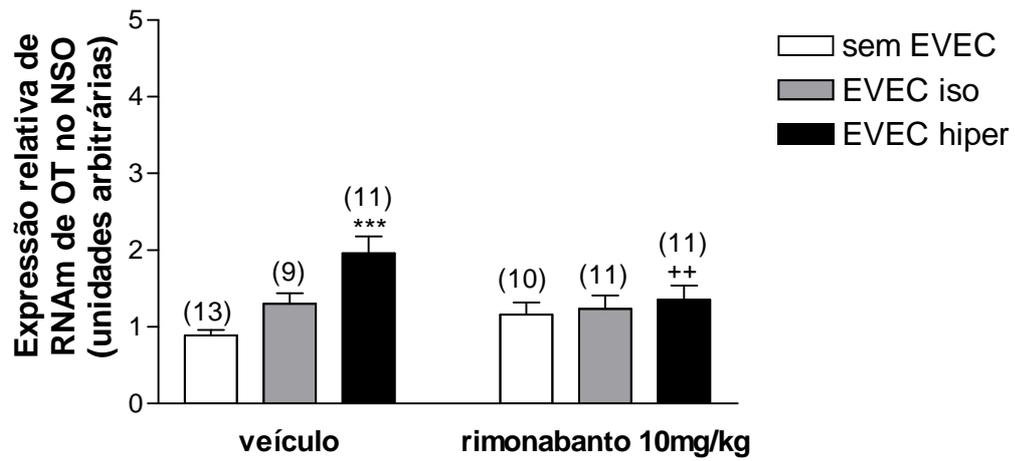


Figura 5B.2.2 – Efeitos da administração prévia de rimonabanto (10mg/kg) ou veículo sobre a expressão relativa do RNAm para OT no NSO em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo sem EVEC. ++ $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo + EVEC hiper.

***DISCUSSÃO***

Quando um aumento do volume extracelular é detectado, o organismo mobiliza diversos sistemas que visam, de uma forma geral, restabelecer o volume circulante pelo controle sobre a ingestão e excreção de eletrólitos e água. Estas respostas homeostáticas envolvem a ativação de mecanismos neurais, humorais e comportamentais.

A EVEC isotônica ativa receptores especializados localizados no sistema cardiovascular, os quais, por meio dos nervos vago e glossofaríngeo, atingem a região do NTS. Do tronco cerebral, partem conexões multissinápticas que alcançam o NPV e o NSO, promovendo ativação dos neurônios hipotalâmicos ocitocinérgicos e inibição da secreção de AVP. Por sua vez, a EVEC hipertônica, além de promover aumento do volume circulante, ativa células osmossensíveis localizadas nos OCV, as quais, por meio de vias diretas ou indiretas, estimulam a ativação de neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos, bem como a secreção dos hormônios neuro-hipofisários, dados apresentados neste estudo e que corroboram com os achados obtidos anteriormente por diversos autores (Haanwinckel *et al*, 1995; Durlo *et al*, 2004; Godino *et al*, 2005; Ruginsk *et al*, 2007). Agindo em sítios específicos nos rins e coração, os peptídeos produzidos pelo NPV e NSO, em conjunto com outros sistemas, promovem os ajustes necessários para a manutenção da homeostase hidreletrolítica, controlando a excreção renal de água e eletrólitos.

Além da AVP e OT, outros hormônios participam da manutenção do equilíbrio hidrossalino, como é o caso dos peptídeos natriuréticos (PN), entre eles o de origem atrial (PNA), e a prolactina (PRL). A PRL é um hormônio que influencia múltiplos processos, dentre os quais o desenvolvimento mamário, produção e manutenção da secreção de leite, a resposta imune e ao estresse, e o metabolismo celular (Freeman *et al*, 2000). As ações da PRL no equilíbrio hidreletrolítico estão

relacionadas ao controle renal do transporte de solutos e água (Shennan, 1994). Nossos resultados corroboram com dados anteriores de nosso laboratório (Durlo *et al*, 2004) e mostram que tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica induzem aumento na secreção de PRL.

Diversas evidências também apontam para a participação do eixo HHA na modulação das respostas hormonais à EVEC, uma vez que tanto o estímulo isotônico quanto o hipertônico elevaram as concentrações plasmáticas de corticosterona em estudos anteriores (Durlo *et al*, 2004; Ruginsk *et al*, 2007). Contudo, no protocolo de injeção central, os dados não mostram uma diferença significativa da EVEC sobre a secreção de corticosterona, apesar de o estímulo hipertônico ter aumentado a secreção deste hormônio. Isso se deve a diferenças metodológicas empregadas e ao fato de que a secreção de corticosterona responde a outros tipos de estresse, como o uso de técnicas invasivas, já que os animais utilizados no presente estudo tiveram adicionalmente o sistema nervoso central manipulado cirurgicamente (canulação do ventrículo lateral direito). Em decorrência dos diversos procedimentos acumulados ao longo do protocolo experimental, o efeito da EVEC, principalmente do estímulo isotônico, sobre a secreção de corticosterona foi parcialmente mascarado, uma vez que foi observado aumento nos valores basais deste glicocorticóide. Mais uma evidência que reforça esta hipótese é a de que, no protocolo experimental em que é administrado periféricamente o antagonista CB<sub>1</sub> (rimonabanto), sem a necessidade da realização da cirurgia estereotáxica, os animais que receberam veículo apresentaram um aumento da secreção de corticosterona, tanto em resposta à EVEC isotônica quanto hipertônica.

Os efeitos dos glicocorticóides sobre a ativação de mecanismos homeostáticos complexos, como a síntese de proteínas, e sobre a modulação de

respostas rápidas como a secreção hormonal, têm sido recentemente alvo de diversos estudos. Atualmente, os glicocorticóides estão relacionados a uma série de ações que envolvem o recrutamento de respostas fisiológicas e comportamentais rápidas ou tardias em tecidos-alvo distribuídos por todo o organismo. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório também mostraram que o pré-tratamento com dexametasona, um glicocorticóide exógeno, diminuiu as concentrações plasmáticas de OT observadas em resposta à EVEC isotônica e hipertônica (Durlo *et al*, 2004; Ruginsk *et al*, 2007) e não alterou as concentrações plasmáticas de AVP induzidas pelos mesmos estímulos (Ruginsk *et al*, 2007; Lauand *et al*, 2007). Dados imunistoquímicos mostraram ainda que o pré-tratamento com dexametasona diminuiu o número de neurônios ocitocinérgicos ativados em resposta à EVEC. Ao contrário disso, a prévia administração de dexametasona não alterou o padrão de ativação dos neurônios vasopressinérgicos observado em resposta ao estímulo isotônico, porém inibiu a resposta celular à EVEC hipertônica (Ruginsk *et al*, 2007). Em conjunto, esses resultados sugerem que os glicocorticóides modulam não só a rápida secreção de OT, mas também a ativação de neurônios ocitocinérgicos em resposta à EVEC, e que, ao contrário disso, a modulação da secreção de AVP pelos glicocorticóides parece não envolver mecanismos de secreção, mas sim de ativação neuronal.

Considerando a incompatibilidade entre os efeitos biológicos e comportamentais rápidos dos glicocorticóides e a regulação transcrição-dependente, estudos sugerem que algumas destas ações possam ser mediadas pela interação dos glicocorticóides com a membrana plasmática (Liu & Chen, 1995) e envolvam mecanismos independentes da transcrição gênica (Limbourg e Liao, 2003). Di *et al* (2003 e 2005) mostraram posteriormente que os efeitos inibitórios dos

glicocorticóides sobre a ativação neuronal estão relacionados com a supressão das vias excitatórias (principalmente glutamatérgicas) e/ou facilitação das vias inibitórias (GABAérgicas) no hipotálamo. Estes estudos mostraram que os glicocorticóides inibem rapidamente as correntes glutamatérgicas em terminais pós-sinápticos de neurônios magnocelulares e parvocelulares do NPV por meio da liberação dos endocanabinóides, que agem como mensageiros retrógrados suprimindo a liberação de glutamato para a fenda sináptica (para revisão, ver Tasker *et al*, 2007).

Com base nestes relatos e na utilização de um agonista endógeno (AEA) e de um antagonista dos receptores canabinóides do tipo CB<sub>1</sub> (rimonabanto), os resultados apresentados mostram que o pré-tratamento com AEA diminuiu significativamente a secreção de corticosterona nos animais submetidos à EVEC, achados que corroboram com os obtidos por outros autores (Barna *et al*, 2004; Wade *et al*, 2006). Dados preliminares indicam ainda que o pré-tratamento com rimonabanto potencializa a secreção de corticosterona em resposta à EVEC, sugerindo que os canabinóides endógenos estejam modulando diretamente a ativação do eixo HHA via receptores CB<sub>1</sub>.

Nossos resultados também mostraram que a administração prévia de AEA diminuiu a resposta induzida pela EVEC na secreção de PRL, dados semelhantes aos obtidos por Scorticati *et al* (2003), e não alterou de maneira expressiva os valores de AVP observados em resposta à EVEC. Por outro lado, o pré-tratamento com o antagonista CB<sub>1</sub> potencializou significativamente a secreção de PRL em resposta à EVEC isotônica e também a secreção de AVP em resposta ao estímulo hipertônico, sugerindo que nem todos os efeitos observados sobre a secreção destes dois peptídeos e mediados pelo receptor CB<sub>1</sub> possam ser induzidos pela administração exógena de AEA.

Quando consideramos a secreção de OT, pôde-se observar que o pré-tratamento com AEA impediu o aumento das concentrações plasmáticas deste hormônio observado em resposta à EVEC, mimetizando os resultados obtidos em animais tratados com dexametasona (Durlo *et al*, 2004; Ruginsk *et al*, 2007). A administração prévia de rimonabanto, por sua vez, potencializou o efeito da EVEC sobre a secreção de OT. Em conjunto, esses dados reforçam o papel dos endocanabinóides na modulação negativa à secreção de OT e apontam para uma participação direta dos receptores CB<sub>1</sub> sobre a secreção deste peptídeo induzida pela EVEC.

Além de influenciar a secreção hormonal, nossos dados sugerem que a via desencadeada pela ativação do receptor canabinóide CB<sub>1</sub> possa modular a atividade de neurônios magnocelulares do hipotálamo. Particularmente em relação à administração central de AEA, não foram observadas alterações significativas no padrão de ativação neuronal do NPV e NSO, seja nos neurônios vasopressinérgicos ou ocitocinérgicos. Contudo, quando o antagonista rimonabanto foi pré-administrado, houve uma potencialização dos efeitos induzidos pela EVEC, tanto em neurônios marcados para AVP quanto para OT. Estes dados sugerem que o receptor CB<sub>1</sub> esteja envolvido na modulação da atividade neuronal em resposta à EVEC, e que a AEA possa desencadear mecanismos distintos que aumentem a complexidade desta via.

Já foi descrito que a AEA se liga aos receptores CB<sub>1</sub> com alta afinidade e regula a atividade das proteínas efetoras da cascata como um agonista parcial (Bouaboula *et al*, 1995). Por outro lado, o outro endocanabinóide descrito até o momento (2-AG), apesar de ser o mais abundante no SNC, tem menor afinidade por esta classe de receptores quando comparado à AEA, porém estimula a cascata

intracelular como um agonista total (Mechoulam *et al*, 1995). Ambas as substâncias são sintetizadas a partir de fosfolípidos de membrana, porém utilizam maquinaria enzimática distinta, tanto para sua síntese quanto para degradação. Porém, não existem na literatura dados que relacionam um ou outro tipo de substância aos efeitos atribuídos ao sistema canabinóide endógeno, particularmente ao receptor CB<sub>1</sub>. O que se sabe é que, além dos dois tipos classicamente estudados, outros receptores da família canabinóide ainda estão para serem completamente descritos em termos de afinidade, locais de expressão e mecanismo de ação, como é o caso do receptor órfão GPR55.

Além disso, uma descoberta muito importante é a de que a AEA pode se ligar a receptores vanilóides do subtipo TRPV1 com alta afinidade. Estes estudos sugerem ainda que a AEA possa ativar conjuntamente os receptores CB<sub>1</sub> e os receptores TRPV1, uma vez que os dois tipos de receptores estão colocalizados em diversas regiões do SNC (Tóth *et al*, 2005) e que alguns dos efeitos produzidos pela AEA não puderam ser mimetizados pelo agonista sintético WIN55,212-2 no hipocampo e em outras regiões cerebrais (Al-Hayani *et al*, 2001). Além disso, alguns dos efeitos atribuídos à AEA, como antinocicepção, continuaram presentes em animais *knockout* para o gene que codifica o receptor CB<sub>1</sub>, sugerindo que estas respostas possam ser mediadas pela ativação exclusiva do sistema vanilóide (Di Marzo *et al*, 2000).

Considerando a modulação exercida pelos endocanabinóides sobre a atividade sináptica, diversos estudos têm demonstrado ações diretas destas substâncias sobre o balanço central de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Tanto o NPV quanto o NSO recebem uma densa inervação glutamatérgica, que corresponde a aproximadamente um quarto do total de contatos

sinápticos estabelecidos por estes neurônios (van den Pol *et al*, 1990). Além de participar do metabolismo celular, o glutamato é liberado para a fenda, sendo rapidamente captado pela terminação pós-sináptica por meio de transportadores específicos, entre eles o VGLUT2. Este tipo de receptor está presente nos neurônios magnocelulares (Mueller *et al*, 2005), na camada externa da EM (Lin *et al*, 2003) e na hipófise posterior (Hisano *et al*, 2002), o que pode indicar diversos sítios de ação local sobre a síntese e secreção hormonal. No entanto, deve ser esclarecido que os valores apresentados neste estudo para o conteúdo glutamatérgico não permitem a determinação da distribuição do neurotransmissor segundo compartimentos celulares, mas sim uma avaliação geral do balanço entre seu armazenamento e utilização.

Em nosso estudo, tanto a EVEC hipertônica quanto isotônica induziram um aumento significativo no conteúdo total de glutamato no NPV e NSO. Estes achados são consistentes com a participação de estímulos excitatórios vindos do tronco cerebral, particularmente do NTS e AP, e também de outras regiões hipotalâmicas, na ativação de respostas neuroendócrinas e autonômicas induzidas pela hipervolemia e hiperosmolalidade (para revisão, ver Antunes-Rodrigues *et al*, 2004). O pré-tratamento com AEA não alterou significativamente estes valores no NPV, porém potencializou a resposta induzida pela EVEC no SON, podendo indicar que mais glutamato tenha sido produzido ou que menos desta substância tenha sido utilizada nos diferentes processos celulares. A administração do antagonista CB<sub>1</sub>, por outro lado, diminuiu estes estoques, podendo sugerir que menos glutamato tenha sido produzido ou que mais desta substância possa ter sido liberada. Esta última teoria estaria de acordo com os achados imunoistoquímicos, uma vez que a prévia administração de rimonabanto potencializou o número de neurônios

ocitocinérgicos e vasopressinérgicos ativados em resposta à EVEC hipertônica. Contrariamente, a prévia administração de AEA não alterou o padrão de ativação neuronal, porém modificou o conteúdo total de glutamato, sugerindo outros mecanismos mais complexos estejam envolvidos nestas respostas. Nossos dados também sugerem que a AEA possa modular o conteúdo de glutamato da EM independentemente da ativação do receptor CB<sub>1</sub>, porém a função deste mecanismo para o controle da secreção hipofisária ainda não está esclarecido.

Mais recentemente, uma nova descoberta veio aumentar a complexidade deste sistema. Foi sugerido que os glicocorticóides possam estimular simultaneamente duas vias não genômicas distintas. A ativação da cascata intracelular derivada da subunidade G<sub>αs</sub> do receptor transmembrânico de glicocorticóides estimularia a liberação de endocanabinóides, os quais, por sua vez, agiriam como mensageiros retrógrados nos receptores CB<sub>1</sub>, localizados nos terminais pré-sinápticos, para suprimir a liberação de glutamato para a fenda. Por outro lado, a cascata intracelular iniciada pela ativação da subunidade G<sub>βγ</sub> levaria à síntese e liberação de NO, substância que tem um efeito estimulatório sobre a liberação de GABA, o principal neurotransmissor inibitório do SNC (Di *et al*, 2009). Segundo estes autores, os efeitos combinados dos endocanabinóides e do NO produziram, *in vitro*, uma inibição tônica dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos, resultando em secreção diminuída de AVP e OT.

O NO é um dos mais estudados neuromoduladores gasosos e tem sido relacionado a uma série de respostas fisiológicas e patológicas (Leonelli *et al*, 2008). Ele é produzido por ação da enzima NO sintase (NOS) sobre a L-arginina, em quantidades equimolares ao outro produto da reação, L-citrulina. Uma vez liberado, o NO tem um alcance e uma meia-vida muito curtos, sendo rapidamente convertido

em nitrato e nitrito. Estudos recentes mostraram que o NO inibe centralmente a secreção de OT induzida por estímulo angiotensinérgico, além de diminuir o número de disparos em neurônios magnocelulares do NPV e NSO (Ventura *et al*, 2009; Reis *et al*, 2007). Além disso, de acordo com o descrito anteriormente, a liberação de NO e GABA mediada pelos glicocorticóides também pode estar relacionada à inibição destas células (Di *et al*, 2005; Di *et al*, 2009). Embora estes efeitos sobre as sinapses GABAérgicas possam ser determinados pela produção e expressão seletiva de elementos nos terminais pré e pós-sinápticos, estudos têm sugerido que o NO também possa modular a excitabilidade neuronal independentemente da liberação de GABA (Ventura *et al*, 2009).

Nossos resultados mostraram que a EVEC hipertônica promove um aumento significativo no conteúdo de nitrato do NPV, mas não do NSO, de animais que receberam veículo centralmente, e que a administração prévia de AEA não modifica este padrão. Contudo, a prévia administração de AEA potencializou o conteúdo de nitrato encontrado no NSO de animais submetidos ao estímulo hipertônico, sugerindo que possam existir diferenças nas respostas elaboradas por estes dois núcleos hipotalâmicos. De fato, um aumento na atividade da NOS já foi demonstrado no hipotálamo médio basal de animais submetidos à sobrecarga salina crônica (Ventura *et al*, 2002), porém os estudos que avaliam a participação do NO na secreção de OT e AVP são bastante controversos e o uso de metodologias diversas dificulta a interpretação dos resultados obtidos.

Além de modular o conteúdo de nitrato no hipotálamo, nossos resultados mostram que a AEA parece potencializar a resposta induzida pela EVEC hipertônica na EM. Estes dados são consistentes com a evidência de que o NO de origem endotelial, produzido pelos capilares da circulação porta-hipofisária em resposta à

estimulação por AEA, possa estar envolvido na modulação da secreção de hormônios sintetizados pela hipófise anterior de ratos (Prevot *et al*, 1998). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entres os grupos quando consideramos o protocolo de administração periférica do antagonista CB<sub>1</sub>. Em conjunto, nossos dados podem sugerir que a modulação exercida pela AEA na produção de NO pela EM em resposta à EVEC não sejam mediados pela ativação do receptor CB<sub>1</sub>.

Além de demonstrar a participação do sistema canabinóide endógeno na secreção hormonal, ativação neuronal e neuromodulação, este trabalho também mostrou o efeito deste sistema sobre a expressão do RNAm de AVP e OT no hipotálamo de animais submetidos à EVEC. De acordo com os resultados, a EVEC hipertônica, porém não a isotônica, aumentou a expressão relativa do RNAm para AVP no NPV e NSO, dados consistentes com os apresentados para a secreção hormonal e ativação de neurônios vasopressinérgicos. Por outro lado, os dois tipos de estímulo induziram um aumento no conteúdo de RNAm para OT, sugerindo que não só mecanismos de liberação hormonal rápida foram ativados, mas também foram iniciados em resposta à EVEC processos que culminam com a síntese peptídica. A prévia administração de AEA não alterou significativamente o padrão de resposta à EVEC, seja em relação à expressão do RNAm para OT ou AVP. Por outro lado, a administração do antagonista CB<sub>1</sub> diminuiu significativamente a expressão do RNAm para os dois peptídeos, tanto no NPV quanto no NSO. Os mecanismos envolvidos nesta resposta ainda não conhecidos, porém Páldyová e colaboradores (2007) mostraram que o antagonista CB<sub>1</sub> rimonabanto pode apresentar efeitos dissociados na atividade funcional e na expressão do RNAm de receptores opióides no cerebelo. Além disso, deve ser levado em conta o fato de

que a expressão do RNAm nem sempre está diretamente associada à quantidade de proteína sintetizada, uma vez que existem mecanismos de processamento pós-transcricional que podem atuar quando a demanda de síntese é aumentada.

Analisando, em conjunto, os múltiplos eventos que formam a resposta neuroendócrina à expansão aguda do volume extracelular, podemos traçar uma linha temporal de efeitos que se inicia com a secreção dos hormônios hipotalâmicos a partir dos estoques neuro-hipofisários, efeito que é observado dentro de poucos minutos a partir da apresentação do estímulo e que parece estar sob modulação dos receptores CB<sub>1</sub>. A EVEC hipertônica produziu um aumento detectável no número de duplas marcações para c-Fos/AVP ou c-Fos/OT no NPV e NSO, bem como na expressão do RNAm tanto de AVP quanto de OT. Interessantemente, a administração central de AEA não alterou a resposta neuronal ou de RNAm, embora o pré-tratamento com rimonabanto tenha promovido aumento da ativação celular e inibição da expressão do RNAm para AVP e OT. Contudo, deve ser notado que um aumento na secreção hormonal nem sempre está relacionado a um aumento da expressão de RNAm, uma vez que estes efeitos constituem duas respostas fisiológicas independentes, temporalmente separadas.

Além disso, Carter e colaboradores (1991) apresentaram a primeira evidência de que a expressão de RNAm para OT e AVP induzida pela injeção intraperitoneal de salina hipertônica possa estar temporalmente dissociada de outros eventos, como a ativação neuronal. Estes autores mostraram que os neurônios magnocelulares podem produzir um aumento no tamanho da cauda de poli (A) presente no terminal 3' da molécula de RNAm, fato que precedeu, naquele estudo, qualquer alteração significativa no conteúdo absoluto de RNAm. O aumento do comprimento da cauda poli (A) parece estar relacionado a um aumento na estabilidade do RNA (Ford *et al*,

1997) e, apesar de também ser observado em resposta a estímulos agudos, parece constituir um mecanismo adaptativo importante quando o estímulo osmótico é persistente. Infelizmente, não se pode afirmar que esteja seja o mecanismo responsável pelas respostas observadas, tampouco que os endocanabinóides estejam envolvidos neste processo, mas pode-se especular que a administração de rimonabanto possa ter alterado de alguma forma a cinética de síntese protéica, apesar de a resposta celular e a secreção hormonal induzidas pela EVEC terem sido mantidas, ou até mesmo potencializadas, pelo pré-tratamento com rimonabanto. Contudo, novos estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

Em suma, os dados apresentados forneceram evidências da participação dos canabinóides endógenos na modulação da secreção hormonal e da via de neurotransmissão excitatória glutamatérgica *in vivo* por meio da utilização do modelo experimental da EVEC e da avaliação dos efeitos da administração do ligante endógeno e de um antagonista dos receptores CB<sub>1</sub> sobre as respostas induzidas frente ao aumento da osmolalidade e do volume circulantes, e ainda forneceram evidências da participação de outros sistemas no controle destas respostas.

**CONCLUSÕES**

Os resultados apresentados permitem concluir que o sistema canabinóide endógeno, via receptor CB<sub>1</sub>, participa de diversos eventos relacionados à síntese e secreção de OT e AVP induzidas pelo estímulo da EVEC. Porém, estes dados também sugerem que a AEA não seja o principal endocanabinóide envolvido em tais respostas.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Al-Hayani, A., Wease, K.N., Ross, R.A., Pertwee, R.G., Davies, S.N., 2001. The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology* 41(8):1000-5.

Andersson, B., 1978. Regulation of water intake. *Physiol. Rev.* 58: 582–603.

Antunes-Rodrigues, J., Ramalho, M.J., Reis, L.C., Menani, J.V., Turrin, M.Q., Gutkowska, J., McCann, S.M., 1991. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 88:2956-2960.

Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M., Elias, L.L., Valença, M.M., McCann, S.M., 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev.* 84(1):169-208.

Beato, M., Sánchez-Pacheco, A., 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr. Rev.* 17(6):587-609.

Barna, I., Zelena, D., Arszovski, A.C., Ledent, C., 2004. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci.*, 75:2959-2970.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Activation of mitogen-activated

protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J.* 312 (Pt 2):637-41.

Brooks, F.P., Pickford, M., 1958. The effect of posterior pituitary hormones on the excretion of electrolytes, in dogs. *J. Physiol.*, 142: 468-493.

Carter, D.A., Murphy, D., 1991. Rapid changes in poly (A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophyseal peptide gene activation following physiological stimulation. *Neuroendocrinology* 53(1):1-6.

Castro, M., Figueiredo, F., Moreira, A.C., 1995. Time-course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. *Horm. Metab. Res.*, 27:10-15.

de Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(6):463-75.

Denton, D.A., McKinley, M.J., Weisinger, R.S., 1996. Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 7397–7404.

Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., Tasker, J., 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of Neuroscience*, 23(12):4850-57.

Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V.L., Bazan, N.G., Tasker, J.G., 2005. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology*, 145(10):4292-4301.

Di, S., Maxson, M.M., Franco, A., Tasker, J.G., 2009. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J. Neurosci.* 29(2):393-401.

Di Marzo, V., Breivogel, C.S., Tao, Q., Bridgen, D.T., Razdan, R.K., Zimmer, A.M., Zimmer, A., Martin, B.R., 2000. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2)receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J. Neurochem.* 75(6):2434-44.

Durlo, F.V., Castro, M., Elias, L.L.K., Antunes-Rodrigues, J., 2004. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. *Exp. Physiol.*, 89(5): 541-48.

Elias, L.L.K., Castro, M., Oliveira, F.R.T., Siqueira, M.L.S., McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., 2000. Effect of vasopressin (AVP) on atrial natriuretic peptide (ANP) release in rats (Abstract). *Proc. Int. Congr. Endocrinol. 11<sup>th</sup> Sydney Australia 2000*, p.347.

Ford, L.P., Bagga, P.S., Wilusz, J., 1997. The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. *Mol. Cell Biol.* 17(1):398-406.

Freemann, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80, 1523–1631.

Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling (review). *Physiol. Rev.*, 83:1017-1066.

Godino, A., Giusti-Paiva, A., Antunes-Rodrigues, J., Vivas, L., 2005. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience* 133(2):493-505.

Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N., Catterall, W.A., 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365–368.

Haanwinckel, M.A., Elias, L.L.K., Favaretto, A.L., Gutkowska, J., McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., 1995. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:7902-7906.

Harms, P.G., Ojeda, S.R., 1974. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *Appl Physiol.* 36(3):391-2.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11(2):563-83.

Hisano, S., Nogami, H., 2002. Transporters in the neurohypophysial neuroendocrine system, with special reference to vesicular glutamate transporters (BNPI and DNPI): a review. *Microsc. Res. Tech.* 56: 122–131.

Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Ono, H., Inenaga, K., Tankum, M.M., Yoshida, S., Noda, M., 2002. Na<sub>x</sub> channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat. Neurosci.* 4: 511–512.

Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Okado, H., Noda, M., 2004. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na<sub>x</sub> sodium channels for the control of salt intake behavior. *J. Neurosci.* 24: 9276–9281.

Hussain, M.K., Fernando, N., Shapiro, M., Kagan, A., Glick, S.M., 1973. Radioimmunoassay of arginine vasopressin in humans plasma. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 37(4):616-625.

Jankowski, M., Ilajjar, F., Kawas, S.A., Mukaddam-Daher, S., Hoffman, G., McCann, S.M., Gutkowska, J., 1998. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 95: 14558-14563.

Landgraf, R., Malkinso, T., Horn, T., Veale, W.L., Lederis, K., Pittman, Q.J., 1990. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am. J. Physiol.*, 258(27):155-59.

Lake, K.D., Compton, D.R., Varga, K., Martin, B.R., Kunos, G., 1997. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 1030–1037.

Lauand, F., Ruginsk, S.G., Rodrigues, H.L., Reis, W.L., De Castro, M., Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., 2007. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience*, 147(1):247-57.

Leonelli, M., Torrão, A.S., Britto, L.R., 2009. Unconventional neurotransmitters, neurodegeneration and neuroprotection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42(1):68-75.

Limbourg, F.P., Huang, Z., Plumier, J.C., Simoncini, T., Fujioka, M., Tuckermann, J., Schütz, G., Moskowitz, M.A., Liao, J.K., 2002. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J. Clin. Invest.* 110(11):1729-38. Erratum in: *J. Clin. Invest.* 2003 Mar;111(5):759.

Limbourg, F.P., Liao, J.K., 2003. Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J. Mol. Med* 81:168-74.

Lin, W., McKinney, K., Liu, L., Lakhani, S., Jennes, L., 2003. Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 144:662–670.

Liu, X., Chen, Y.Z., 1995. Membrane mediated inhibition of corticosterone on the release of arginine vasopressin from rat hypothalamic slices. *Brain Res.*, 704(1):19-22.

Lomax, P., 1970. The effect of marihuana on pituitary-thyroid activity in the rat. *Agents Actions* 1(5):252-7.

Matias, I., Di Marzo, V., 2006. Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance. *J. Endocrinol. Invest.* 29(3Suppl):15-26.

McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., Karanth, S., Rettori, V., 2000. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 1121-31.

McDonald, N.A., Kuzmiski, J.B., Naderi, N., Schwab, Y., Pittman, Q.J., 2008. Endogenous modulators of synaptic transmission: cannabinoid regulation in the supraoptic nucleus. *Prog. Brain Res.* 170:129-36.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., et al., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50(1):83-90.

Meng, I.D., Manning, B.H., Martin, W.J., Fields, H.L., 1998. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 395(6700):381-3.

Mikics, E., Kruk, M.R., Haller, J., 2004. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 29(5):618-35.

Mueller, N.K., Di, S., Paden, C.M., Herman, J.P., 2005. Activity-dependent modulation of neurotransmitter innervation to vasopressin neurons of the supraoptic nucleus. *Endocrinology* 146: 348–354.

Mukoyama, M., Arai, H., Katsuura, G., Eigyo, M., Matsushita, A., Imura, H., 1987. Modulatory role of vasopressin in secretion of atrial natriuretic polypeptide in conscious rats. *Endocrinology*, 120: 2186-2188.

Navarrete, M., Araque, A., 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57(6):883-93.

Newton, R., 2000. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55(7):603-13.

Oliet, S.H., Bourque, C.W., 1993. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 22, 364(6435): 341-343.

Oliet, S.H., Baimoukhametova, D.V., Piet, R., Bains, J.S., 2007. Retrograde regulation of GABA transmission by the tonic release of oxytocin and endocannabinoids governs postsynaptic firing. *J. Neurosci.* 27(6):1325-33.

Orchinik, M., Murray, T.F., Moore, F.L., 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 28; 252(5014):1848-51.

Pagotto, U., Marsicano, G., Fezza, F., Theodoropoulou, M., Grübler, Y., Stalla, J., Arzberger, T., Milone, A., Losa, M., Di Marzo, V., Lutz, B., Stalla, G.K., 2001. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(6):2687-96.

Páldyová, E., Bereczki, E., Sántha, M., Wenger, T., Borsodi, A., Benyhe, S., 2007. Altered gene expression and functional activity of opioid receptors in the cerebellum of CB1 cannabinoid receptor knockout mice after acute treatments with cannabinoids. *Acta Biol. Hung.* 58 (Suppl 3):113-29.

Paxinos, G., Watson, C., 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego.

Prevot, V., Rialas, C.M., Croix, D., Salzet, M., Dupouy, J.P., Poulain, P., Beauvillain, J.C., Stefano, G.B., 1998. Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. *Brain Res.* 790(1-2):236-44.

Rademacher, D.J., Patel, S., Hopp, F.A., Dean, C., Hillard, C.J., Seagard, J.L., 2003. Microinjection of a cannabinoid receptor antagonist into the NTS increases baroreflex duration in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1570–H1576.

Rettori, V., Aguila, M.C., Gimeno, M.F., Franchi, A.M., McCann, S.M., 1990. In vitro effect of delta 9-tetrahydrocannabinol to stimulate somatostatin release and block that of luteinizing hormone-releasing hormone by suppression of the release of prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(24):10063-6.

Reis, W.L., Giusti-Paiva, A., Ventura, R.R., Margatho, L.O., Gomes, D.A., Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., 2007. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. *Exp. Physiol.* 92(5):903-11.

Reul, J.M., de Kloet, E.R., 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117(6):2505-11.

Ruginsk, S.G., Oliveira, F.R.T., Margatho, L.O., Vivas, L., Elias, L.L.K., Antunes-Rodrigues, J., 2007. Glucocorticoid modulation of neuronal activation and

hormone secretion induced by blood volume expansion. *Exp. Neurol.*, 206(2):192-200.

Sandi, C., Venero, C., Guaza, C., 1996. Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur. J. Neurosci.* 8(4):794-800.

Scorticati, C., Mohn, C., De Laurentis, A., Vissio, P., Solari, J.F., Seilicovich, A., McCann, S.M., Rettori, V., 2003. The effect of anandamide on prolactin secretion is modulated by estrogen. *PNAS*, 100(4):2134-2139. Shennan, D.B., 1994. Regulation of water and solute transport across mammalian plasma cell membranes by prolactin. *J. Dairy Res.* 61, 155–166.

Soares, T.J., Coimbra, T.M., Martins, A.R., Pereira, A.G., Carnio, E.C., Branco, L.G., Albuquerque-Araujo, W.I., De Nucci, G., Favaretto, A.L., Gutkowska, J., McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., 1999. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 5, 96(1): 278-283.

Stricker, E.M., Verbalis, J.G., 1986. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *Am. J. Physiol.*, 250(19):267-275.

Tasker, J.G., Di, S., Malcher-Lopez, R., 2007. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*, 147(12):5549-5556.

Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L., Blumberg, P.M., 2005. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 135(1-2):162-8.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M., Mackie, K., Walker, J., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83(2):393-411.

Tyrey, L., 1978. Delta-9-Tetrahydrocannabinol suppression of episodic luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Endocrinol.* 102(6):1808-14.

van den Pol, A.N., Wuarin, J.P., Dudek, F.E., 1990. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250:1276–1278.

Ventura, R.R., Gomes, D.A., Reis, W.L., Elias, L.L.K., Castro, M., Valença, M.M., Carnio, E.C., Rettori, E., McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., 2002. Nitroergic modulation of vasopressin, oxytocin and natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*, 35:1101-1109.

Ventura, R.R., Aguiar, J.F., Antunes-Rodrigues, J., Varanda, W.A., 2008. Nitric oxide modulates the firing rate of the rat supraoptic magnocellular neurons. *Neurosci.* 155(2):359-65.

Vecsei, P., 1979. Glucocorticoids: cortical, corticosteronae and compounds. Em Jaffe, B.M., Berhman, H.R. Methods of hormone radioimmunoassay. *New York, Academic Press*, 39:767-792.

Voisin, D.L., Bourque, C.W., 2002. Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. *Trends Neurosci.* 25: 199–205.

Wade, M.R., Degroot, A., Nomikos, G.G., 2006. Cannabinoid CB1 receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 551:162-167.

Weisinger, R.S., Blair-West, J.R., Chen, N., Burns, P., Weisinger, H.S., 2004. Neurobiology of Sodium Appetite. In: NEUROBIOLOGY OF FOOD AND FLUID INTAKE, 2<sup>nd</sup> ed., STRICKER E AND WOODS S (Eds), Handbook of Behavioral Neurobiology, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA 14: 545–585.

Windle, R.J., Wood, S.A., Shanks, N., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 1998. Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139(2):443-50.

Wittmann, G., Deli, L., Kalló, I., Hrabovszky, E., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., 2007. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 503(2):270-9.

# 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](#)