

Fabíola Raquel Tenório Oliveira

**EFEITOS DA EXPANSÃO DE VOLUME EXTRACELULAR  
SOBRE O CONTEÚDO DE CATECOLAMINAS E A ATIVAÇÃO  
NEURONAL DE ESTRUTURAS DO HIPOTÁLAMO E DO  
TRONCO CEREBRAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de doutora.  
Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues  
Co-orientador: Prof. Dr. Domingos L. W. P. Diniz.

BELÉM-Pa  
2007

Fabíola Raquel Tenório Oliveira

**EFEITOS DA EXPANSÃO DE VOLUME EXTRACELULAR  
SOBRE O CONTEÚDO DE CATECOLAMINAS E A ATIVAÇÃO  
NEURONAL DE ESTRUTURAS DO HIPOTÁLAMO E DO  
TRONCO CEREBRAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Domingos L. W. P. Diniz.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Durán Barbosa  
Instituição: Universidade de Vigo (Espanha)

Profa. Dra. Lucila Leico Kagoara Elias  
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. Juarez Antônio Quaresma  
Instituição: Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Lílian Rosana Ferreira Faro  
Instituição: Universidade Federal do Pará

Belém (Pa), 24 de julho de 2007

*Aos meus pais e meu eterno amor....*

***AGRADECIMENTOS***

---

Ao Dr. José Antunes Rodrigues, “chefe”, uma fonte de inspiração, um homem e pesquisador admirável que fez a história da ciência neste país.

Ao Dr. Domingos Diniz, com quem iniciei minha vida científica.

Aos membros do laboratório de Neuroendocrinologia (FMRP-USP) meus amigos, obrigada!



**OLIVEIRA, F.R.T. Efeitos da expansão de volume extracelular sobre o conteúdo de catecolaminas e a ativação neuronal de estruturas do hipotálamo e do tronco cerebral de ratos.** Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

A regulação fina do volume e osmolaridade dos líquidos corporais é fundamental para a sobrevivência. Qualquer variação na composição do meio interno ativa mecanismos comportamentais, neurais e hormonais compensatórios que controlam a ingestão e excreção de água e eletrólitos a fim de manter a homeostase hidroeletrolítica. Alterações na faixa de 1-2% na osmolaridade sanguínea estimulam a liberação de arginina vasopressina (AVP) que resulta em antidiurese além de ocitocina (OT) e peptídeo natriurético atrial (ANP) que promovem a natriurese. Trabalhos realizados em nosso laboratório utilizando o modelo experimental de expansão do volume extracelular (EVEC) mostraram ativação de neurônios magnocelulares ocitocinérgicos localizados no núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico (SON) responsáveis pela secreção de OT e AVP, igualmente alteradas em resposta a este estímulo. A participação do sistema nervoso simpático nestas condições tem sido levantada. Projeções medulares e tronco-encefálicas (simpáticas) para o hipotálamo poderiam atuar de forma seletiva inibindo sinalizações para a ingestão e estimulando sinalizações para excreção de água e eletrólitos. O papel de vias noradrenérgicas tronco-encefálicas nesta regulação ainda precisa ser mais bem estabelecido. Assim sendo, objetivamos neste estudo esclarecer o papel do sistema nervoso simpático (via noradrenérgicas) na regulação das alterações induzidas pelo modelo de EVEC, analisando por cromatografia líquida de alta eficácia o conteúdo de noradrenalina (NA), adrenalina (AD) e serotonina (5-HT) em estruturas do tronco cerebral como núcleo do trato solitário (NTS), bulbo rostro-ventro lateral (RVLM), locus coeruleus (LC) e núcleo dorsal da rafe (NDR) e estruturas hipotalâmicas como SON e PVN. Procuramos ainda, através de estudos imunocitoquímicos determinar alterações no padrão de ativação neuronal pela análise de Fos-TH ou Fos-5HT nas estruturas acima mencionadas em condições experimentais nas quais são induzidas alterações do volume do líquido extracelular.

Palavras chave: Hipotálamo, Expansão do volume extracelular, Osmolaridade.

***ABSTRACT***

---

**OLIVEIRA, F.R.T. Effects of extracellular volume expansion on catecholamines content and activation of neuronal structures in the hypothalamus and brainstem of rats.** Federal University of Para, Belem, 2007.

The fine adjustment of the volume and osmolarity of body fluids is vital to survival. Any variation in the composition of the internal environment, active behavioral mechanisms, neural and hormonal compensatory which control intake and excretion of water and electrolytes in order to maintain homeostasis hydroelectrolytic. Changes in the range of 1-2% in blood osmolarity stimulate the release of arginine vasopressin (AVP) resulting in antidiuresis addition to oxytocin (OT) and atrial natriuretic peptide (ANP) promoting natriuresis. Work done in our laboratory using the experimental model of extracellular volume expansion (EVEC) showed activation of magnocellular OT-neurons located in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) responsible for the secretion of AVP and OT also changed in response this stimulus. The involvement of the sympathetic nervous system in these conditions has been raised. Projections spinal and brainstem (sympathetic) to the hypothalamus could act selectively inhibiting signals for eating and stimulating signals for excretion of water and electrolytes. The role of noradrenergic brainstem this regulation still needs to be better established. Thus, this study aimed to elucidate the role of the sympathetic nervous system (noradrenergic pathway) in the regulation of the changes induced model of EVEC analyzing by high performance liquid chromatography the content of norepinephrine (NE), epinephrine (DA) and serotonin (5-HT) in brainstem structures such as the nucleus of the solitary tract (NTS), bulb rostral ventrolateral (RVLM), locus coeruleus (LC) and dorsal raphe nucleus (DRN) and hypothalamic structures like SON and PVN. We also seek, by immunocytochemical studies to determine changes in the pattern of neuronal activation by analysis of Fos-HT or Fos-5HT in the above mentioned structures in experimental conditions in which are induced changes in extracellular fluid volume.

**Keywords:** Hypothalamus, Expansion of extracellular volume, Osmolality.

***ABREVIATURAS***

---

AD	Adrenalina
ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
ANOVA	Análise de variância
AP	Área Postrema
AVP	Arginina Vasopressina
AV3V	Região antero-ventral do 3º ventrículo
DA	Dopamina
DOI	2,5-dimetoxi-4-iodofenil-2-aminopropano
EM	Eminência Mediana
EPM	Erro Padrão da Média
EVEC	Expansão do Volume Extracelular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficácia
5-HT	Serotonina
LC	Locus Coeruleus
NA	Noradrenalina
NPBL	Núcleo Parabraquial-lateral
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OT	Ocitocina
OVL	Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal

PVN	Núcleo Paraventricular
RVLM	Bulbo rostro-ventro lateral
SFO	Órgão Sub-fornicial
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo Supra-óptico
TH	Tirosina hidroxilase
VLM	Bulbo ventro lateral
WKY	Ratos normotensos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>3.1. ANIMAIS</b> .....	26
<b>3.2. CIRURGIA</b> .....	27
<b>3.2.1. CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR:</b> .....	27
<b>3.3. EXPANSÃO ISOTÔNICA OU HIPERTÔNICA DO VOLUME EXTRACELULAR</b> .....	27
<b>3.4. IMUNOISTOQUÍMICA</b> .....	27
<b>3.5. RETIRADA DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS PARA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CATECOLAMINAS</b> .....	29
<b>3.6. MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE CATECOLAMINAS NO PLASMA E TECIDO CEREBRAL</b> .....	30
<b>3.6.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS</b> .....	30
<b>3.6.2. SOLUÇÕES PADRÕES E PADRÃO INTERNO</b> .....	30
<b>3.6.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS</b> .....	31
<b>3.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NO TECIDO</b> .....	31
<b>3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	32
<b>4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	33
<b>4.1. EXPERIMENTO I:</b> .....	34
<i>Para avaliar os efeitos da EVEC sobre o conteúdo de noradrenalina e dopamina na EM, SON, PVN, NTS, RVLM, LC.</i> .....	34
<b>4.2. EXPERIMENTO II:</b> .....	34
<i>Para avaliar os efeitos da EVEC sobre a ativação neuronal na EM, SON, PVN, NTS, RVLM e LC através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com TH.</i> .....	34
<b>4.3. EXPERIMENTO III:</b> .....	34
<i>Para avaliar os efeitos da EVEC sobre as concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina.</i> .....	34
<b>4.4. EXPERIMENTO IV:</b> .....	35
<i>Para avaliar os efeitos da EVEC sobre o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA NDR.</i> .....	35
<b>4.5. EXPERIMENTO V:</b> .....	35
<i>Para avaliar os efeitos da EVEC sobre a ativação neuronal no NDR através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com 5-HT.</i> .....	35
<b>5. RESULTADOS</b> .....	36
<b>5.1. EXPERIMENTO I:</b> .....	37
<b>Figura 1.1</b> – Conteúdo total de NA e DA na EM após EVEC. ....	38
<b>Figura 1.2</b> – Conteúdo total de NA e DA no SON após EVEC. ....	39
<b>Figura 1.3</b> – Conteúdo total de NA e DA no PVN após EVEC. ....	40
<b>Figura 1.4</b> – Conteúdo total de NA e DA no NTS após EVEC. ....	42
<b>Figura 1.5</b> – Conteúdo total de NA e DA no RVLM após EVEC. ....	44
<b>Figura 1.6</b> – Conteúdo total de NA e DA no LC após EVEC. ....	46
<b>5.2. EXPERIMENTO II:</b> .....	47
<b>Figura 2.1</b> - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no SON. ....	48
<b>Figura 2.2</b> – Efeitos da EVEC sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-TH) na porção posterior do PVN. ....	49

<b>Figura 2.3</b> - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no PVN.....	50
<b>Figura 2.4</b> – Efeitos da EVEC sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-TH) no NTS-AP.....	51
<b>Figura 2.5</b> - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no NTS-AP.....	52
<b>Figura 2.6</b> – Efeitos da EVEC sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-TH) no RVLM. ....	53
<b>Figura 2.7</b> - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no RVLM. ....	54
<b>Figura 2.8</b> – Efeitos da EVEC sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-TH) no LC. ....	55
<b>Figura 2.9</b> - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no LC .....	56
<b>5.3. EXPERIMENTO III:</b> .....	57
<b>Figura 3.1</b> – Concentrações plasmáticas de NA e AD após EVEC. ....	58
<b>5.4. EXPERIMENTO IV:</b> .....	59
<b>Figura 4.1</b> – Conteúdo total de 5-HT e 5-HIAA no NDR após EVEC .....	60
<b>5.5. EXPERIMENTO V:</b> .....	61
<b>Figura 5.1</b> – Efeitos da EVEC sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-5-HT) no NDR, parte dorsal. ....	61
<b>Figura 5.2</b> - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-5HT no NDR, parte dorsal.....	62
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70
<b>8. ANEXOS</b> .....	83



A manutenção do equilíbrio do meio interno nos organismos vivos é condição essencial para a preservação da vida nas diferentes espécies. Em mamíferos superiores a regulação do volume e composição do fluido extracelular depende de ajustes corretivos realizados pelo Sistema Nervoso Central (SNC) a partir de sinalizações indicadoras da concentração de sódio, volume e pressão sangüínea oriundas de várias regiões do organismo, processadas em diversos segmentos do tronco cerebral, hipotálamo e bulbo olfatório antes de compor uma resposta comportamental de ingestão seletiva pelo sistema límbico (incluindo área septal e amígdala) e de excreção renal, também seletiva, a partir de mediação neuroendócrina (via arginina vasopressina (AVP), ocitocina (OT) e peptídeo natriurético atrial (ANP)) ou por eferências neurais autonômicas simpáticas.

Por outro lado, os rins também podem funcionar como poupadores de volume e sal (NaCl) a partir da secreção de renina cuja atividade no sangue culmina com a produção de angiotensina II (ANG II), potente vasoconstritor, dipsogênico e poupador renal de sódio e água, por estimular a secreção de aldosterona pelas adrenais e por atuar antagonizando as ações da ocitocina e de ANP no túbulo renal (para revisão ler: Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

Objetivando compreender os mecanismos que modulam a secreção de hormônios envolvidos no equilíbrio hidreletrolítico, foi desenvolvido um modelo experimental baseado na expansão do volume extracelular (EVEC). De fato evidências experimentais sugerem que a expansão do volume do líquido extracelular estimula os mecano-receptores sino-aórticos e renais, e que, após sinapses nos neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), ativam neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (LC) e/ou serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe (NDR), estimulando sinapses colinérgicas, adrenérgicas e ANPérgicas do hipotálamo, indutoras da secreção de ANP central (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). Lesões de ambas as estruturas determinam diminuição da concentração de ANP plasmático basal ou induzido por EVEC (Reis *et al.*, 1991 e 1994). A região anterior do LC pode ser parte de uma via inibitória que modularia o circuito controlador de respostas depressoras reflexas (autonômicas) ou respostas relacionadas ao aumento dos níveis de ANP circulante estimulados por EVEC (Anselmo-Franci *et al.*, 1999). Axônios de neurônios noradrenérgicos localizados no LC com projeções para o AV3V, poderiam ativar receptores alfa-adrenérgicos em inter-neurônios colinérgicos

que resultaria na liberação de ANP pela ativação de receptores muscarínicos em neurônios hipotalâmicos produtores de ANP (Bastos *et al.*, 2001). Este ANP cerebral, por conseguinte, poderia ativar a liberação de OT e AVP a partir dos neurônios dos núcleos paraventriculares (PVN) e supra-ópticos (SON), que por sua vez, provocariam secreção de ANP atrial resultando em aumento da taxa de filtração glomerular, diurese e natriurese (Soares *et al.*, 1999; Haanwinckel *et al.*, 1995 ; Ventura *et al.*, 2002; Durlo *et al.*, 2004). Outros trabalhos mostraram que a redução na secreção de AVP por neurônios do SON e PVN é modulada pela ativação dos neurônios GABAérgicos presentes na região perinuclear do SON e na banda diagonal de Broca (Grindstaff & Cunningham, 2001; Renaud *et al.*, 1988).

Em suma, neurônios da região do AV3V e dos PVN produtores de ANP, enviam seus axônios até a eminência mediana e para o lobo neural da hipófise. A ativação destes neurônios induz a liberação do peptídeo nos vasos do sistema porta (longo e curto) que irrigam a hipófise anterior, média e posterior. Estes neurônios produtores de ANP devem ativar vias descendentes, que ativam vias eferentes ao coração com conseqüente liberação do peptídeo por parte dos cardiomiócitos atriais. Estas vias eferentes ao coração poderiam ser neuroendócrinas ou neurais. Entretanto, ela não deve ser colinérgica uma vez que a secção bilateral dos vagos não bloqueia a liberação do ANP em resposta a EVEC. Fica assim por esclarecer a participação eferente simpática, uma vez que o que se espera é que a EVEC deve aumentar a pressão arterial e diminuir o tônus simpático.

Experimentos mostrando que lesões eletrolíticas e químicas (ácido ibotênico) dos núcleos para-braquiais produziram aumento significativo da ingestão de água. Em animais com depleção de volume do fluido extracelular (Edwards & Johnson, 1991) revelaram a atividade inibidora destes núcleos. Esta inibição poderia ser mediada por vias serotoninérgicas uma vez que aumento da ingestão de solução salina hipertônica foi provocado por metisergida (antagonista serotoninérgico), e diminuição por DOI (agonista serotoninérgico), administrados nos núcleos para-braquiais laterais (Menani *et al.*, 1996) em animais submetidos à depleção de sódio resultante a administração sistêmica de furosemida (natriurético de alça) associada ao captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina. Essa inibição para-braquial prepondera inclusive sob bloqueio serotoninérgico em animais submetidos à sobrecarga oral de sódio (2 M), já que a ingestão basal de solução salina (NaCl 0,3

M) não foi alterada nestas condições experimentais (De Luca *et al.*, 2003). No entanto, a ação inibidora do NPBL resultante da ativação serotoninérgica não foi capaz de interferir na ação inibidora noradrenérgica hipotalâmica e vice-versa, indicando que estas vias podem atuar independentemente (Margatho *et al.*, 2002). Por outro lado, quando o NPBL está sob bloqueio serotoninérgico, a ingestão de solução de NaCl (0,3M) pode ser induzida por administração de carbacol (agonista colinérgico) no AV3V, sugerindo um tônus inibidor serotoninérgico a partir do NPBL sobre vias colinérgicas prosencefálicas (Menani *et al.*, 2002). A ingestão de água inibida pela distensão da junção cava/átrio associada à administração subcutânea de isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) foi atenuada por lesões na região ventrolateral do NPBL sugerindo a existência de comunicação aferente como retroalimentação negativa em simulação de aumento de volume circulante associado à estimulação da atividade simpática (Ohman & Johnson, 1995).

Além do NTS e NPBL o bulbo ventro-lateral (VLM) também é região responsiva a estímulos osmóticos (Hochstenbach *et al.*, 1993). Estudos imunocitoquímicos mostraram que neurônios de núcleos do NTS projetam-se para regiões contendo células noradrenérgicas A1 no bulbo ventro-lateral caudal (Armstrong *et al.*, 1982; Ross *et al.*, 1985) de onde partem projeções para o SON e porção magnocelular do PVN que são ativadas durante a ocorrência de estímulos osmóticos (Sawchenko & Swanson, 1982).

A área postrema (AP) concorre como outra região inibidora da ingestão de sal, pois lesões desta região potenciaram a ingestão de solução salina em animais privados de água (Stricker *et al.*, 2001). Adicionalmente, ratos com lesões da AP apresentaram disfunções osmorreguladoras como incapacidade de secretar AVP e OT e de inibir a ingestão de água e solução hipertônica de NaCl (Curtis *et al.*, 1999; Curtis *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000; Stricker *et al.*, 1997). Por outro lado, lesões seletivas da AP, NTS e NPBL mostraram que podem existir conexões moduladoras seletivas para ingestão de sal ou água, considerando que (1) lesões bilaterais do NPBL resultaram em aumento da ingestão de água após tratamento com isoproterenol; (2) lesões químicas com o ácido ibotênico micro injetado no NPBL esquerdo associada à secção do lado direito da AP resultaram em ingestão exacerbada de água após tratamento com isoproterenol e que (3) apetite seletivo para sódio ocorreu após lesões simultâneas da AP e adjacências do NTS. Estes

dados sugerem que vias inibitórias independentes a partir da AP para o NTS e para o NPBL regulando a ingestão de sal e água, respectivamente, podem estar ocorrendo em segmentos diversos do tronco cerebral.

Como visto vários segmentos tronco-encefálicos participam preponderantemente de uma via de retro-alimentação negativa do balanço de sal e água. Estes achados corroboram com a hipótese de que uma via inibidora noradrenérgica ascendente possa sinalizar restringindo a adição de volume e tonicidade dependente de sódio em situações de sobrecarga hídrica e salina.

### **Regulação Noradrenérgica do Balanço de Sal e Água**

Os primeiros estudos que determinaram ações de transmissores sinápticos nos circuitos que regulam a homeostase dos líquidos corporais foram publicados por Grossman na década de 60. Estes estudos demonstraram que a estimulação colinérgica e noradrenérgica de regiões hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas provocavam um aumento na ingestão de água e alimento.

Por outro lado, outras investigações mostraram que a estimulação colinérgica e angiotensinérgica da região AV3V induziam um rápido aumento na ingestão de água seguida de natriurese em animais saciados (Grossman 1969, Antunes-Rodrigues & McCann 1970, Fitzsimons 1970, Fitzsimons & Stricker 1971). Adicionalmente, evidenciou-se que a injeção intracerebroventricular (icv) de carbacol (agonista colinérgico) resultou em dramática natriurese, caliurese e antidiurese, semelhante aos efeitos observados com a injeção central (icv) de solução salina hipertônica (Dorn & Porter 1970). Estes estudos mostraram que é possível mimetizar respostas fisiológicas ao aumento de osmolalidade no líquido extracelular com a ativação de receptores colinérgicos no hipotálamo, significando que projeções colinérgicas para esta região poderiam representar um componente importante para a regulação do desequilíbrio osmótico.

Estudos subseqüentes mostraram que agonistas e antagonistas colinérgicos e  $\alpha$ -adrenérgicos administrados na área septal, AV3V ou terceiro ventrículo alteravam a resposta natriurética, caliurética e antidiurética estimulada por carbacol (Dorn *et al* 1970, Morris *et al* 1976, Saad *et al* 1975 & 1976, Camargo *et al* 1976 & 1979, Franci *et al* 1980, 1983, Menani *et al* 1984, Rocha *et al* 1985, 1999). Outras

evidências mostraram que a fentolamina, um antagonista  $\alpha$ -adrenérgico, abolia a natriurese estimulada pela microinjeção no terceiro ventrículo de solução salina hipertônica, norepinefrina ou carbacol. Adicionalmente, a administração de isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico, resultou em redução da excreção renal de sódio e potássio, efeito inverso obtido pela administração isolada de propanolol, um  $\beta$ -bloqueador, que também potenciou a resposta natriurética quando associado ao carbacol. O bloqueio colinérgico com atropina diminuiu a resposta a norepinefrina e suprimiu a resposta natriurética a salina hipertônica (Morris *et al* 1976 & 1977, Perez *et al* 1984).

Estudos com a administração no hipotálamo lateral e área septal lateral de compostos noradrenérgicos mostraram aumento da excreção renal de sódio e potássio em ratos (Pillar *et al.*, 1977; Camargo *et al.*, 1976). Efeitos similares foram obtidos após a administração de carbacol no LC, efeitos estes que foram abolidos pela administração prévia de atropina (De Luca Jr. *et al.*, 1990). Os autores sugeriram que esta ação colinérgica poderia estar ocorrendo pela ativação de receptores muscarínicos presentes em neurônios noradrenérgicos do LC.

Outra via alternativa para atividade noradrenérgica relacionada ao balanço hidrossalino pode envolver projeções a partir de grupos de células A2 do complexo dorsal do vago e neurônios A1 do bulbo ventro lateral que se projetam para o órgão subfornicial (SFO) (Ciriello *et al.*, 1996; Kawano e Masuko, 2001). Esta via pode interferir na atividade angiotensinérgica que por sua vez regularia níveis de noradrenalina no hipotálamo lateral relacionados ao comportamento de ingestão de água (Tanaka *et al.*, 2003).

O papel preciso da noradrenalina hipotalâmica no controle da diurese associada à liberação de AVP ainda está por ser esclarecido pelo fato de terem sido descritos efeitos contraditórios (Leng *et al.*, 1999). Os efeitos noradrenérgicos centrais que resultam em aumentos na secreção de AVP circulante é sítio específico localizado no PVN e SON (Leibowitz *et al.*, 1990, Morris *et al.*, 1994, Nakamura *et al.*, 1992, Qualy & Westfall, 1988). A ativação LC-PVN pela via noradrenérgica ascendente resultaram em aumento da liberação de NA no PVN induzida por hemorragia sistêmica (Morris *et al.*, 1994). Entretanto, existem relatos de que, em

outras condições experimentais, a NA pode inibir a liberação de AVP e OT a partir de células do PVN de ratas lactantes (Honda *et al.*, 1985).

Uma via alternativa poderia ser aquela na qual os axônios de neurônios noradrenérgicos localizados no LC com projeções para o AV3V, ativariam receptores  $\alpha$ -adrenérgicos em interneurônios colinérgicos que determinariam a liberação de ANP pela ativação de receptores muscarínicos em neurônios hipotalâmicos produtores de ANP (Bastos *et al.*, 2001). Este ANP então poderia ativar a liberação de OT a partir do cérebro, que por sua vez, provocaria secreção de ANP atrial resultando em aumento da taxa de filtração glomerular e natriurese (Haanwinckel *et al.*, 1995).

Em suma, estas evidências apontam para a participação de um sistema regulador noradrenérgico hipotético, eminentemente inibidor, que se organizaria a partir de projeções medulares e tronco-encefálicas para o hipotálamo, onde poderia atuar de forma seletiva inibindo sinalizações para a ingestão e estimulando sinalizações para excreção de água e eletrólitos. Este sistema poderia atuar como uma retro-alimentação negativa a partir de aferências que sinalizam aumentos de volume e concentração de sódio circulante. No entanto, muitas questões sobre a participação de vias noradrenérgicas tronco-encefálicas nesta regulação mantêm-se em aberto.

A temática será abordada com experimentos que envolvem o SNC, principalmente estruturas hipotalâmicas (SON, PVN e EM) e do tronco cerebral (NTS, RVLM e LC) além do NDR, através de estudos imunocitoquímicos, e determinações de catecolaminas (AD, NA, DA e 5-HT), procurando conhecer as alterações destes parâmetros em condições experimentais nas quais são induzidas alterações do volume do líquido extracelular.

Assim, este projeto tem por objetivo geral dar seqüência aos estudos que vêm sendo por nós desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa visando estabelecer os principais mecanismos neuroendócrinos envolvidos na manutenção da homeostase hidroeletrolítica, principalmente aqueles que participam do controle da ingestão e/ou excreção de água e eletrólitos. Esforços serão realizados no sentido de se estabelecer a importância relativa da participação simpática do sistema nervoso

central (SNC) no controle da liberação do ANP, OT e AVP, correlacionando o conteúdo de noradrenalina, adrenalina, dopamina e serotonina no núcleo do trato solitário (NTS), bulbo rostro-ventro lateral (RVLM), locus coeruleus (LC) e núcleo dorsal da rafe (NDR) e os padrões de ativação neuronal para TH e 5-HT nestas regiões em condições de contração ou expansão de volume sanguíneo.

## **2. OBJETIVOS**

---

Como objetivo geral este trabalho visa correlacionar o conteúdo de noradrenalina e dopamina no NTS, RVLM, LC, EM, SON e no PVN, além do conteúdo de serotonina no NDR com a ativação neuronal induzida pela expansão de volume do líquido extracelular (EVEC).

De maneira mais específica, este trabalho objetiva avaliar os efeitos da expansão de volume extracelular (isotônica e hipertônica) sobre:

1. O conteúdo de noradrenalina e dopamina na EM, SON, PVN, NTS, RVLM e LC.
2. A ativação neuronal na EM, SON, PVN, NTS, RVLM e LC através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com TH.
3. As concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina.
4. O conteúdo de serotonina e seu metabólito (5-HIAA) no NDR.
5. A ativação neuronal no NDR através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com serotonina.

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---

### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 220-280g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas 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). Após a habituação dos animais por, pelo menos, 72 horas, os mesmos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e divididos em diferentes grupos experimentais.

Em todos os experimentos os animais foram submetidos a procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob o protocolo nº 039/2004.

Os 126 animais utilizados foram assim distribuídos de acordo com os protocolos experimentais: Para determinação do conteúdo de noradrenalina, dopamina, 5-HT e 5-HIAA: grupo SEM EVEC - 14 animais; submetidos à EVEC isotônica decapitados aos 5 e 15 minutos – 10 e 9 animais, respectivamente; submetidos à EVEC hipertônica decapitados aos 5 e 15 minutos – 10 animais em cada grupo. Para determinação da concentração plasmática de noradrenalina e adrenalina: grupo SEM EVEC - 8 animais; submetidos à EVEC isotônica decapitados aos 5 e 15 minutos – 7 e 8 animais, respectivamente; submetidos à EVEC hipertônica decapitados aos 5 e 15 minutos – 8 animais em cada grupo. Para imunistoquímica: Fos-TH no PVN, grupo SEM EVEC - 4 animais; submetidos à EVEC isotônica e hipertônica – 5 animais em cada grupo; Fos-TH no NTS, grupo SEM EVEC - 3 animais; submetidos à EVEC isotônica – 7 animais; submetidos à EVEC hipertônica – 3 animais em cada grupo; Fos-TH no RVLM, grupo SEM EVEC - 3 animais; submetidos à EVEC isotônica – 7 animais; submetidos à EVEC hipertônica – 6 animais em cada grupo; Fos-TH no LC, grupo SEM EVEC - 3 animais; submetidos à EVEC isotônica – 4 animais; submetidos à EVEC hipertônica – 4 animais em cada grupo; Fos-5-HT no NDR, grupo SEM EVEC - 4 animais; submetidos à EVEC isotônica – 5 animais; submetidos à EVEC hipertônica – 5 animais em cada grupo.

## **3.2. CIRURGIA**

### **3.2.1. 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 2,2,2-tribromoetanol (Sigma, 2,5%, 1ml/100g de peso corporal, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 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 contendo heparina na proporção 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*.

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

No dia do experimento, antes de iniciar o procedimento de expansão de volume, as cânulas foram lavadas com um volume mínimo (aproximadamente 100 $\mu$ l) de salina isotônica contendo heparina (1:40), a fim de testar se estavam corretamente posicionadas e p $\acute{e}$ rveas. A EVEC foi realizada por meio de infusão endovenosa (volume de 2ml/100g de peso corp $\acute{o}$ reo) de solução de NaCl hipertônica (0,3M) ou isotônica (0,15M), mantida a 37 $^{\circ}$ C, a qual foi administrada durante o período de um minuto. Foram considerados controles os animais nos quais foram realizados os mesmos procedimentos, porém sem EVEC.

### **3.4. IMUNOISTOQUÍMICA**

Noventa minutos após a indução da EVEC e conforme os protocolos estabelecidos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1ml/100g de peso corporal, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e, a seguir, perfundidos através de punção intracardíaca com solução de NaCl 0,15M contendo heparina (Liquemine, Roche, 500UI/l), seguida de uma solução de tampão fosfato (pH 7,2) contendo paraformaldeído 4%. A seguir, os cérebros foram removidos e mergulhados novamente em paraformaldeído 4%, para pós-fixação. Depois de 4

horas, eles foram colocados em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 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). Imediatamente após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol 10% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e também o bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se soro normal de cavalo (10%) ou albumina bovina (5%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), ambos diluídos em PB 0,1M.

Posteriormente, para visualização da expressão da proteína Fos, os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 12-14 horas com o anticorpo primário anti-c-fos (Ab-5, Calbiochem, 1:10000, nº cat. PC38) e, a seguir, incubados com o segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) à concentração de 1:200 por um período de 1 hora. Para a coloração, foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), empregando diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sulfato de níquel 1% e cloreto de cobalto 0,5% como cromógenos, cuja reação conferiu ao núcleo das células neuronais uma coloração de violeta escuro a preto.

Logo após a imunomarcção para Fos, foram realizados os procedimentos imunistoquímicos para o estudo de sua possível co-localização com TH e 5-HT. Para tanto, os cortes foram primeiramente incubados com anticorpos anti-TH (mouse, Chemicon International, nº cat MAB318, 1:1000) ou anti-5-HT (rabbit, ImmunoStar Inc. nº cat 20080, 1:10.000) por mais um período de 48 horas a 4°C e, em seguida, incubados com o segundo anticorpo biotilado respectivo (anti-mouse ou anti-rabbit, ambos da Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200). Após este procedimento, os cortes foram incubados por mais uma hora na solução ABC. A coloração foi realizada utilizando-se somente o complexo DAB como cromógeno, cuja reação conferiu ao citoplasma da célula uma coloração marrom.

Ao término dos procedimentos acima descritos, os cortes foram montados utilizando-se gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%) e a seguir secados a temperatura ambiente, desidratados com xileno e cobertos com o meio de montagem. A visualização microscópica do tecido permitiu a análise do padrão espacial de imunomarcção por meio de um sistema de videomicroscopia. As imagens foram capturadas por meio de uma câmera de vídeo de alta resolução

Leica DC 200, acoplada a um microscópio Leica 200, e transmitidas a um computador dotado de um programa digitalizador e quantificador de imagens (IM50, Videoblaster/ScionImage, NIH), de forma a determinar o número de neurônios imunorreativos a Fos bem como aqueles que apresentam dupla marcação com TH ou 5-HT. A contagem de células duplamente marcada foi feita manualmente com base em critérios individuais de contagem (intensidade da coloração nuclear ou citoplasmática, visualização no mesmo plano, delimitação dos componentes celulares) e em todos os animais de cada grupo experimental e repetida ao menos duas vezes em cada seção analisada através de contagem cega, ou seja, sem o conhecimento dos protocolos experimentais. Seções representativas de cada grupo experimental foram obtidas no mesmo nível através do uso de programa de análise de imagem Adobe Photoshop versão 5.5. Os valores são expressos em número de células imunorreativas a Fos-TH ou Fos-5-HT nos núcleos analisados.

A delimitação dos núcleos cerebrais de interesse foi realizada com base nas coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1997), representadas na figuras em anexo. A EM e o NOS foram retirados cirurgicamente e para as demais estruturas foram utilizadas as seguintes coordenadas: PVN -0,80 mm a -2,12 mm, NDR -7,30 mm a -8,3 mm; LC -9.16 mm a -10,04 mm; RVLM -11.96 mm a -12,80 mm; NTS -13,68 mm a -14,60 mm em relação ao bregma.

### **3.5. RETIRADA DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS PARA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CATECOLAMINAS**

Após a indução ou não da EVEC conforme os protocolos estabelecidos os animais foram decapitados, os cérebros rapidamente removidos e retirados cirurgicamente a EM e SON, após isto, os cérebros foram imediatamente congelados em gelo seco. Estes foram seccionados em cortes de aproximadamente 900µm de espessura, utilizando-se um criostato (Microm – HM500 OM). O NTS, RVLM, LC e NDR foram coletados com auxílio de uma agulha com diâmetro interno de 1,5 mm e com diâmetro externo de 2 mm, enquanto o PVN foi retirado com auxílio de uma agulha com diâmetro interno de 2 mm e externo de 3 mm. A delimitação dos núcleos cerebrais de interesse foi realizada com base nas

coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1997), representadas nas figuras em Anexo.

### **3.6. MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE CATECOLAMINAS NO PLASMA E TECIDO CEREBRAL**

#### **3.6.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Após a decapitação dos animais o sangue foi coletado em tubos heparinizados sob gelo e o plasma foi separado por centrifugação (20 minutos, 1,09g, 4°C). Alíquotas de 1ml de plasma foram transferidas para tubos plásticos contendo 100mg de metabissulfito de sódio (antioxidante), tampão TRIS-HCl 2M (pH 8,9) com 0,5% de metabissulfito de sódio e 2,5% de EDTA e 100mg de alumina previamente ativada em estufa a 100°C, por meia hora. Foi utilizado 40µl de diidroxibenzilamina (20ng) como padrão interno. As amostras foram então agitadas durante 20 minutos, centrifugadas e após aspiração do sobrenadante a alumina foi lavada repetidamente. As catecolaminas foram extraídas da alumina pela adição de solução eluidora contendo ácido perclórico 0,1N, com metabissulfito de sódio 1% e EDTA 1mM sob agitação de 10 minutos (Krustulovic, 1982). As concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina foram expressas em ng/ml.

Para determinação do conteúdo de catecolaminas no tecido cerebral, os núcleos foram homogeneizados em 200µl de ácido perclórico 0,1N, contendo metabissulfito de sódio 1% e EDTA 1mM. Foi utilizado 8µl de diidroxibenzilamina (4ng) como padrão interno. O homogenato foi centrifugado a 10.000g, a 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi então analisado. Alíquotas do homogeneizado foram retiradas para posterior determinação protéica. Os valores de conteúdo de catecolaminas nos tecidos cerebrais foram expressos em µg/µg de proteína.

#### **3.6.2. SOLUÇÕES PADRÕES E PADRÃO INTERNO**

O diidroxibenzilamina foi utilizado como padrão interno uma vez que não está presente nos fluidos ou tecidos biológicos, além de ser capaz de sofrer reações de oxidação semelhante às catecolaminas e servindo também como controle do

processo de extração das amostras. Soluções estoques de diidroxibenzilamina, noradrenalina, dopamina, adrenalina, serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético foram feitas na concentração de 5mg/100ml em solução eluidora, sendo armazenadas a -80°C. Todos os padrões utilizados foram obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

### **3.6.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**

Com auxílio de auto-injetor SIL-10AF (Shimadzu) alíquotas de 50µl obtidas como descrito anteriormente, foram analisadas em um cromatógrafo modelo LC-10A (Shimadzu) equipado com coluna de fase reversa Spherisorb ODS II C<sub>18</sub> revestida com micro partículas de 5µm de diâmetro (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e com eletrodo em placa de carbono, ambos armazenados em forno modelo CTO-10A (Shimadzu) com temperatura estabelecida de 40°C. Acoplado ao cromatógrafo, um detector eletroquímico modelo L-ECD-10A (Shimadzu Instruments, Duisburg, Germany) conectado a uma unidade integradora CBM -10A (Shimadzu Instruments, Duisburg, Germany) e a um microcomputador com o software Class - LC10 versão 1.64A / 3.86 (Shimadzu).

A fase móvel era composta por 250ml de tampão fosfato de sódio (70mM) contendo ácido 1-octanosulfônico (3mM) e EDTA (0,2mM) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico, 225ml de água degaseificada e purificada pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) e 25ml de metanol. A fase móvel era impulsionada por uma bomba (modelo LC-10AD, Shimadzu) em fluxo constante de 1,0ml/min. O potencial do eletrodo de trabalho era de 75mV. O percentual de recuperação atingido tanto para o plasma quanto para os tecidos cerebrais foi de 70-75%. Os tempos de retenção das substâncias analisadas encontram-se no cromatograma em anexo.

### **3.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NO TECIDO**

Após a homogeneização dos núcleos cerebrais, alíquotas de 10µl do homogenato foram utilizadas para dosagem de proteína pelo método colorimétrico de Bradford (1976). Todas as leituras foram realizadas utilizando-se fotocolorímetro

(Microplate reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) com comprimento de onda de 595nm. O conteúdo de proteína tissular foi expresso em  $\mu\text{g}$ .

### **3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram expressos em médias  $\pm$  EPM. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA uma via, seguido do teste de Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$

#### ***4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL***

---

#### **4.1. EXPERIMENTO I:**

*Para avaliar os efeitos da EVEC sobre o conteúdo de noradrenalina e dopamina na EM, SON, PVN, NTS, RVLM, LC.*

Foram utilizados neste experimento animais que tiveram a veia jugular canulada, 24 horas antes da EVEC. Cinco ou quinze minutos após a indução da EVEC hipertônica ou isotônica, os animais foram decapitados, os cérebros retirados e a EM e SON foram coletados cirurgicamente. Após esta coleta os cérebros foram rapidamente congelados em gelo seco e o PVN, NTS, RVLM e LC foram coletados como já descrito anteriormente para a determinação do conteúdo de noradrenalina e dopamina.

#### **4.2. EXPERIMENTO II:**

*Para avaliar os efeitos da EVEC sobre a ativação neuronal na EM, SON, PVN, NTS, RVLM e LC através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com TH.*

Na realização deste protocolo experimental foram utilizados animais portadores de cânulas na veia jugular externa. Noventa minutos após a EVEC, eles foram anestesiados, perfundidos e processados segundo a técnica descrita anteriormente para a imunomarcação da proteína Fos e sua eventual co-localização com TH.

#### **4.3. EXPERIMENTO III:**

*Para avaliar os efeitos da EVEC sobre as concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina.*

Os animais utilizados neste experimento estiveram sob as mesmas condições experimentais descritas no protocolo experimental I. Cinco ou quinze minutos após a indução da EVEC hipertônica ou isotônica, os animais foram decapitados e o sangue coletado em tubos, mantidos sob gelo, contendo heparina para posterior determinação do conteúdo de noradrenalina e adrenalina.

#### **4.4. EXPERIMENTO IV:**

*Para avaliar os efeitos da EVEC sobre o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA NDR.*

Os animais utilizados nestes experimentos estiveram sob as mesmas condições experimentais descritas no protocolo experimental I. Cinco ou quinze minutos após a indução da EVEC hipertônica ou isotônica, os animais foram decapitados os cérebros retirados e rapidamente congelados em gelo seco e o NDR coletado como já descrito anteriormente para a determinação do conteúdo de 5-HT e 5-HIAA.

#### **4.5. EXPERIMENTO V:**

*Para avaliar os efeitos da EVEC sobre a ativação neuronal no NDR através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com 5-HT.*

Na realização deste protocolo experimental foram utilizados animais portadores de cânulas na veia jugular externa. Noventa minutos após a EVEC, eles foram anestesiados, perfundidos e processados segundo a técnica descrita anteriormente para a imunomarcagem da proteína Fos e sua eventual co-localização com 5-HT.

**5. RESULTADOS**

---

## 5.1. EXPERIMENTO I:

*Os efeitos da EVEC sobre o conteúdo de noradrenalina e dopamina na EM, SON, PVN, NTS, RVLM, LC.*

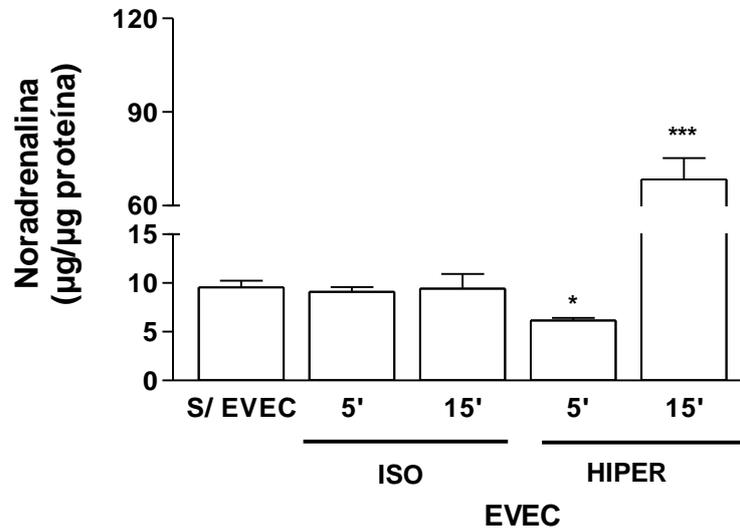
As figuras 1.1 a 1.3 mostram os valores do conteúdo total de noradrenalina e dopamina quantificado na EM, SON e PVN após EVEC isotônica ou hipertônica em diversos tempos.

O conteúdo de noradrenalina (A) e dopamina (B) na EM (figura 1.1) diminuiu em resposta a EVEC hipertônica aos 5 minutos e aumentou aos 15 minutos sem alteração dos valores nos demais grupos quando comparados ao grupo não expandido. ( $9,60 \pm 0,70$  vs  $6,20 \pm 0,30$  aos 5 min,  $p < 0,05$  e  $9,60 \pm 0,70$  vs  $68,40 \pm 6,90$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para noradrenalina e  $12,80 \pm 1,00$  vs  $8,40 \pm 0,40$  aos 5 min,  $p < 0,05$  e  $12,80 \pm 1,00$  vs  $93,20 \pm 8,70$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para dopamina).

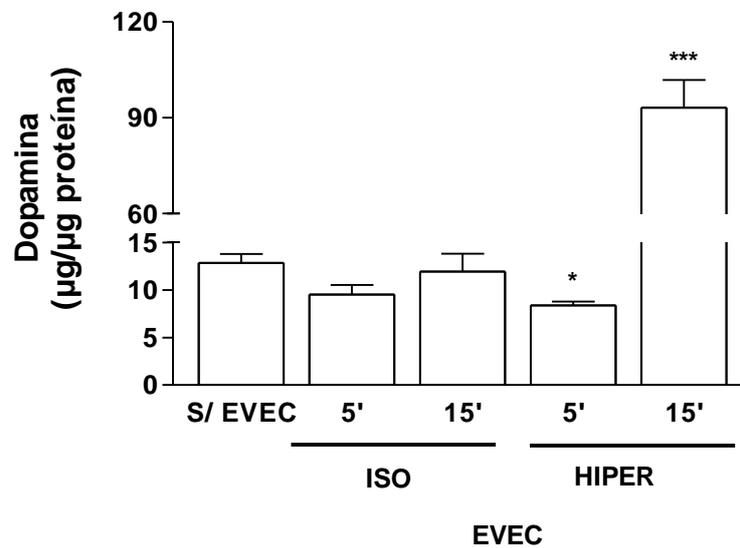
Os valores de noradrenalina (figura 1.2 A) no SON não foram alterados em resposta a EVEC (isotônica ou hipertônica) em nenhum dos tempos avaliados. Quanto a dopamina (figura 1.2 B) houve diminuição significativa nos grupos com expansão isotônica ( $6,90 \pm 0,80$  vs  $0,80 \pm 0,10$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $6,90 \pm 0,80$  vs  $0,40 \pm 0,10$  aos 15 min,  $p < 0,001$ ) e hipertônica ( $6,90 \pm 0,80$  vs  $3,90 \pm 0,30$  aos 5 min,  $p < 0,001$ ) em relação ao controle (sem EVEC).

O conteúdo de noradrenalina no PVN (figura 1.3 A) diminuiu significativamente em resposta a expansão de volume isotônica ( $12,10 \pm 1,30$  vs  $4,10 \pm 0,50$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $12,10 \pm 1,30$  vs  $6,30 \pm 0,60$  aos 15 min,  $p < 0,001$ ) e hipertônica ( $12,10 \pm 1,30$  vs  $5,90 \pm 0,30$  aos 5 min,  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo que não sofreu expansão. Sobre o conteúdo de dopamina no PVN (figura 1.3 B), houve diminuição significativa nos valores do grupo EVEC isotônica ( $1,80 \pm 0,30$  vs  $0,50 \pm 0,0$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $1,80 \pm 0,30$  vs  $0,70 \pm 0,10$  aos 15 min,  $p < 0,001$ ) e aumento significativo no grupo EVEC hipertônica ( $1,80 \pm 0,30$  vs  $2,40 \pm 0,30$  aos 5 min,  $p < 0,01$  e  $1,80 \pm 0,30$  vs  $6,90 \pm 0,60$  15 min,  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo não submetido à EVEC.

A

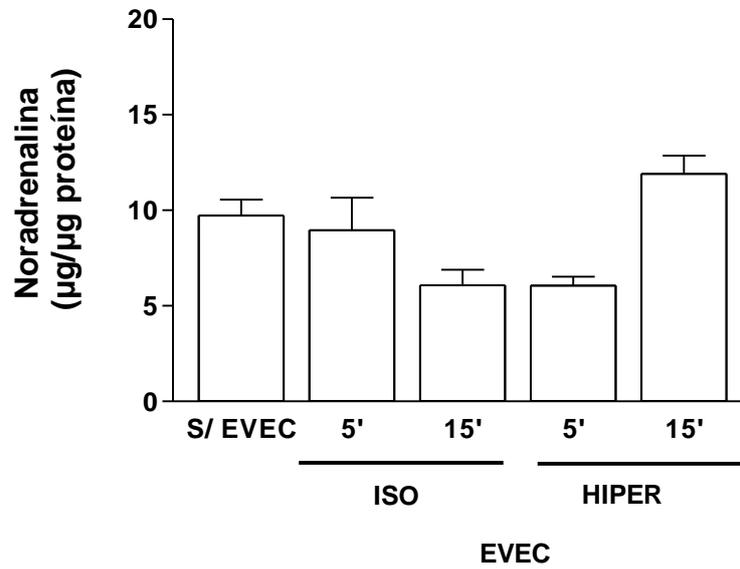


B

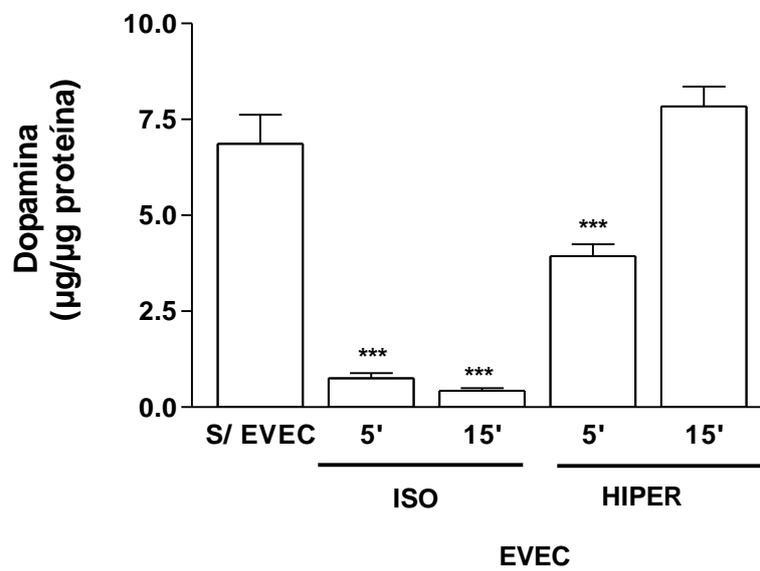


**Figura 1.1** – Conteúdo total de NA (A) e DA (B) na EM após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (sem EVEC). O grupo controle possui 14 animais e os demais grupos experimentais de 9 – 10 animais.

A

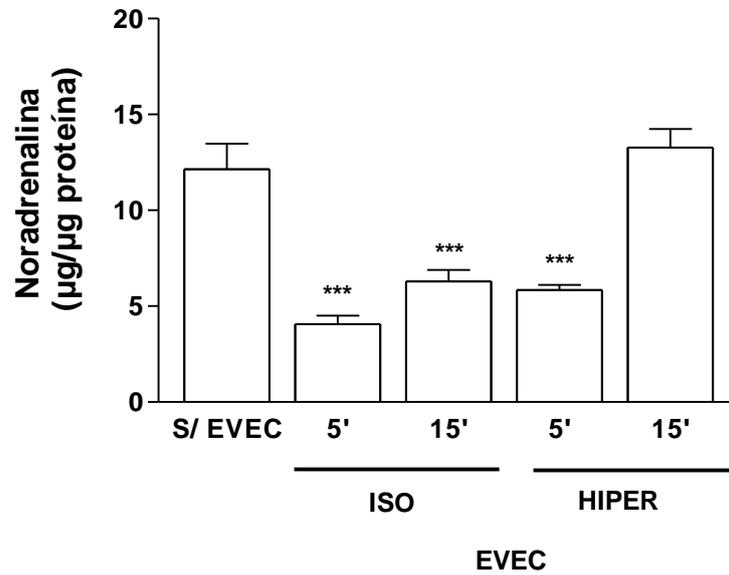


B

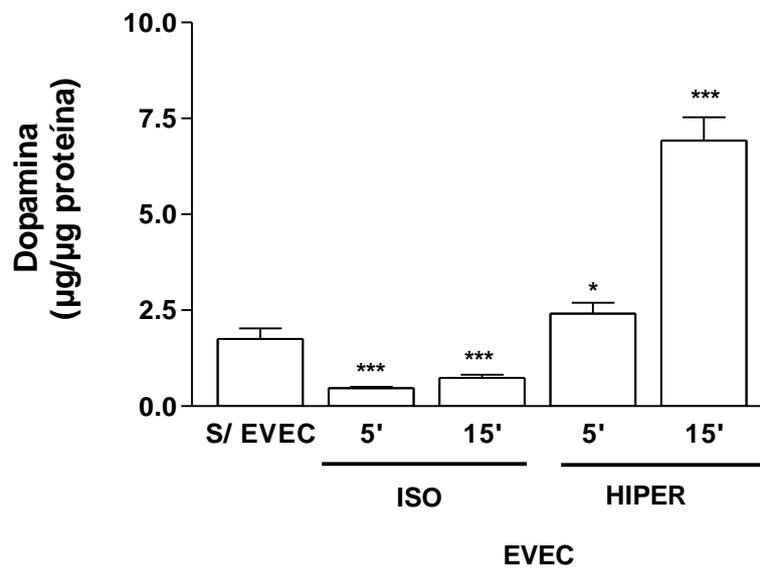


**Figura 1.2** – Conteúdo total de NA (A) e DA (B) no SON após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (sem EVEC). O grupo controle possui 14 animais e os demais grupos experimentais de 9 – 10 animais.

A



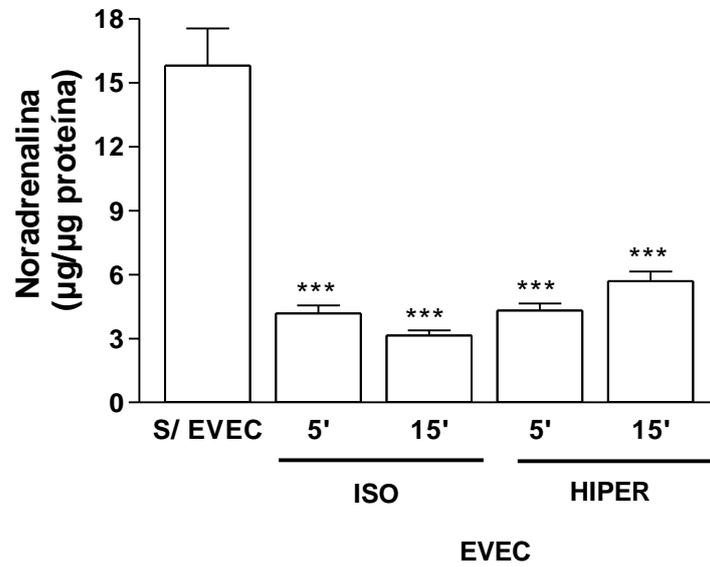
B



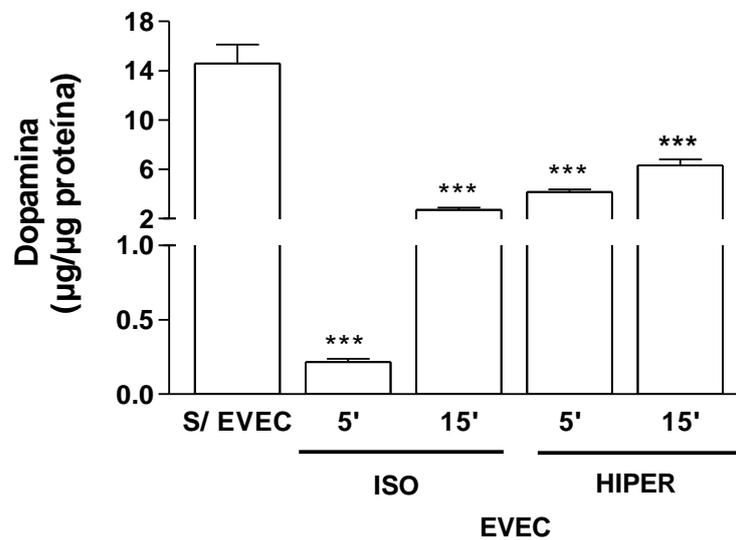
**Figura 1.3** – Conteúdo total de NA (A) e DA (B) no PVN após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (sem EVEC). O grupo controle possui 14 animais e os demais grupos experimentais de 9 – 10 animais.

Os dados apresentados na figura 1.4 mostram que a EVEC promoveu diminuição significativa no conteúdo total de noradrenalina (A) e dopamina (B) no NTS quando comparados os grupos controle (sem expansão) e expandido, tanto para EVEC isotônica (15,80±1,73 vs 4,18±0,38 aos 5 min,  $p<0,001$  e 15,80±1,73 vs 3,15±0,24 aos 15 min,  $p<0,001$  para noradrenalina e 14,60±1,52 vs 0,22±0,02 aos 5 min,  $p<0,001$  e 14,60±1,52 vs 2,72±0,17 aos 15 min,  $p<0,001$  para dopamina) quanto hipertônica (15,80±1,73 vs 4,31±0,33 aos 5 min,  $p<0,001$  e 15,80±1,73 vs 5,70±0,44 aos 15 min,  $p<0,001$  para noradrenalina e 14,60±1,52 vs 4,16±0,20 aos 5 min,  $p<0,001$  e 14,60±1,52 vs 6,31±0,51 aos 15 min,  $p<0,001$  para dopamina) em todos os tempos analisados.

A



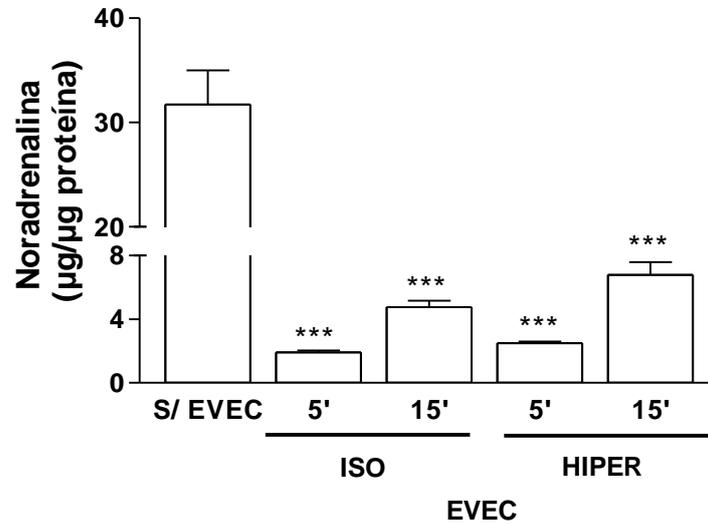
B



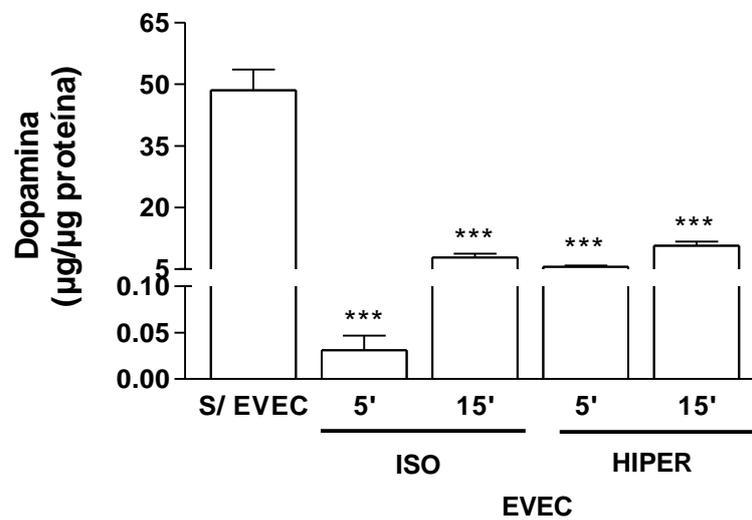
**Figura 1.4** – Conteúdo total de NA (A) e DA (B) no NTS após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (sem EVEC). O grupo controle possui 14 animais e os demais grupos experimentais de 9 – 10 animais.

Como pode ser observado na figura 1.5, a EVEC induziu diminuição significativa do conteúdo de noradrenalina (A) e dopamina (B) no RVLM analisando-se os grupos EVEC isotônica ( $31,73 \pm 3,28$  vs  $1,92 \pm 0,12$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $31,73 \pm 3,28$  vs  $4,77 \pm 0,40$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para noradrenalina e  $48,53 \pm 5,01$  vs  $0,03 \pm 0,01$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $48,53 \pm 5,01$  vs  $7,85 \pm 0,91$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para dopamina) e EVEC hipertônica ( $31,73 \pm 3,28$  vs  $2,50 \pm 0,11$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $31,73 \pm 3,28$  vs  $6,78 \pm 0,80$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para noradrenalina e  $48,53 \pm 5,01$  vs  $5,60 \pm 0,26$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $48,53 \pm 5,01$  vs  $10,71 \pm 1,00$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para dopamina) em relação ao grupo não expandido em todos os tempos avaliados.

A



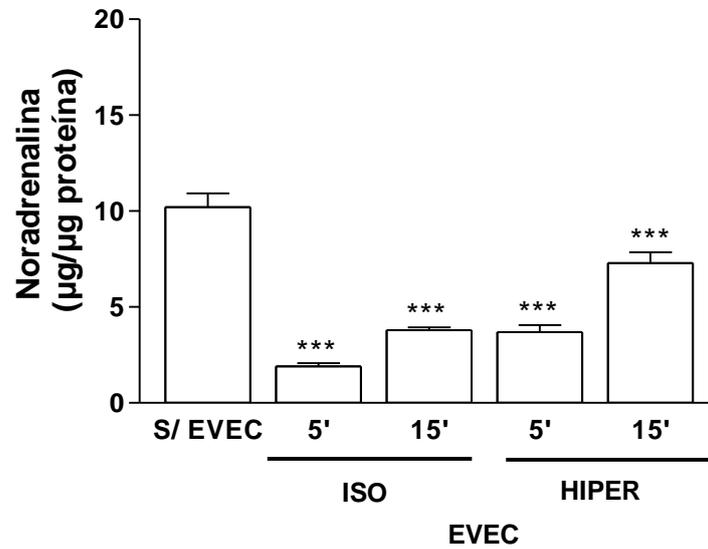
B



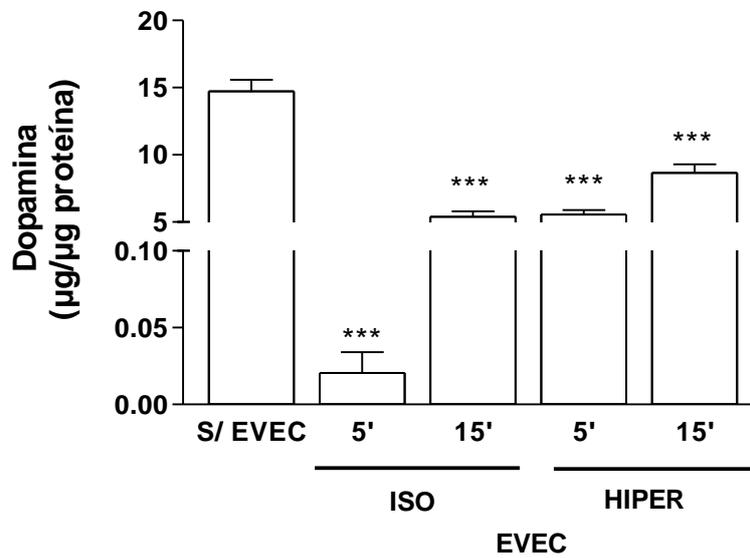
**Figura 1.5** – Conteúdo total de NA (A) e DA (B) no RVLM após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (sem EVEC). O grupo controle possui 14 animais e os demais grupos experimentais de 9 – 10 animais.

O gráfico abaixo (figura 1.6) mostra que o conteúdo total de noradrenalina (A) e dopamina (B) no LC diminuiu significativamente em resposta a EVEC isotônica ( $10,22 \pm 0,71$  vs  $1,90 \pm 0,18$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $10,22 \pm 0,71$  vs  $3,79 \pm 0,15$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para noradrenalina e  $14,72 \pm 0,86$  vs  $0,02 \pm 0,01$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $14,72 \pm 0,86$  vs  $5,40 \pm 0,40$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para dopamina) e hipertônica ( $10,22 \pm 0,71$  vs  $3,69 \pm 0,37$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $10,22 \pm 0,71$  vs  $7,29 \pm 0,57$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para noradrenalina e  $14,72 \pm 0,86$  vs  $5,56 \pm 0,33$  aos 5 min,  $p < 0,001$  e  $14,72 \pm 0,86$  vs  $8,65 \pm 0,64$  aos 15 min,  $p < 0,001$  para dopamina) em todos os tempos estudados quando comparados os grupos sem EVEC (controle) *versus* EVEC.

A



B

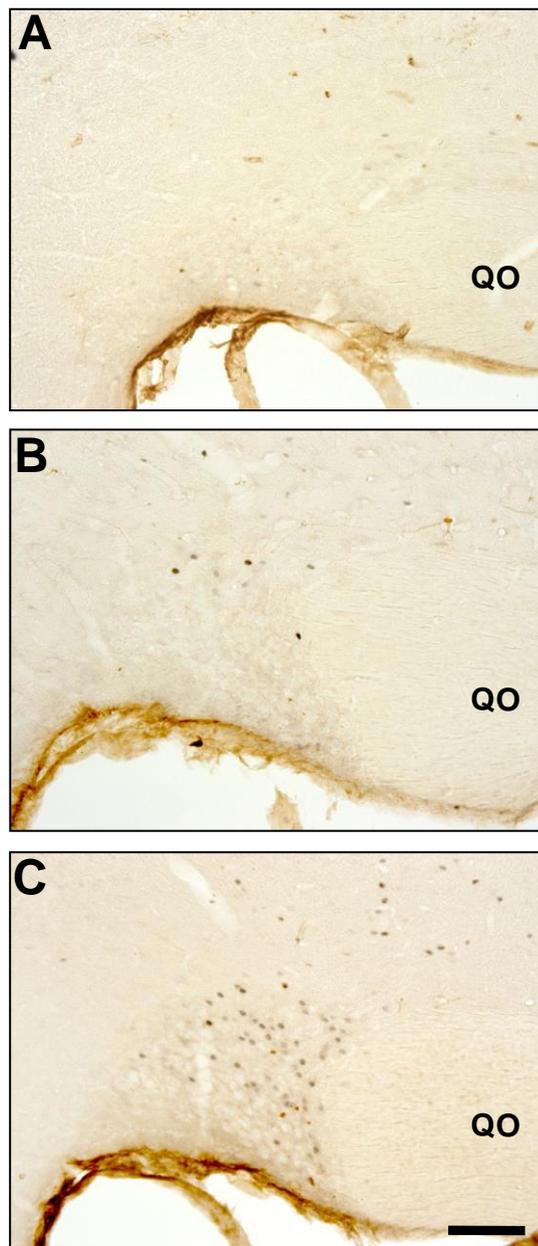


**Figura 1.6** – Conteúdo total de NA (A) e DA (B) no LC após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (sem EVEC). O grupo controle possui 14 animais e os demais grupos experimentais de 9 – 10 animais.

## 5.2. EXPERIMENTO II:

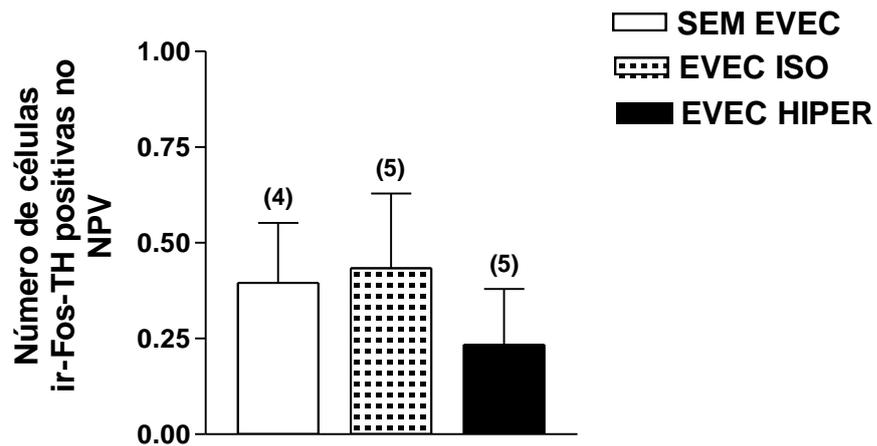
*Os efeitos da EVEC sobre a ativação neuronal na EM, SON, PVN, NTS, RVLM e LC através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com TH.*

Como demonstrado na figura 2.1 não houve duplas marcações Fos-TH no SON em nenhum dos grupos analisados. Como podemos verificar nesta figura houve apenas aumento das marcações para Fos em resposta a EVEC isotônica e hipertônica. Estas marcações para Fos observadas em resposta a EVEC estão de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores realizados no nosso laboratório em que se analisou usando este mesmo modelo, duplas marcações Fos-OT (Ruginsk *et al*, 2007). Os resultados aqui obtidos confirmam os resultados que o SON é desprovido de neurônios TH.

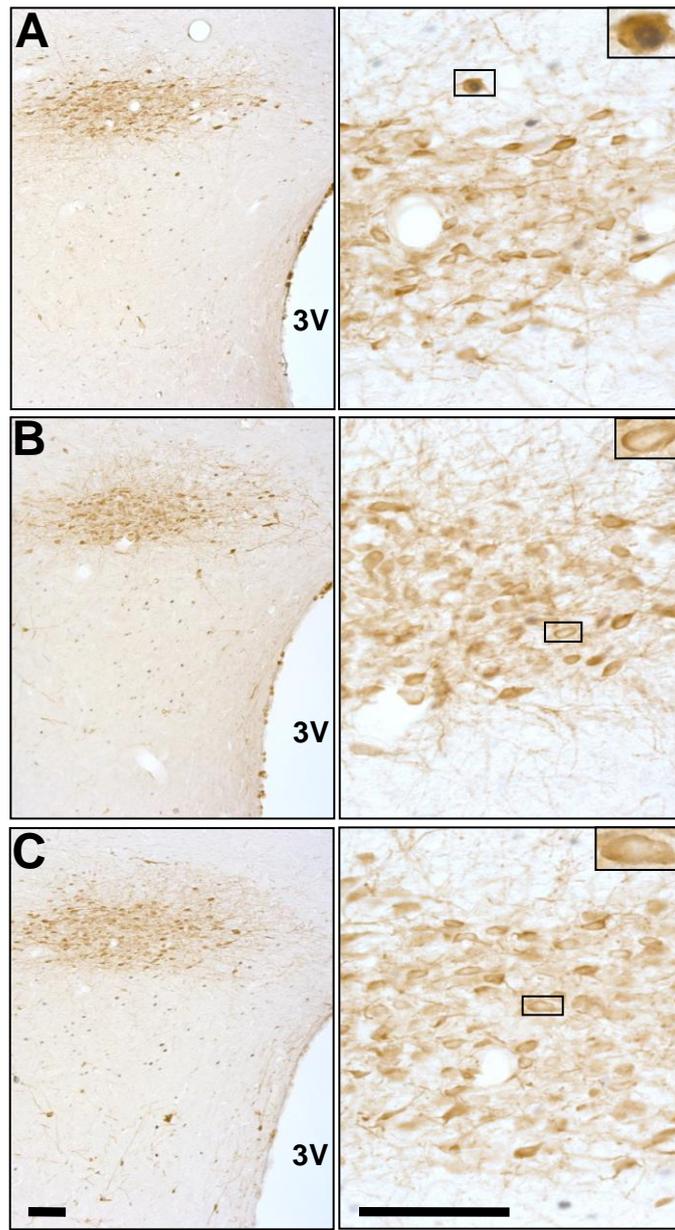


**Figura 2.1** - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no SON. **A:** sem EVEC; **B:** EVEC isotônica; **C:** EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. QO, quiasma óptico. Escala: 100  $\mu$ m.

Como pode ser observado nas figuras 2.2 e 2.3, tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica não induziram alteração significativa no número de duplas marcações fos-TH no PVN (porção posterior) em relação ao grupo não submetido à EVEC.



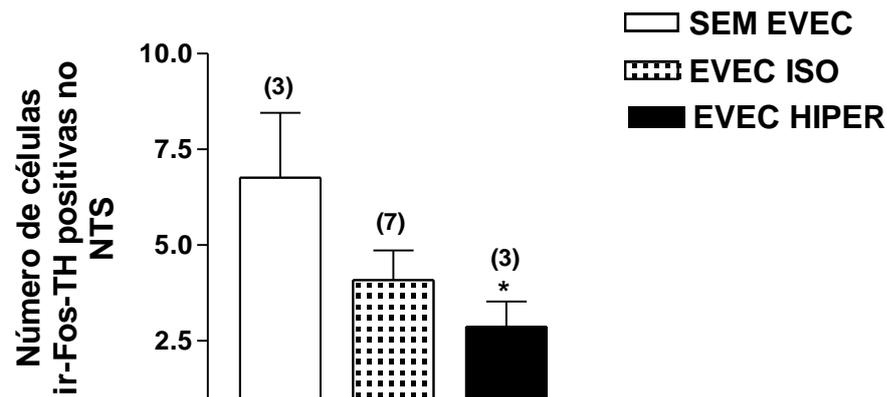
**Figura 2.2** – isotônica e número de duplamente TH) na do PVN. Os expressos O número de em cada experimental expresso acima das



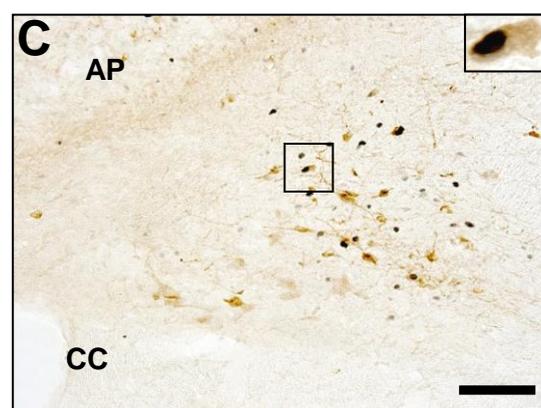
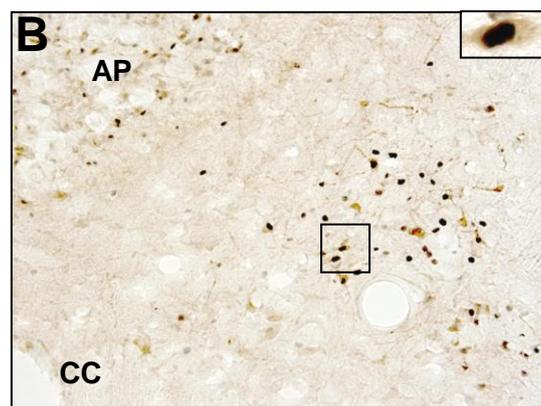
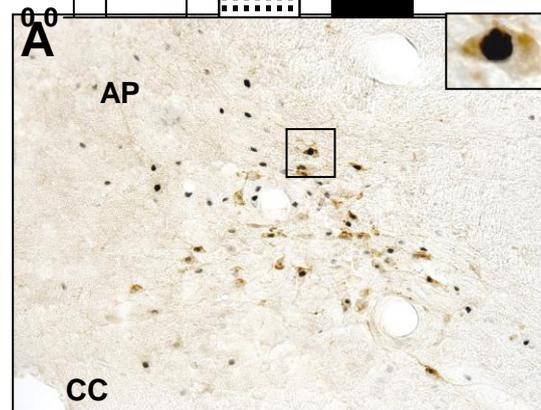
Efeitos da EVEC hipertônica sobre o células marcadas (ir Fos- porção posterior valores são em médias ± EPM. animais utilizados grupo encontra-se entre parênteses barras.

**Figura 2.3** - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no PVN. **A:** sem EVEC; **B:** EVEC isotônica; **C:** EVEC hipertônica. As figuras estão em aumento de 10X e 40X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas estão em destaque no canto superior direito (aumento de 100X). 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100 µm.

Nas figuras 2.4 e 2.5 estão ilustrados os número de duplas marcações fos-TH no NTS adjacente à área postrema (NTS-AP). A EVEC hipertônica induziu diminuição significativa do número de duplas marcações em relação ao grupo não expandido ( $6,77 \pm 1,69$  vs  $2,87 \pm 0,66$ ,  $p < 0,05$ ).



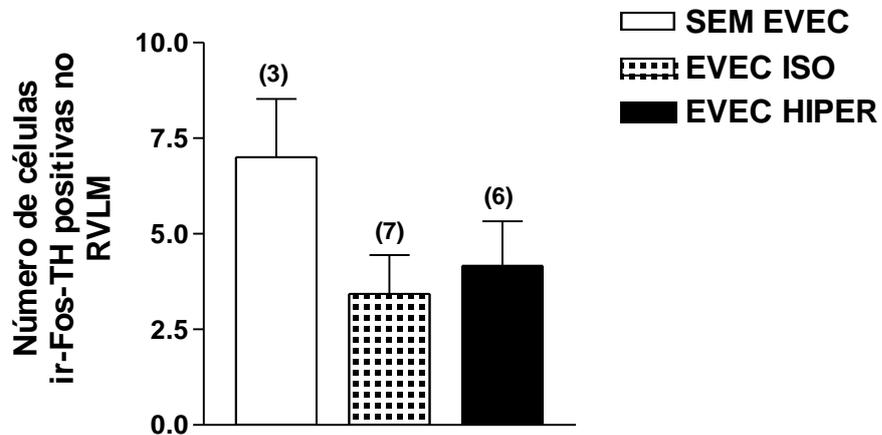
**Figura 2.4** – isotônica e número de células (ir Fos-TH) no são expressos em 0,05 em relação EVEC). O número em cada grupo se expresso entre barras.



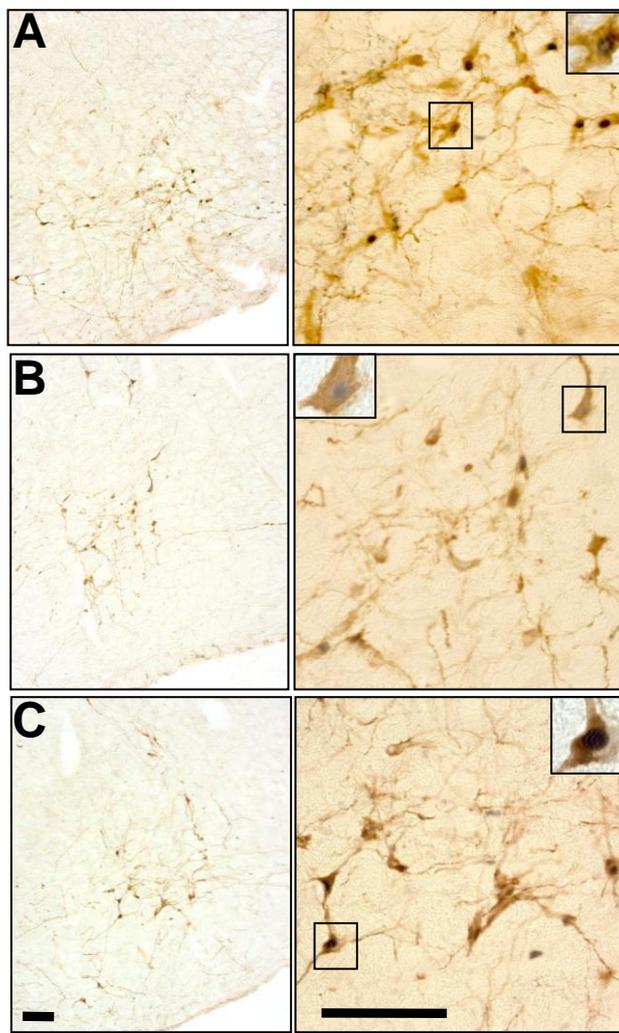
Efeitos da EVEC hipertônica sobre o duplamente marcadas NTS-AP. Os valores médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (sem de animais utilizados experimental encontrá- parênteses acima das

**Figura 2.5** - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no NTS-AP. **A:** sem EVEC; **B:** EVEC isotônica; **C:** EVEC hipertônica. As figuras estão em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas estão em destaque no canto superior direito (aumento de 100X). CC, canal central e AP, área postrema. Escala: 100 µm.

A EVEC hipertônica e isotônica não alterou de maneira significativa o número de duplas marcações (Fos-TH) no RVLM nos grupos avaliados (figuras 2.6 e 2.7).

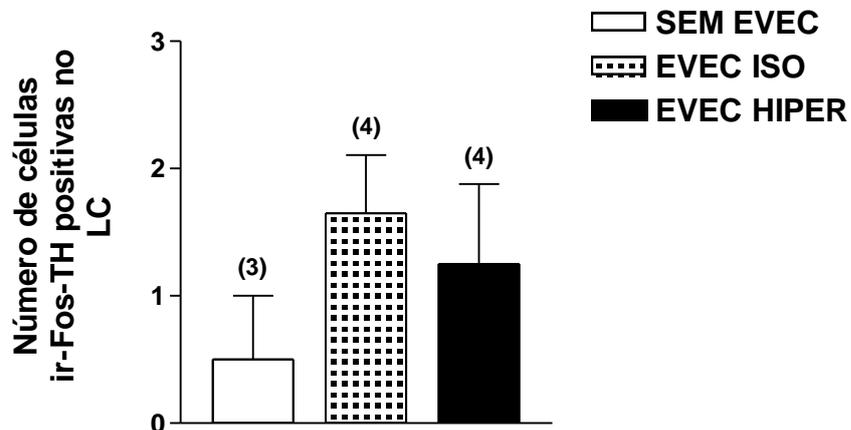


**Figura 2.6** – Efeitos da EVEC isotônica e hipertônica sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-TH) no RVLM. Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados em cada grupo experimental encontra-se expresso entre parênteses acima das barras.

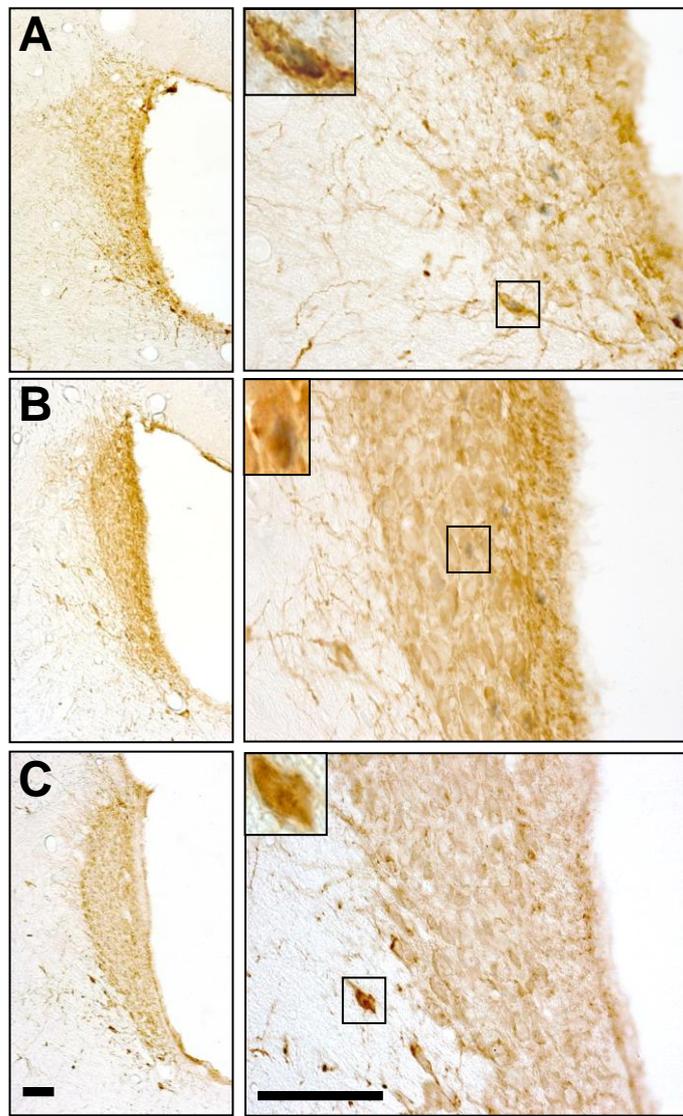


**Figura 2.7** - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no RVLM. **A:** sem EVEC; **B:** EVEC isotônica; **C:** EVEC hipertônica. As figuras estão em aumento de 10X e 40X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas estão em destaque na parte superior (aumento de 100X). Escala: 100 µm.

O número de duplas marcações Fos-TH, não foi alterado de modo significativo em resposta à expansão de volume isotônica e hipertônica em relação ao grupo não expandido quando avaliamos o LC (figuras 2.8 e 2.9).



**Figura 2.8** – isotônica e o número de duplamente TH) no LC. expressos O número de em cada experimental expresso acima das



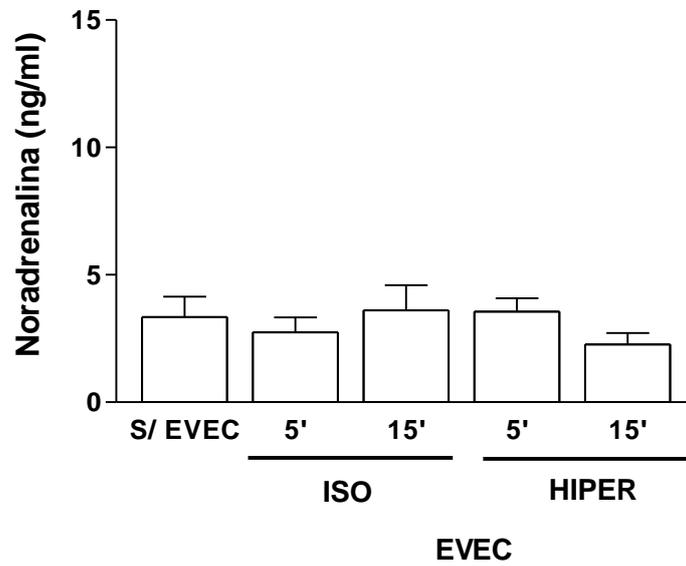
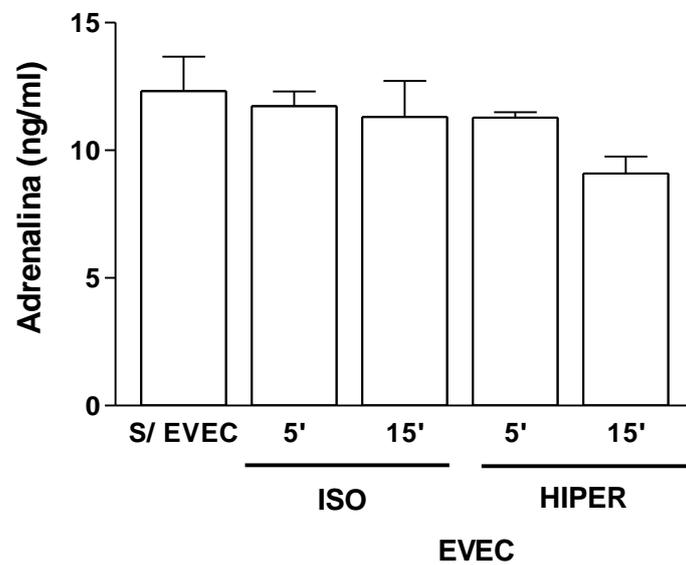
Efeitos da EVEC hipertônica sobre células marcadas (ir Fos- Os valores são em médias  $\pm$  EPM. animais utilizados grupo encontra-se entre parênteses barras.

**Figura 2.9** - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-TH no LC. **A:** sem EVEC; **B:** EVEC isotônica; **C:** EVEC hipertônica. As figuras estão em aumento de 10X e 40X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas estão em destaque no canto superior esquerdo (aumento de 100X). Escala: 100  $\mu$ m.

### 5.3. EXPERIMENTO III:

*Os efeitos da EVEC isotônica e hipertônica sobre as concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina.*

De acordo com os dados apresentados na figura 3.1 não houve alteração significativa nas concentrações plasmáticas de noradrenalina (A) e adrenalina (B) em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica em nenhum dos tempos analisados em relação ao grupo não expandido.

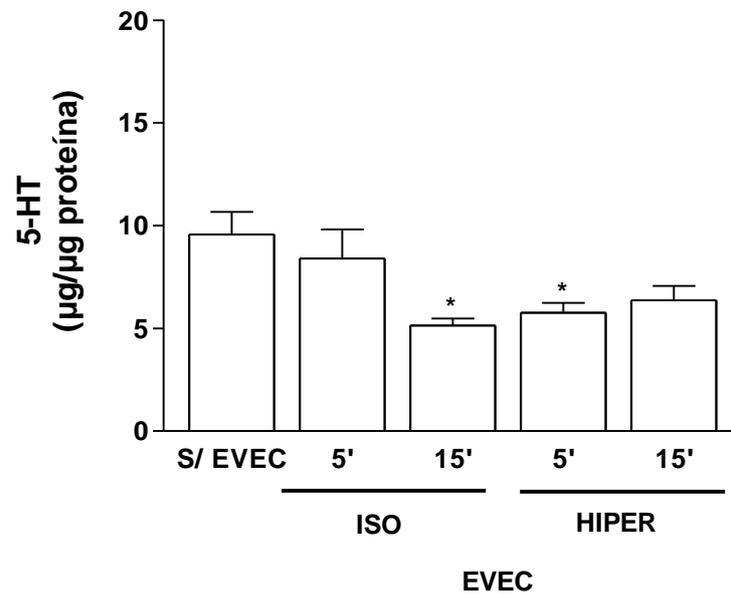
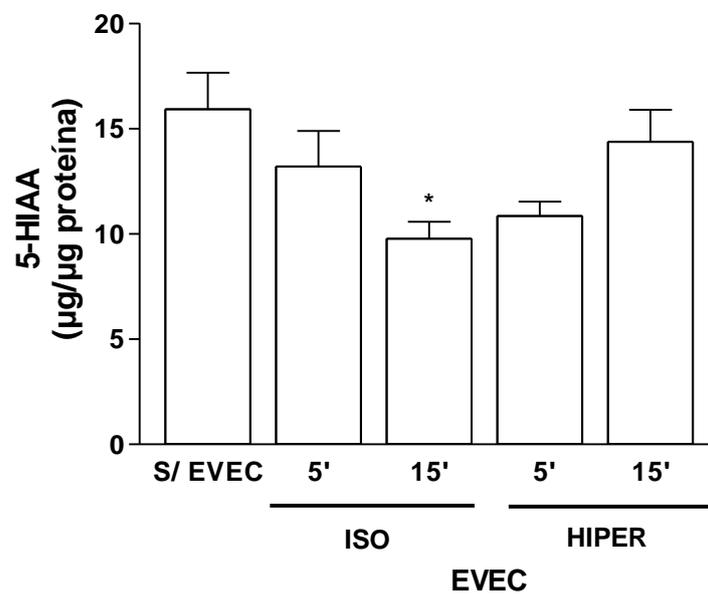
**A****B**

**Figura 3.1** – Concentrações plasmáticas de NA (A) e AD (B) após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. Cada grupo experimental possui de 7-8 animais.

#### 5.4. EXPERIMENTO IV:

*Os efeitos da EVEC sobre o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA no NDR.*

Como ilustrado na figura 4.1, o conteúdo de 5-HT (A) diminuiu significativamente em resposta à EVEC isotônica, somente aos 15 minutos ( $9,56 \pm 1,11$  vs  $5,14 \pm 0,33$ ,  $p < 0,05$ ) e hipertônica, aos 5 minutos ( $9,56 \pm 1,11$  vs  $5,76 \pm 0,49$ ,  $p < 0,05$ ) quando comparados estes grupos com o grupo sem EVEC. Em relação ao conteúdo total de 5-HIAA (B) houve diminuição significativa em resposta a EVEC isotônica, aos 15 minutos ( $15,92 \pm 1,73$ ,  $p < 0,05$ ) comparando-se este grupo com o grupo sem EVEC (controle). Não houve alteração significativa no conteúdo de 5-HT ou 5-HIAA em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica, em nenhum dos tempos analisados.

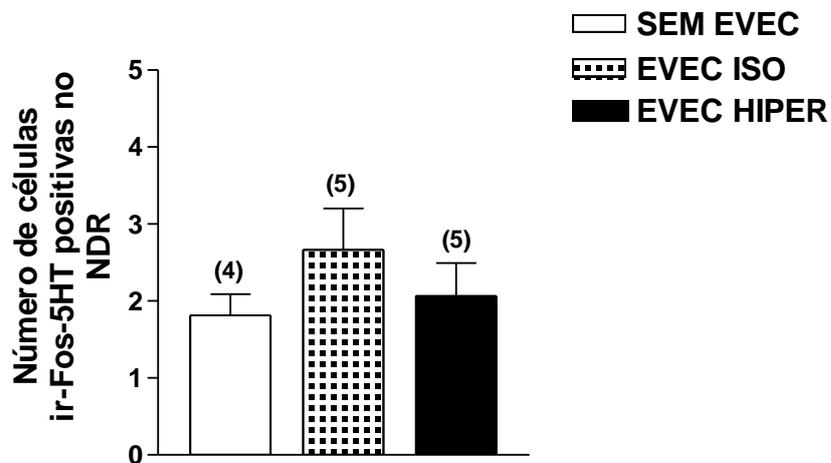
**A****B**

**Figura 4.1** – Conteúdo total de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) no NDR após EVEC isotônica e hipertônica aos 5 e 15 minutos. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao basal (sem EVEC). Cada grupo experimental possui de 9 – 10 animais.

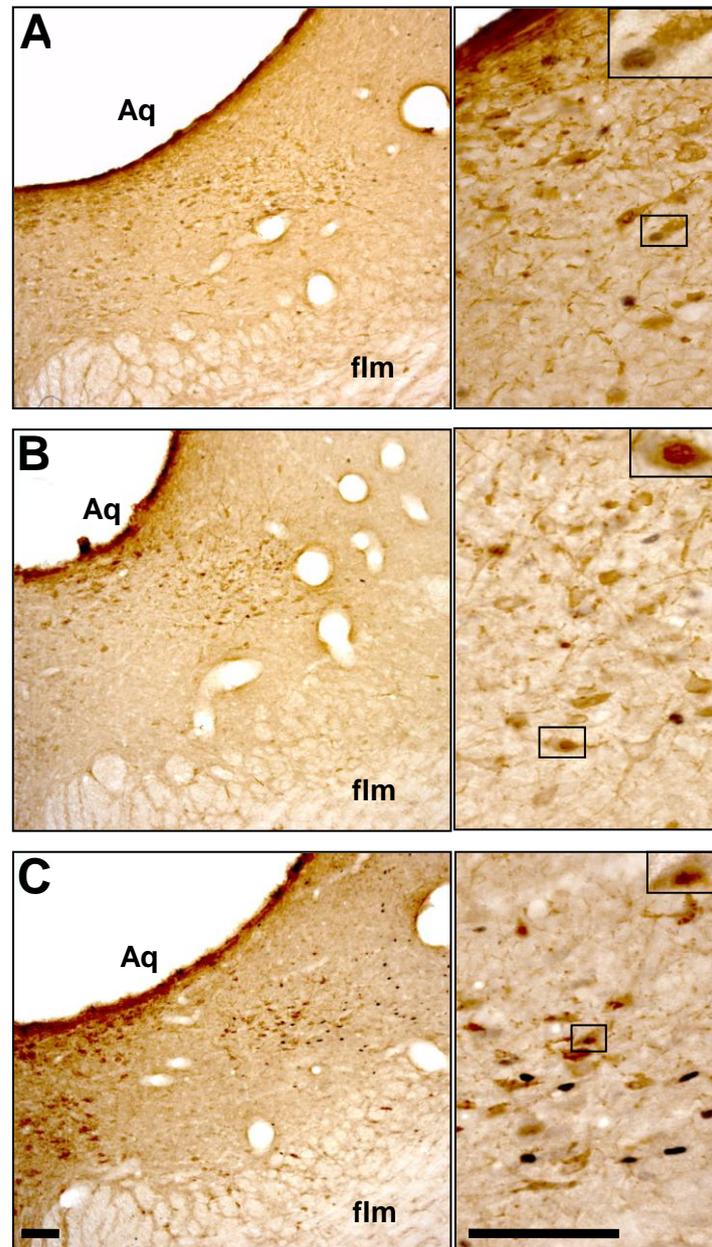
### 5.5. EXPERIMENTO V:

*Os efeitos da EVEC sobre a ativação neuronal no NDR através da expressão da proteína Fos e de sua co-localização fenotípica com 5-HT.*

As figuras 5.1 e 5.2 mostram o número de duplas marcações Fos-5-HT, no NDR. Estes valores não foram alterados em resposta à expansão de volume isotônica e hipertônica em relação ao grupo não expandido.



**Figura 5.1** – Efeitos da EVEC isotônica e hipertônica sobre o número de células duplamente marcadas (ir Fos-5-HT) no NDR, parte dorsal. Os valores são expressos em médias  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados em cada grupo experimental encontra-se expresso entre parênteses acima das barras.



**Figura 5.2** - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-5HT no NDR, parte dorsal. **A:** sem EVEC; **B:** EVEC isotônica; **C:** EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 10X e 40X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas estão em destaque no canto superior direito (aumento de 100X). Aq, aqueduto e flm, fascículo longitudinal medial. Escala: 100  $\mu$ m.



Os resultados apresentados neste trabalho mostram que ocorreu uma diminuição significativa no conteúdo total de noradrenalina e dopamina no NTS, RVLM e LC em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. Quanto à avaliação da ativação neuronal observamos que a EVEC diminuiu o número de células duplamente marcadas Fos-TH no NTS após estímulo hipertônico, sem, no entanto alterar o padrão de ativação neuronal nas demais áreas.

Quando alterações no volume ou na composição do meio extracelular são detectadas, o organismo mobiliza diversos sistemas que visam de uma forma geral, restabelecer a homeostase dos líquidos circulantes por meio do controle sobre a ingestão e excreção de eletrólitos e água. Essas respostas homeostáticas envolvem a ativação de mecanismos neurais, humorais e comportamentais.

Como já descrito, o NTS é primeiro sítio de terminações de aferências vagais oriundas dos barorreceptores localizados no seio aórtico e carotídeo, regulando as alterações de pressão arterial através da ativação do barorreflexo. Além disso, este núcleo recebe aferências provenientes de receptores de estiramento e osmorreceptores localizados no trato gastrointestinal. Estes últimos desempenham importante papel nos mecanismos comportamentais de manutenção da homeostase hidroeletrólítica, controlando a ingestão de água e alimentos (Hochstenbach *et al.*, 1993; Gottlieb *et al.*, 2006).

As catecolaminas, como a noradrenalina, adrenalina e dopamina, são importantes mediadores neste sistema de neurotransmissão. Fibras neuronais provenientes do NTS projetam-se para neurônios noradrenérgicos do RVLM, e destes para o SON e PVN (Armstrong *et al.*, 1982; Ross *et al.*, 1985). Aferências adrenérgicas/noradrenérgicas do NTS também partem, direta ou indiretamente via RVLM, para o LC, chegando ao SON e PVN (Sawchenko & Swanson, 1982).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que ocorreu diminuição significativa no conteúdo total de noradrenalina e dopamina no NTS, RVLM e LC em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. Alguns estudos (Le Quan-Bui *et al.*, 1980; Nomura *et al.*, 1985; Takami *et al.*, 1993) têm mostrado que o conteúdo de noradrenalina no RVLM e no NTS é menor em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), quando comparados a animais normotensos (WKY). Entretanto, outros

trabalhos mostram o oposto (Versteeg *et al.*, 1976; Winternitz *et al.*, 1984) ou ainda que não existem diferenças nestes parâmetros entre animais SHR e WKY (Saavedra *et al.*, 1978; Saavedra 1979). Uma hipótese para tais observações controversas poderia ser a influência, sobre o conteúdo total, de catecolaminas periféricas, oriundas de outras fontes como a medula adrenal, terminações nervosas e gânglios simpáticos, uma vez que tanto as catecolaminas centrais quanto as produzidas periféricamente participam da manutenção da homeostase do sistema nervoso simpático.

Nomura e Okamura (1989) relataram que, em animais SHR submetidos a estresse, ocorre aumento das concentrações plasmáticas de noradrenalina e diminuição de seu conteúdo em estruturas tronco-encefálicas, sugerindo que os componentes noradrenérgicos centrais e periféricos poderiam estar relacionados. Entretanto, no modelo de EVEC, no qual foram induzidas alterações de volume e osmolalidade do líquido extracelular, a diminuição do conteúdo de noradrenalina e dopamina no NTS, RVLM e LC não foi acompanhada por alterações nas concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina, sugerindo que neste modelo experimental ocorra uma provável dissociação de vias regulatórias centrais e periféricas.

Diversos autores (Fuxe *et al.*, 1978; Le Quan-Bui *et al.*, 1980; Nomura *et al.*, 1985; Yamada *et al.*, 1989; Takami *et al.*, 1993) descreveram que a diminuição no conteúdo de noradrenalina em estruturas tronco-encefálicas de ratos hipertensos poderia ser influenciada por diferenças na pressão, idade e/ou o local de medida. Estudos desenvolvidos em animais submetidos a hemorragia sistêmica revelaram que a ativação de vias noradrenérgicas ascendentes que se projetam do LC para o PVN resultou em aumento da liberação de noradrenalina no núcleo hipotalâmico (Morris *et al.*, 1994). Esses dados corroboram com os resultados apresentados, uma vez que foi observada diminuição do conteúdo de noradrenalina no PVN (assim como no LC, NTS e RVLM) em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. Entretanto, o conteúdo de dopamina do PVN sofreu redução em resposta à EVEC isotônica e aumentou em resposta à EVEC hipertônica. Os resultados apresentados mostraram ainda que o conteúdo de noradrenalina no SON não foi alterado em resposta aos mesmos estímulos. Considerando o conteúdo de dopamina neste núcleo, foi observada diminuição após ambos os tipos de EVEC.

O conteúdo de noradrenalina e dopamina na EM não foi alterado em resposta à EVEC isotônica, porém houve diminuição da concentração destes neurotransmissores na EM de animais submetidos à EVEC hipertônica. É relevante salientar que a EM é uma região altamente vascularizada, que recebe terminações nervosas oriundas de vários núcleos cerebrais, limitando assim a elucidação da origem dos mecanismos que modulam o componente simpático desta estrutura.

Após a integração das informações que chegam ao SNC, ao menos parte das respostas efetoras ocorre por meio da inervação simpática renal direta. Dessa forma, o SNC exerce um controle mais rápido de algumas funções renais, com o objetivo de corrigir os erros aferidos. O rim participa da regulação da homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidrossalino por meio de três mecanismos principais: I – excreção de sódio (pela modulação da secreção de OT e ANP), II – excreção de água (através do controle sobre a secreção de AVP), III – secreção de renina (pela modulação da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona).

Considerando os componentes hormonais de origem hipotalâmica envolvidos nas respostas efetoras desencadeadas por aumentos de volume e/ou osmolalidade, diversos estudos já mostraram que a EVEC hipertônica promove aumento nas concentrações plasmáticas de AVP, OT e ANP, enquanto que a EVEC isotônica induz diminuição na concentração plasmática de AVP e aumento na secreção de ANP e OT (Haanwinckel *et al*, 1995; Ventura *et al*, 2002; Durlo *et al*, 2004; Ruginsk *et al.*, 2007). Outros trabalhos mostraram ainda que a redução na secreção de AVP por neurônios do SON e PVN é modulada pela ativação de vias GABAérgicas provenientes da região perinuclear do SON e na banda diagonal de Broca (Grindstaff & Cunningham, 2001; Renaud *et al*, 1988).

Nesse sentido, alguns autores mostraram que a liberação de GABA encontra-se aumentada (Singewald *et al.*, 1994 e 1997), enquanto que a liberação de noradrenalina e dopamina encontra-se diminuída (Schneider *et al.*, 1995) no hipotálamo posterior e LC de animais submetidos a elevações da pressão arterial (precisa conferir se citações estão relacionadas ao assunto certo). Desta forma, sugere-se que vias GABAérgicas poderiam estar modulando a liberação de NA e DA em estruturas tronco-encefálicas e hipotalâmicas em resposta às variações induzidas pela EVEC no volume circulante e osmolalidade plasmática.

Como relatado acima, quando se faz a EVEC (isotônica ou hipertônica) ocorre em consequência aumento da secreção do peptídeo natriurético atrial, diminuição da atividade do sistema renina-angiotensina e diminuição da atividade da porção simpática do sistema nervoso autônomo (para revisão ver Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). Sabe-se que o peptídeo natriurético atrial, administrado sistemicamente, ou por via icv, diminui a liberação de AVP bem como a atividade simpática (Ricksten & Thoren, 1980; Schad & Seller, 1976). Por outro lado, a EVEC induz diminuição da liberação de renina, bem como da atividade do sistema renina-angiotensina. Uma série de evidências experimentais indica que a angiotensina atuando no SNC é capaz de estimular a síntese de serotonina (5-HT) (Haulica *et al.*, 1980; Nahmod *et al.*, 1978). Tratamento prolongado com inibidores da enzima conversora (captopril) ou do antagonista do receptor da ANG-II (irbesatan) é capaz de evitar o desenvolvimento da obesidade na cepa de camundongo obeso (Ortlepp *et al.*, 2002). No rato a administração de angiotensina II no cérebro diminui a ingestão de alimentos e o peso corporal. Na interpretação dos dados os pesquisadores sugerem que a angiotensina II, no cérebro induza a ativação simpática (Cassis *et al.*, 1998; English & Cassis, 1999; Porter *et al.*, 2003).

No nosso Laboratório foram relatados experimentos demonstrando que respostas hormonais e renais desencadeadas a partir de variações de volume são mediadas por mecanismos serotoninérgicos centrais. A microinjeção central de DOI (agonistas serotoninérgicos) ou 5-HT produz aumento na natriurese em ratos submetidos à sobrecarga hídrica (Reis *et al.*, 1991) enquanto lesões eletrolíticas no NDR ou mesmo a depleção de 5-HT pela injeção icv de inibidor da triptofano hidroxilase, produzem diminuição na excreção de sódio e potássio em ratos submetidos à sobrecarga hídrica bem como diminuição na liberação de ANP em condições basais ou de EVEC (Reis *et al.*, 1994), ilustrando uma possível ação tônica inibitória do sistema serotoninérgico da rafe sobre a ingestão de água e sódio via NPBL já que o bloqueio de receptores serotoninérgicos neste núcleo potencia o apetite ao sódio em ratos desidratados (de Gobbi *et al.*, 2000), esta ação também ocorreria via ativação do sistema ocitocinérgico do NPV que em conjunto com o ANP inibiria a ação estimulatória angiotensinérgica sobre a ingestão de água e sódio (Franchini & Vivas, 1999; McCann *et al.*, 2000). Entretanto, os dados aqui obtidos

mostraram que o conteúdo de serotonina e seu metabólito analisado no NDR diminuíram em resposta a alterações de volume e osmolaridade plasmática.

Além do sistema serotoninérgico, as vias adrenérgicas desempenham importante função no controle das alterações de volume e osmolalidade. Possíveis ações estimulatórias da noradrenalina sobre a ingestão de líquido têm sido investigadas, assim como seu papel inibitório (De Luca *et al.*, 1994). Estudos que avaliaram a ativação neuronal e a participação de diferentes núcleos ou vias cerebrais na homeostase dos líquidos corporais também são paradoxais. Alguns resultados mostraram que a EVEC isotônica promove aumento na expressão de Fos em estruturas do tronco cerebral (Randolph *et al.*, 1998), bem como aumento da co-localização Fos-TH nestas mesmas estruturas (Godino *et al.*, 2005). Por outro lado, os dados apresentados mostram que a EVEC diminuiu o número de células duplamente marcadas para Fos-TH no NTS após estímulo hipertônico, sem, no entanto, alterar o padrão de ativação neuronal nas demais áreas analisadas. Tais resultados estão em consonância com os dados de conteúdo de catecolaminas apresentados para o NTS, sugerindo, assim, uma provável inibição das aferências noradrenérgicas que partem desta área e modulam respostas reflexas e hormonais. Porém, em decorrência da existência de resultados contraditórios a respeito da participação do sistema noradrenérgico central na manutenção do equilíbrio hidromineral, gerados a partir da utilização de diferentes desenhos experimentais, novos estudos ainda precisam ser realizados a fim de esclarecer tais mecanismos.

Em suma, quando um animal sofre expansão do volume circulante, a pressão venosa central aumenta, receptores cardiopulmonares no átrio e ventrículo e barorreceptores no arco aórtico e seio carotídeo são estimulados. A expansão de volume e a estimulação de receptores atriais produzem inibição da liberação de AVP, aumento na liberação de OT e de ANP resultando em natriurese (Pendlebury *et al.*, 1992; Durlo *et al.*, 2004; Ruginsk *et al.*, 2007), além de promover diminuição da atividade simpática (Ricksten & Thoren, 1980; Schad & Seller, 1976) e atenuar a ingestão hídrica (Kaufman, 1984). Os resultados obtidos indicam a inibição de vias noradrenérgicas ascendentes a partir do NTS que incluem RVLM e LC, núcleos importantes na modulação de respostas frente à ocorrência de alterações de osmolaridade e volume.



## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

AGARWAL, R. K.; CHANDNA, V. K.; ENGELKING, L. R.; LIGHTBOWN, K. AND KUMAR, M. S. A. Distribution of catecholamines in the central nervous system of the pig. **Brain Research Bulletin**, 32:285–291; 1993.

ANSELMO-FRANCI, J.A., ROCHA, M.J., PERES-POLON, V.L., MOREIRA, E.R., ANTUNES-RODRIGUES, J. AND FRANCI, C.R. Role of the locus coeruleus on blood pressure response and ANP secretion following extracellular volume expansion. **Brain Research Bulletin**, 50: 173-7. 1999.

ANTUNES-RODRIGUES, J., DE CASTRO, M., ELIAS, L.L., VALENÇA, M.M. AND MCCANN SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological Reviews**, 84(1):169-208, 2004.

ANTUNES-RODRIGUES, J. AND MCCANN, S.M. Chemical stimulation of water, sodium chloride and food intake by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third brain ventricle. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 138: 1464-1470, 1970.

ARMSTRONG, D.M., ROSS, C.A., PICKEL, V.M., JOH, T.H. AND REIS, D.J. Distribution of dopamine, noradrenaline and adrenaline-containing cell bodies in the medulla oblongata: demonstrated by immunocytochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes. **The Journal of Comparative Neurology**, 212: 173-187, 1982.

BASTOS, R., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Alpha-adrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Brain Research**, 895: 80-88. 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 7;72: 248-254. 1976.

CAMARGO, L.A.A., SAAD, W., SILVA-NETTO, C.H., GENTIL, C.G., ANTUNES-RODRIGUES, J. AND COVIAN, M.R. Effects of catechol-amines injected into the septal area of the rat brain on natriuresis, kaliuresis and diuresis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 54: 219.

CAMARGO, L.A.A., SAAD, W.A., SILVA-NETTO, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J. AND COVIAN, M.R. Effect of beta-adrenergic stimulation of the septal area on renal excretion of electrolytes and water in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 11: 141-144, 1979.

CASSIS, L. A., MARSHALL, D. E., FETTINGER, M. J., ROSENBLUTH, B. AND LODDER, R. A. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. **American Journal Physiology**, 274: 867-876. 1998.

CIRIELLO, J., ROSAS-ARELLANO, P. AND SOLANO-FLORES, L.P. Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract. **Brain Research**, 726: 227-32, 1996.

COLOMBARI, D.S.A., MENANI, J.V. AND JOHNSON, A.K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **American Journal of Physiology**,. 271: R1470–R1476, 1996.

CURTIS K.S., HUANG, W., SVED, A.F., VERBALIS, J.G., AND STRICKER, E.M. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. *American Journal of Physiology*. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 277: R209–R219, 1999.

CURTIS, K.S., VERBALIS, J.G., AND STRICKER, E.M. Area postrema lesions in rats appear to disrupt rapid feedback inhibition of fluid intake. **Brain Research**, 726: 31–38, 1996.

DE GOBBI, J.I.F., DE LUCA L.A. JR, AND MENANI, J.V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Research**, 880: 131–138, 2000.

DE LUCA L.A. JR, BARBOSA, S.P. AND MENANI, J.V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**,121(4):1055-61. 2003.

DE LUCA JR., L.A., FRANCI, C.R., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Natriuresis induced by cholinergic stimulation of the locus coeruleus in the rat. **Physiology and Behavior**, 47: 605-610.1990.

DORN, A., ANTUNES-RODRIGUES, J., AND MCCANN, S.M. Natriuresis in the rat following intraventricular carbachol. **American Journal of Physiology**, 219: 1292-1298, 1970.

DORN, S. AND PORTER, J.C. Diencephalic involvement in sodium excretion in the rat. **Endocrinology**, 86: 1112-1117, 1970.

DURLO, F.V., CASTRO, M., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. **Experimental Physiology**, 89(5): 541-48, 2004.

EDWARDS, G.L., BELTZ, T.G., POWER, J.D. AND JOHNSON, A.K. Rapid onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 264: R1242–R1247, 1993.

EDWARDS, G.L. AND JOHNSON, A.K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 261: R1039–R1044, 1991.

ENGLISH, V. AND CASSIS, L. Facilitation of sympathetic neurotransmission contributes to angiotensin regulation of body weight. **Journal of Neural Transmission** 106: 631-644. 1999.

FITTS, D.A. AND MASSON, D.B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behavioral Neuroscience**, 103: 865-872, 1989.

FITZSIMONS, J.T. Interactions of intracranially administered renin or angiotensin and other thirst stimuli on drinking. **Journal of Physiology**, 210: 152, 1970.

FITZSIMONS, J.T. AND STRICKER, E.M. Sodium appetite and the renin-angiotensin system. **Nature: New Biology**, 231: 58-60, 1971.

FRANCI, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J., SILVA-NETTO, C.R., CAMARGO, L.A.A. AND SAAD, W.A. Identification of pathways involved in the natriuretic, kaliuretic and diuretic responses induced by cholinergic stimulation of the medial septal area (MSA). **Physiology & Behavior** , 30: 65-71, 1983.

FRANCI, C.R., SILVA-NETTO, C.R., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction between the lateral hypothalamic area (LHA) and the medial septal area (MAS) in the control of sodium and potassium excretion in rat. **Physiology & Behavior**, 25: 801-806, 1980.

FRANCHINI, L AND VIVAS, L. Fos induction in rat brain neurons after sodium consumption induced by acute body sodium depletion. **American Journal of Physiology**, 276: R1180-1187, 1999.

FUXE, K., GANTEN, D., JONSSON, G. Catecholamine turnover changes in hypothalamus and dorsal midline area of the caudal medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience Letters**, 15, 283-288. 1979.

GOTTLIEB, H.B., JI, L.L., JONES, H., PENNY, M.L., FLEMING, T. AND CUNNINGHAM, J.T. Differential effects of water and saline intake on water deprivation-induced c-Fos staining in the rat. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 290:R1251–R1261. 2006.

GRINDSTAFF, R.R. AND CUNNINGHAM, J.T. Cardiovascular regulation of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. **Experimental Neurology**, 171:219-226. 2001.

GROSSMAN, S.P. A neuropharmacological analysis of hypothalamic and extrahypothalamic mechanisms concerned with the regulation of food and water intake. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 157:902-917, 1969.

GROSSMAN, S.P. Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of hypothalamus. **Science**, 132: 301-302, 1960.

HAANWINCKEL, M.A., ELIAS, L.K., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 92: 7902-7906, 1995.

HARMS, P.G. AND OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the jugular vein. **Journal of Applied Physiology**, 36: 391-392, 1974.

HAULICA, I., PETRESCU, G., ULUITU, M., ROSCA, V. AND SLATINEANU, S. Influence of angiotensin II on dog pineal serotonin content. **Neuroscience Letters**, 18: 329-332. 1980.

HOCHSTENBACH, S.L., SOLANO-FLORES, L.P. AND CIRIELLO, J. Fos induction in brainstem neurons by intravenous hypertonic saline in the conscious rat. **Neuroscience Letters**, 158: 225-228, 1993.

HONDA, K., NEGORO, H., FUKUOKA, T., HIGUCHI, T. AND UCHIDE, K. Effect of microelectroretically applied acetylcholine, noradrenaline, dopamine and serotonin on the discharge of paraventricular oxytocinergic neurones in the rat. **Endocrinologia Japonica**, 32: 127–133, 1985.

HUANG, W., SVED, A.F. AND STRICKER, E.M. Vasopressin and oxytocin release evoked by NaCl loads are selectively blunted by area postrema lesions. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 278: R732–R740, 2000.

KAWANO, H. AND MASUKO, S. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive projections from the caudal ventrolateral medulla to the sub-fornical organ in the rat. **Brain Research**, 903: 154-61. 2001.

KAUFMAN, S. Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. **Journal of Physiology**, 349: 389-396, 1984.

KRUSTULOVIC, A.M. Investigations of catecholamines metabolism using high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 35: 207-210, 1982.

LE QUAN-BUI, K. H., ELGHOZI, J. L., DEVYNCK, M. A. & MEYER, P. Early changes in noradrenaline content of some brain nuclei in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**, 59: S243-245. 1980.

LEIBOWITZ, S.F., EIDELMAN, D., SUH, J.S., DIAZ, S. AND SLADEK, C.D. Mapping study of noradrenergic stimulation of vasopressin release. **Experimental Neurology**, 110: 298–305, 1990.

LENG, G., BROWN, C.H. AND RUSSELL, J.A. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. **Progress in Neurobiology**, 57: 625–655, 1999.

MARCHAND, J. E., HERSHMAN, K., KUMAR, M. S. A., THOMPSON, M. L. AND KREAM, R. M. Disulfiram administration affects substance P-like immunoreactive and monoaminergic neural systems in rodent brain. **Journal of Biological Chemistry**, 265:264 –273; 1990.

MARGATHO, L.O., BARBOSA, S.P., DE LUCA, L.A.JR. AND MENANI, J.V. Central serotonergic and adrenergic/imidazoline inhibitory mechanisms on sodium and water intake. **Brain Research**, 956(1):103-9. 2002.

MACCANN, S.M., GUTKOWSKA, J. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36: 165:181. 2003.

MENANI, J.V, BARBOSA, S.P., DE LUCA, L.A.JR., DE GOBBI, J.I. AND JOHNSON, A.K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 282(3):R837-41. 2002.

MENANI, J.V., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R. AND ABRÃO-SAAD, W. Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ in water intake. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 20: 301-306, 1984.

MENANI, J.V., THUNORST, R.L. AND JOHNSON, A.K. Lateral Parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **American Journal of Physiology**, 270: 162-168, 1996.

MORRIS, M.J., HASTINGS, J.A AND PAVIA, J.M. Catecholamine release in the rat hypothalamic paraventricular nucleus in response to haemorrhage, desipramine and potassium. **Brain Research**, 665: 5–12, 1994.

MORRIS, M., MCCANN, S.M. AND ORIAS, R. Evidence for hormonal participation in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline and norepinephrine. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 152: 95-98, 1976.

MORRIS, M., MCCANN, S.M. AND ORIAS, R. Role of transmitters in mediating hypothalamic control of electrolyte excretion. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 55: 1143-1154, 1977.

NAHMOD, V. E., FINKIELMAN, S., BENARROCH, E. E. AND PIROLA, C. J. Angiotensin regulates release and synthesis of serotonin in brain. **Science** 202: 1091-1093. 1978.

NAKAMURA, K., ONO, T., FUKUDA, M. AND UWANO, T. Paraventricular neuron chemosensitivity and activity related to blood pressure control in emotional behavior. **Journal of Neurophysiology**, 67: 255–264, 1992.

NOMURA, M. AND OKAMURA, K. Catecholamine content changes in brain regions of spontaneously hypertensive rats under immobilization stress. **Journal of Neurochemistry**, 52: 933-937. 1989.

NOMURA, M., OHTSUJI, M. & NAGATA, Y. Changes in alpha-adrenoceptors in the medulla oblongata including nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. **Neurochemical Research**, 10: 1143-1154. 1985.

OHMAN, L.E. AND JOHNSON, A.K. Role of lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. **Brain Research**, 695(2):275-278. 1995.

OLIVARES, E.L., COSTA-E-SOUSA, R.H., CAVALCANTE-LIMA, H.R., LIMA, H.R., CEDRAZ-MERCEZ, P.L. AND REIS, L.C. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36(12):1709-16. 2003.

ORTLEPP, J. R., BREUER, J., EITNER, F., KLUGE, K., KLUGE, R., FLOEGE, J., HOLLWEG, G., HANRATH, P. AND JOOST H G. Inhibition of the renin-angiotensin system ameliorates genetically determined hyperinsulinemia. **European Journal Pharmacology** 436: 145-150. 2002.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. **Brain Research**, 59: 449-450, 1973.

PATEL, V., BORYSENKO, M. AND KUMAR, M. S. A. Effect of delta-9 THC on brain and plasma catecholamine levels as measured by HPLC. **Brain Research Bulletin**, 14:85–90; 1985.

PAXINOS, G. AND WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, New York: Academic Press, Spiral Bound, 1997.

PEREZ, S.E., SILVA-NETTO, C.R., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction between cholinergic and osmolar stimulation of the lateral hypothalamic area (LHA) on sodium and potassium excretion. **Physiology and Behavior**, 32: 191-194, 1984.

PILLAR, A.X., SILVA-NETTO, C.R., CAMARGO, L.A., SAAD, W.A., ANTUNES-RODRIGUES, J AND COVIAN, M.R. Adrenergic stimulation of the lateral hypothalamic area on sodium and potassium excretion. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 6(2):145-9. 1977.

PORTER, J. P., ANDERSON, J. M., ROBISON, R. J AND PHILLIPS, A. C. Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. **Brain Research**, 959: 20-28. 2003.

QUALY, J.M. AND WESTFALL, T.C. Release of norepinephrine from the paraventricular hypothalamic nucleus of hypertensive rats. **American Journal of**

**Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 254: R993–R1003, 1988.

REIS, L.C., RAMALHO, M.J. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of median raphe nucleus and central serotonergic pathways in the control of water electrolyte excretion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 24: 847-854. 1991.

REIS, L.C, RAMALHO M.J AND ANTUNES-RODRIGUES J. Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 24: 633–641, 1991.

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

RENAUD, L.P., JHAMANDAS, J.H., BUIJIS, R., RABY, W., RANDLE, J.C. Cardiovascular input to hypothalamic neurosecretory neurons. **Brain Research Bulletin**, 20(6):771-7, 1988.

RICKSTEN, S. E., AND THOREN, P. Reflex inhibition of sympathetic activity during volume load in awake normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, 110: 77-82, 1980.

ROCHA, M.J., FRANCI, C.R. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MAS) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). **Physiology & Behavior**, 41: 23-28, 1985.

ROCHA, M.J.A., BELTZ, T.G., DORNELLES, R.C., JOHNSON, A.K. AND FRANCI, C.R. Anteroventral third ventricle (AV3V) lesions alter c-fos expression induced by salt loading. **Brain Research**, 829: 197-200, 1999.

RUGINSK, S.G., OLIVEIRA, F.R.T., MARGATHO, L.O., VIVAS, L., ELIAS, L.L.K. AND ANTUNES-RODRIGUES, J. Glucocorticoid modulation of neuronal activity

and hormone secretion induced by blood volume expansion. **Experimental Neurology**, 2007. doi:10.1016/j.expneurol.2007.04.012.

SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., GRAEFE, F.G., SILVA-NETTO, C.R., ANTUNES-RODRIGUES, J. AND COVIAN, M.R. The role of central muscarinic and nicotinic receptors in the regulation of sodium and potassium renal excretion. **General pharmacology**, 7: 145-158, 1976.

SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., SILVA-NETTO, C.R., GENTIL, C.G., ANTUNES-RODRIGUES, J. AND COVIAN, M.R. Natriuresis, kaliuresis and diuresis in the rat following microinjections of carbachol into the septal area. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 3: 985-992, 1975.

SAAVEDRA, J. M. Adrenaline levels in brain stem nuclei and effects of PNMT inhibitor on spontaneously hypertensive rats. **Brain Research**, 166: 283-292. 1979.

SAAVEDRA, J. M., GROBECKER, H. AND AXELROD, J. Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rats. **Circulation Research**: 42, 529-534. 1978.

SCHAD, H. AND SELLER, H. Reduction of renal nerve activity by volume expansion in conscious cats. **Pflügers Archives**, 363: 155-159, 1976.

SCHNEIDER, C., SINGEWALD, N. AND PHILIPPU, A. Inhibition of catecholamine (noradrenaline, dopamine) release in the locus coeruleus and the hypothalamus by baroreceptor activation: identification of the involved baroreceptors. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 352(3):291-296. 1995.

SINGEWALD, N., SCHNEIDER, C. AND PHILIPPU, A. Disturbances in blood pressure homeostasis modify GABA release in the locus coeruleus. **Neuroreport**, 5(14):1709-12. 1994.

SINGEWALD, N., KOUVELAS, D., CHEN, F. AND PHILIPPU, A. The release of inhibitory amino acids in the hypothalamus is tonically modified by impulses from aortic baroreceptors as a consequence of blood pressure fluctuations. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 356:348–355. 1997.

SOARES , T.J., COIMBRA, T.M., MARTINS, A.R., PEREIRA, A.G., CÁRNIO, E.C., BRANCO, L.G., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W.I., DE NUCCI, G., FAVARETTO, A.L., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 5; 96(1): 278-283, 1999.

STRICKER, E.M., CRAVER, C.F., CURTIS, K.S., PEACOCK-KINZIG, K.A., SVED, A.F. AND SMITH, J.C. Osmoregulation in water-deprived rats drinking hypertonic saline: effect of area postrema lesions. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 280(3):R831-42. 2001.

STRICKER, E.M., CURTIS, K.S., PEACOCK, K.A., AND SMITH, J.C. Rats with area postrema lesions have lengthy eating and drinking bouts when fed ad libitum: implications for feedback inhibition of ingestive behavior. **Behavioral neuroscience**, 111: 624–633, 1997.

TANAKA, A.J., KARIYA K.B AND NOMURA, M. Drinking attenuates the noradrenaline release in the lateral hypothalamic area induced by angiotensin II activation of the subfornical organ in rats. **Behavioural Brain Research**, 140(1-2):49-55, 2003.

TAKAMI, T., ITO, H. AND SUZUKI, T. Decreased norepinephrine content in the medulla oblongata in severely hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 20(3):161-7.1993.

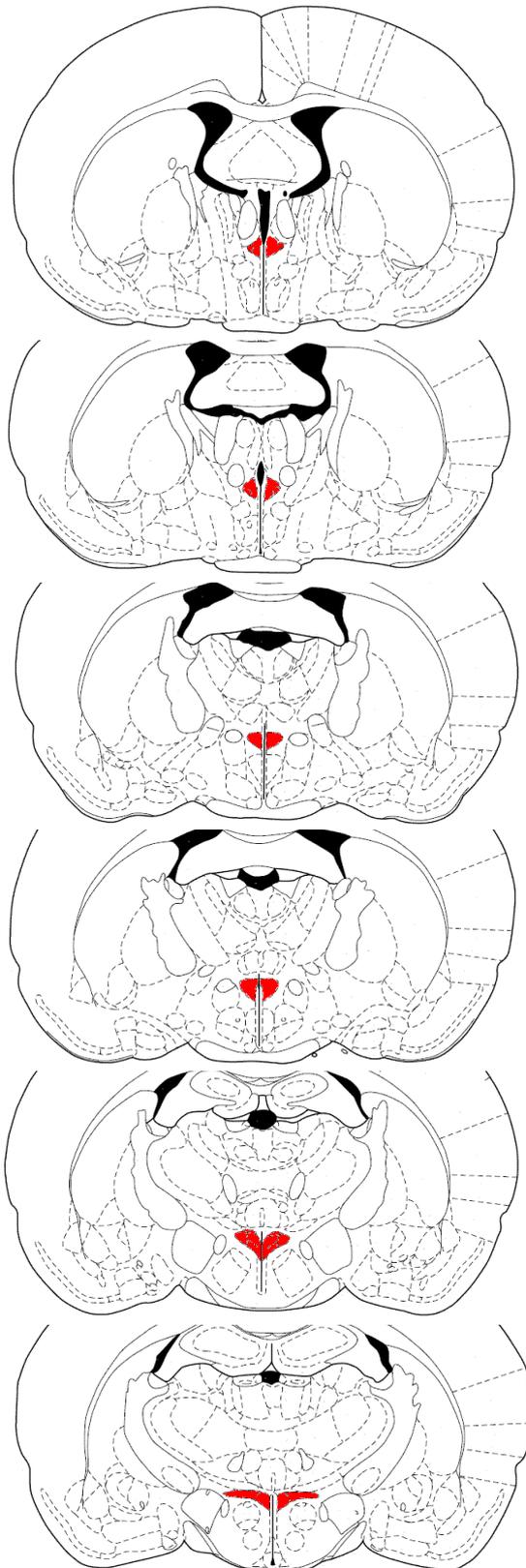
VENTURA, R.R., GOMES, D.A., REIS, W.L., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M., VALENÇA, M.M., CÁRNIO, E.C., RETTORI, E., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Nitroergic modulation of vasopressin, oxytocin and natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35:1101-1109, 2002.

VERSTEEG, D. H. G., PALKOVITS, M., GUGTEN, J. V. D., WIJNEN, H. L. J. M., SMEETS, G. W. M. AND DE JONG, W. Catecholamine content of individual brain

regions of spontaneously hypertensive rats (SH-rats). **Brain Research**, 112:429-434. 1976.

WINTERNITZ, S. R., WYSS, J. M. AND OPARIL, S. The role of the posterior hypothalamic area in the pathogenesis of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Brain Research**, 324: 51-58. 1984.

YAMADA, S., ASHIZAWA, N., NAKAYAMA, K., TOMITA, T. AND HAYASHI, E. Decreased density of alpha-2 adrenoceptors in medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 13, 440-446. 1989.



**8. ANEXOS**

---

- 0,80mm

- 0,92mm

- 1,30mm

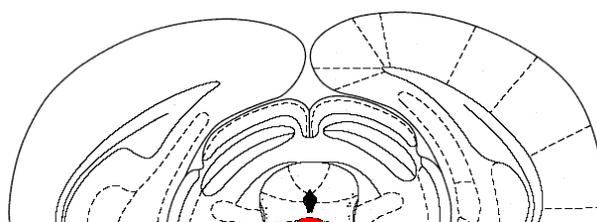
- 1,40mm

- 1,80mm

- 2,12mm



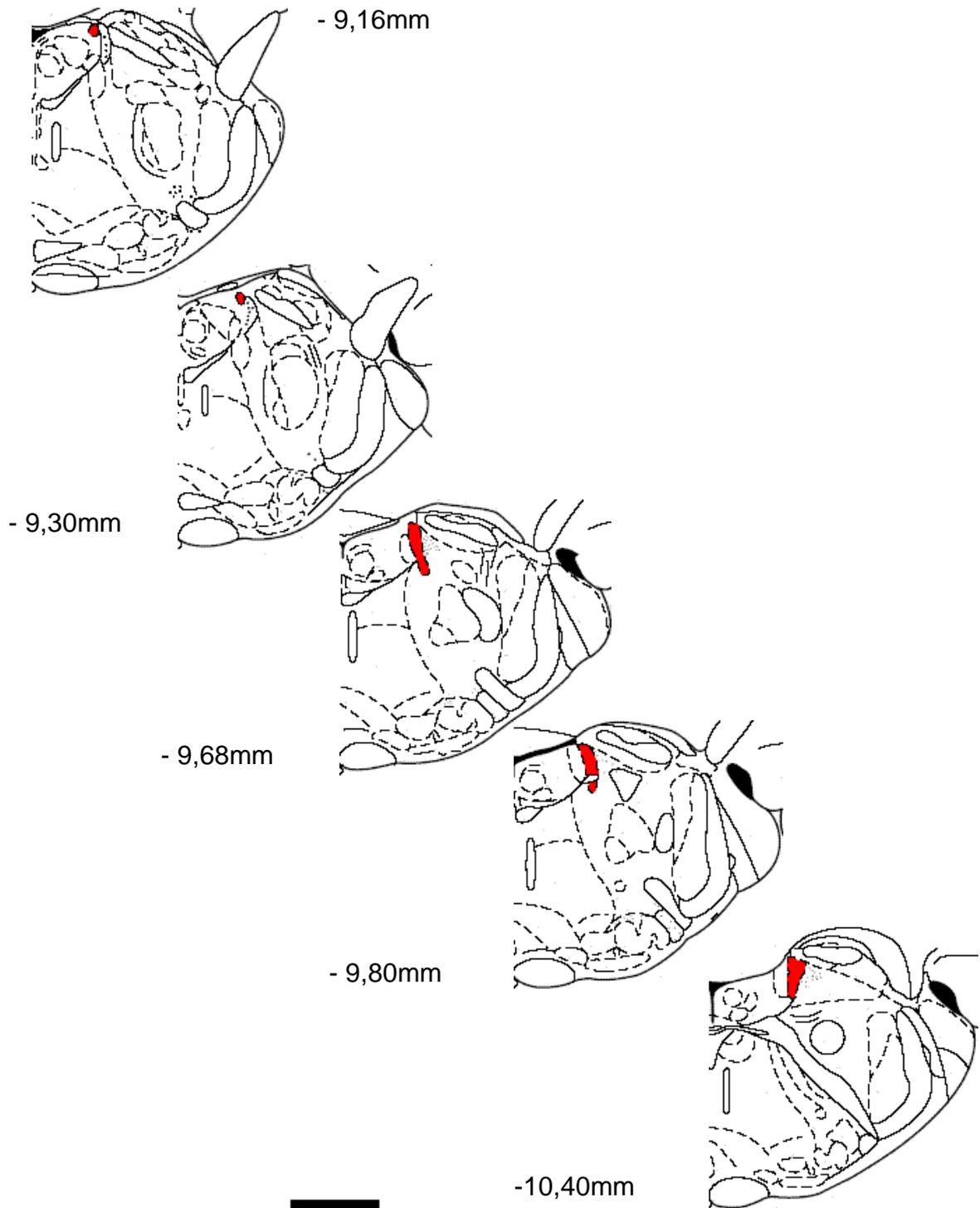
**ANEXO A** – Cortes coronais mostrando extensão da região do PVN coletada para determinação de conteúdo de NA e DA. PVN mostrado em vermelho, coordenadas - 0,80mm a -2,12mm em relação ao bregma. Extraído de Paxinos & Watson, 1997. Escala: 1mm.



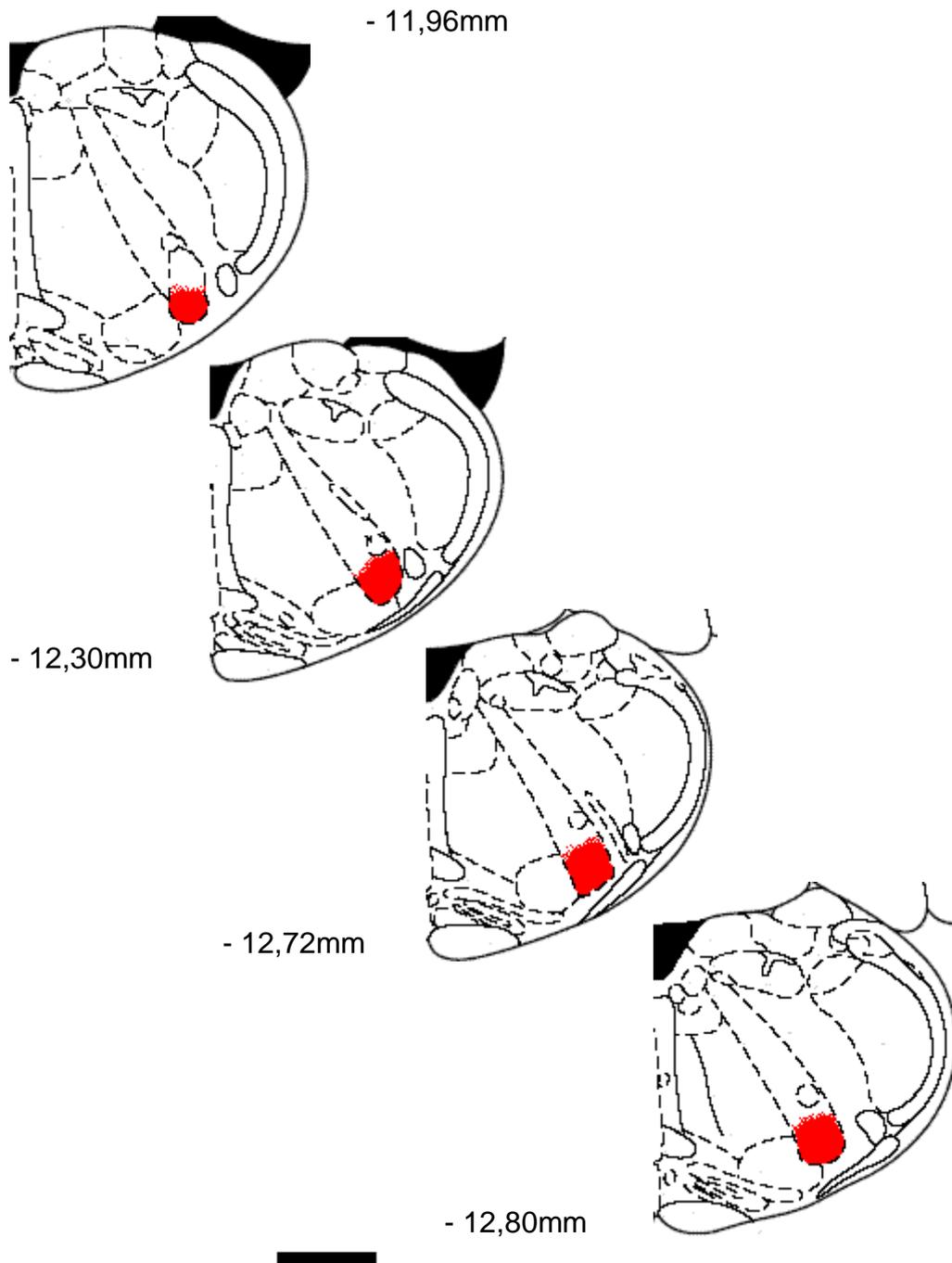
- 7,30mm

---

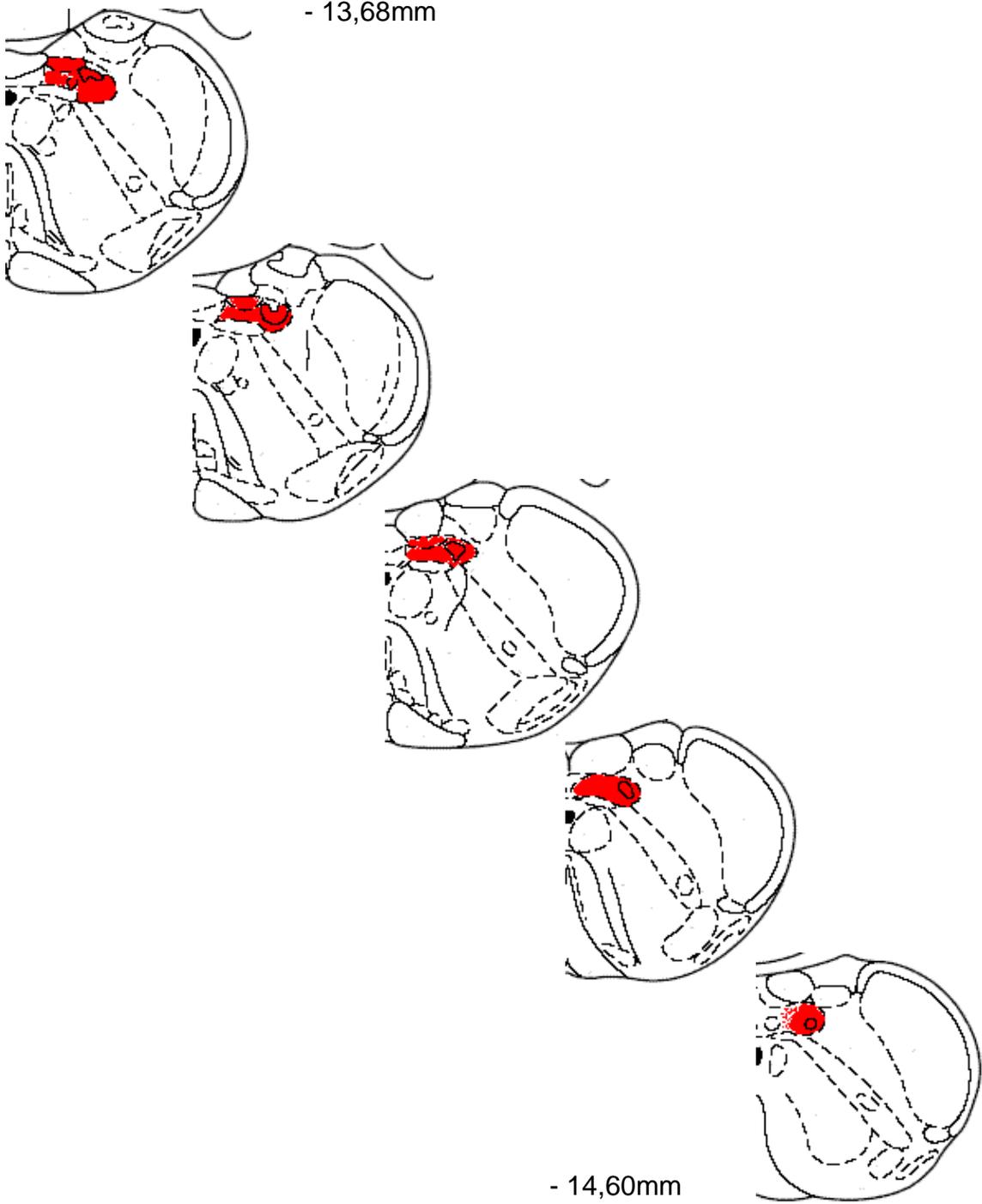
**ANEXO B** – Cortes coronais mostrando extensão da região do NDR coletada para determinação de conteúdo de 5HT e 5-HIAA. NDR mostrado em vermelho, coordenadas -7,30mm a -8,30mm em relação ao bregma. Extraído de Paxinos & Watson, 1997. Escala: 1mm.



**ANEXO C** – Cortes coronais mostrando extensão da coleta do LC para determinação de conteúdo de NA e DA. LC mostrado em vermelho, coordenadas - 9,16mm a -10,04mm em relação ao bregma. Extraído de Paxinos & Watson, 1997. Escala: 1mm.



**ANEXO D** – Cortes coronais mostrando extensão da coleta do RVLM para determinação de conteúdo de NA e DA. RVLM mostrado em vermelho, coordenadas -11,96mm a -12,80mm em relação ao bregma. Extraído de Paxinos & Watson, 1997. Escala: 1mm.



**ANEXO E** – Cortes coronais mostrando extensão da coleta do NTS para determinação de conteúdo de NA e DA. NTS mostrado em vermelho, coordenadas -13,68mm a -14,60mm em relação ao bregma. Extraído de Paxinos & Watson, 1997. Escala: 1mm.