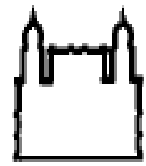




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DELTA E KAPPA -OPIOIDES
CENTRAIS NO CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO EM RATOS
ESTIMULADOS A INGERIR SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA**

ANA ISABEL REIS NASCIMENTO

**Salvador – Bahia
2015**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DELTA E KAPPA -OPIOIDES
CENTRAIS NO CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO EM RATOS
ESTIMULADOS A INGERIR SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA**

ANA ISABEL REIS NASCIMENTO

Orientadora: Prof^a Dr^a Josmara Bartolomei Fregoneze

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Humana para obtenção do
grau de Doutor.

**Salvador – Bahia
2015**

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

N244p Nascimento, Ana Isabel Reis
Participação dos receptores delta e kappa -opioides centrais no controle do
apetite por sódio em ratos estimulados a ingerir solução salina hipertônica. / Ana
Isabel Reis Nascimento. - 2015.
132 f. : il. ; 30 cm.

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

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Fundação Oswaldo Cruz,
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, 2015.

1. Apetite. 2. Receptores delta-opioide. 3. Receptores kappa-opioide. 4. Sód
12. 5. Angiotensina. I. Título.

CDU 615.241:599.323.4

A realização deste trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq e da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia –UESB.

Uma mente que se abre a uma
nova ideia jamais voltará ao
seu tamanho original.

Albert Einstein

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DELTA E KAPPA -OPIOIDES CENTRAIS
NO CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO EM RATOS ESTIMULADOS A
INGERIR SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA

Ana Isabel Reis Nascimento

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Vanderlei Menani
Professor Titular
UNESP



Dr. Igor Lima Maldonado
Professor Adjunto
UFBA



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



Dra. Cristiane Flora Villarreal
Professora Adjunto
UFBA



Dra. Josmara Bartolomei Fregonese
Professora Titular
UFBA

Dedicatória:

Dedico este trabalho a todos e todas que trilham o caminho da pesquisa. Caminho este cheio de dificuldades, mas também repleto de conquistas e descobertas. Apesar da falta de apoio por parte do governo, alunos e pesquisadores não desistem e continuam a galgar a escada do conhecimento “matando um leão por dia”, como se diz popularmente. Ao contrário deste dito popular prefiro dizer que alunos e pesquisadores não matam um leão por dia, mas sim, olham em seus olhos diariamente e aprendem com ele a sobreviver e não desistem de acreditar que é possível, sim, fazer pesquisa no Brasil, no Nordeste, na Bahia.

AGRADECIMENTOS

Àquele que me sustenta com sua destra e me permite dizer “combati o bom combate, terminei a minha carreira (...) Resta-me agora receber a coroa da justiça”

À professora Josmara Bartolomei Fregoneze, pela paciência, tolerância e dedicação.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Neurociências pelo coleguismo e colaboração.

Às professoras Hilda Ferreira, Rejane Santana e Carla Patricia Luz por atenderem às minhas solicitações.

À amiga e colega de bancada Diana Rodrigues Cerqueira, colaboradora deste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica do Laboratório de Neurociências, especialmente a Andrei Luis Beltrão Moiteiro e Emerson Araújo, pela dedicação aos ratos, cuidando e preservando suas condições de saúde.

Ao Sr. José de Souza, bioterista, por todo cuidado e dedicação aos ratos no biotério e a todos nós do Laboratório de Neurociências.

À direção do Departamento de Ciências Biológicas e aos colegas da área de Biofísica e Fisiologia da UESB campus de Jequié.

Ao meu esposo que sonhou e realizou este sonho comigo.

Aos meus filhos, por entenderem que o crescimento acontece em meio às dificuldades.

À minha mãe, rocha firme que alicerça a minha vida.

Aos meus familiares pelas palavras de incentivo.

In memoriam do professor doutor Emílio de Castro e Silva

In memoriam Valdivino Gonçalves do Nascimento.

Muito obrigada.

NASCIMENTO, Ana Isabel Reis. Participação dos receptores delta e kappa -opioides centrais no controle do apetite por sódio em ratos estimulados a ingerir solução salina hipertônica. 125 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Alguns estudos sugerem que as vias opioidérgicas centrais parecem desempenhar um papel regulatório no controle da ingestão de água e sal em mamíferos. As ações dos opioides centrais sobre a regulação do controle hidroeletrólítico são mediadas por vários dos subtipos de receptores opioides. O papel dos receptores delta e kappa-opioides centrais neste processo não está adequadamente elucidado sendo necessário mais estudos que o esclareçam. **Objetivo:** Este estudo investigou o envolvimento dos receptores delta e kappa-opioides centrais no apetite por sódio em ratos depletados deste íon e em rato ativado centralmente com angiotensina. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar (270 ± 20 g), submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânula guia no ventrículo lateral esquerdo (VL), no órgão subfornical (OSF), no núcleo preóptico mediano (MnPO) e no núcleo basolateral da amígdala (BLA). No protocolo de depleção de sódio os animais foram submetidos à injeção subcutânea de furosemida combinada com dieta hipossódica quatro dias após a cirurgia. Neste modelo de estudo os animais receberam injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do antagonista delta-opioide naltrindole no quinto dia pós-cirúrgico, nas doses de 5, 10 e 20 nmol/2 μ L e do antagonista kappa-opioide, norbinaltorfimina, injetado no OSF, MnPO e BLA, nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2 μ L. O agonista específico para os receptores delta-opioides, deltorfina II (2,5, 5,0, 10 e 20 nmol/2 μ L), foi injetado i.c.v. em animais depletados de sódio pré-tratados com naltrindole na dose de 20 nmol/2 μ L e em animais repletos de sódio na dose de 20 nmol/2 μ L. O agonista kappa-opioide, ICI_{199,441} (2,0 nmol/0,2 μ L) foi injetado no OSF, MnPO e BLA em animais depletados de sódio pré-tratados com norbinaltorfimina 2,0 nmol/0,2 μ L e em animais repletos de sódio na dose de 2,0 nmol/0,2 μ L. Bebedouros de água destilada (H₂O_d) e de salina foram introduzidos nas caixas 15 minutos após a injeção central e tiveram seus volumes monitorados nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, após a colocação dos bebedouros. No protocolo de ativação angiotensinérgica central, quarto dia após a cirurgia os animais sofreram administração i.c.v. de naltrindole (5, 10 e 20 nmol/2 μ L) 15 minutos antes de receberem injeções de angiotensina II na dose de 10 ng/2 μ L. Os bebedouros de H₂O_d e de solução salina foram introduzidos nas caixas logo após a segunda injeção e tiveram seus volumes monitorados nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, após a colocação dos bebedouros. Para verificar a especificidade de ação dos antagonistas opioides os animais foram submetidos aos testes de sobremesa, campo aberto e medida da pressão arterial. A análise estatística utilizada foi ANOVA modelo misto para medidas repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações dos volumes ingeridos e teste “t” de Student não pareado para análise dos testes de comportamento, através do programa GraphPad Prism 6.0. **Resultados:** Os grupos de ratos que receberam injeções i.c.v. de naltrindole após depleção de sódio e ativação angiotensinérgica central, apresentaram redução estatisticamente significativa na ingestão de salina quando comparados ao grupo de animais controles. Os ratos que receberam injeção de norbinaltorfimina no OSF, MnPO e BLA após depleção de sódio apresentaram redução estatisticamente significativa na ingestão de salina quando comparados ao grupo de animais controles. A estimulação dos receptores delta-opioides em animais repletos de sódio aumentou a ingestão de salina hipertônica. **Conclusões:** Os dados presentes sugerem que os receptores delta-opioides centrais e os receptores kappa-opioides localizados no OSF, MnPO e BLA parecem desempenhar papel fundamental na expressão do comportamento de aquisição de sal em ratos que sofreram depleção de sódio e ativação central do apetite por sódio induzido pela via angiotensinérgica.

Palavras-chave: Apetite por Sódio; Receptor Delta-Opioide; Receptor Kappa-Opioide; Depleção de Sódio; Angiotensina.

NASCIMENTO, Ana Isabel Reis. Role of central delta and kappa-opioid receptors in the control of salt appetite in rats sodium-depleted. 125 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Central opioid pathways seem to have an important role on the control of water and salt intake in mammals, and brain opioid peptides may influence hydroelectrolyte balance through a myriad of actions mediated by distinct opioid receptors. The specific role of central delta and kappa-opioid receptors (DOR and KOR) in this process is far from being fully understood. In the present work, we investigated the role of those receptors in the control of water and salt intake, in sodium-depleted rats and rats with activation central angiotensinergic. **Method:** Wistar male rats (250 ± 20 g) were used in the experiment after stereotaxic cannulation of the VL left, SFO, MnPO and BLA. To study the effect of the blockade of central DOR and KOR on water and salt intake in rats were sodium depleted by the concomitant use of s.c. injections of furosemide and were kept in hyposodic diet, five days after surgery. In the sixth day, they received i.c.v. injections of a selective delta-opioid receptor antagonist (naltrindole) at the doses of 5, 10 and 20 nmol/2 μ L and injections in the SFO, MnPO and BLA of a selective kappa-opioid receptor antagonist (norbinaltorphimine) at the doses of 0.5, 1.0 and 2.0 nmol/0.2 μ L. The specific agonist for delta-opioid receptor deltorphin II (2.5, 5.0, 10 and 20 nmol / 2 μ L) was injected i.c.v. in animals depleted pretreated with sodium naltrindole at the dose 20 nmol / 2 μ L . The kappa-opioid agonist, ICI_{199,441} (2 nmol / 0.2 μ L) was injected into the SFO, MnPO and BLA in animals depleted pretreated with sodium norbinaltorphimine 2.0 nmol / 0.2 μ L. Bottles containing water or hypertonic saline solution were introduced into the cages 15 min after the central administration. To study the effect of the blockade of central DOR and KOR on water and salt intake in animals after central angiotensinergic stimulation, the animals received intracerebroventricular injections of naltrindole at the doses of 5, 10 and 20 nmol/2 μ L 30 min before receiving central injections of angiotensin II at the dose of 10 ng/2 μ L. In this case, bottles containing water or hypertonic saline solution were introduced into the cages immediately after the central administration of angiotensin II. Water and salt intake were recorded for the next 2 hours after the introduction of the bottles into the cages. To verify the specificity of action of opioid antagonists animals were submitted to the dessert test, open field and measurement of blood pressure. Data were analyzed by Two-Way ANOVA mixed model followed by Bonferroni as post-hoc test. **Results:** The groups of rats that received i.c.v. injections naltrindole after sodium depletion and central angiotensinergic activation, showed a statistically significant reduction in salt intake when compared to control animals group. Rats receiving norbinaltorphimine injection in the SFO, MnPO and BLA after sodium depletion showed a statistically significant reduction in salt intake when compared to control animals group. The stimulation of delta-opioid receptors in animals full of sodium increased intake of hypertonic saline. **Conclusions:** The present data suggest that the delta-opioid receptors central, and the kappa-opioid receptors located in the SFO, MnPO and BLA appear to play a key role in the expression of the salt acquisition behavior in rats with sodium appetite.

Keys word: Sodium Appetite; Delta-Opioid Receptor; Kappa-Opioid Receptor; Sodium Depleted; Angiotensin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ingestão cumulativa de água e de salina hipertônica 1,5% em animais normonatrêmicos e em animais depletados de sódio canulados no VL.....	52
Tabela 2	Sumário da estatística dos experimentos 1, 2, 3 e 4 realizados em animais canulados no VL.....	65
Tabela 3	Efeitos da administração do agonista seletivo para os receptores kappa-opioides injetado no OSF, MnPO e BLA.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de naltrindole no VL.....	55
Figura 2	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% após microinjeções de deltorfina II em animais depletados de sódio e pré-tratados com naltrindole.....	58
Figura 3	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% após injeções no VL de deltorfina II em animais normonatrêmicos e em animais submetidos à depleção de sódio.....	61
Figura 4	Comparação da ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% e de água em animais tratados com angiotensina II e pré-tratados com naltrindole.....	63
Figura 5	Teste de Campo Aberto e Teste de Sobremesa.....	67
Figura 6	Medida da Pressão Arterial Média.....	69
Figura 7	Comparação da ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% em animais submetidos à depleção de sódio e em ratos normonatrêmicos.....	71
Figura 8	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de norbinaltorfimina no OSF.....	73
Figura 9	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de norbinaltorfimina no MnPO.....	76
Figura 10	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de norbinaltorfimina no núcleo BLA.....	79
Figura 11	Comparação da ingestão de solução salina hipertônica 1,5% aos 120 minutos em animais depletados de sódio e canulados no OSF, MnPO e BLA.....	81
Figura 12	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% após microinjeções de ICI _{199,441} em animais depletados de sódio e pré-tratados com norbinaltorfimina no OSF.....	84
Figura 13	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% após microinjeções de ICI _{199,441} em animais depletados de sódio e pré-tratados com norbinaltorfimina no MnPO.....	87
Figura 14	Comparação da ingestão cumulativa de água e de solução salina hipertônica 1,5% após microinjeções de ICI _{199,441} em animais depletados de sódio e pré-tratados com norbinaltorfimina no núcleo BLA.....	90
Figura 15	Teste de Sobremesa.....	94
Figura 16	Teste de Campo Aberto	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ	Receptor mu-opioide
ADH	Hormônio antidiurético
Ang II	Angiotensina II
ALDO	Aldosterona
AMPc	Adenosina mofosfato cíclico
AT1	Receptores para angiotensina tipo 1
ATP	Adenosina trifosfatada
ATPase	Adenilpirofosfatase
AV3V	Parede anterior do 3º ventrículo cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
BLA	Amígdala basolateral
BST	Leito da estria terminal
Ca^{2+}	Cálcio
CeA	Núcleo central da amígdala
c-fos	Gene de expressão imediata
DAMGO	Agonista dos receptores mu-opioides
Delt II	Deltorfina II, agonista dos receptores delta-opioides
FC	Frequência cardíaca
FOS	Proteína de expressão imediata
FQ	Neuropeptídeo orfanina
H ₂ O _d	Água destilada
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
ICI _{199,441}	Agonista dos receptores kappa-opioides
κ	Receptor kappa-opioide
LEC	Líquido extracelular
LIC	Líquido intracelular
MnPO	Núcleo preóptico mediano
Na^{+}	Sódio
Na_x	Canais sensíveis ao sódio
Nor-bni	Norbinaltorfimina, antagonista dos receptores kappa-opioides
NTI	Naltrindole, antagonista dos receptores delta-opioides
OCV	Órgão circunventricular
ORL 1	Receptor opioide para nociceptina
OSF	Órgão subfornical
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal
PAM	Pressão arterial média
RNAm	Ácido ribonucleico do tipo mensageiro
SKF 10047	Agonista do receptor delta-opioide tipo 1
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema renina-angiotensina
TRP	Canais potencial receptor transiente
VL	Ventrículo lateral
β -END	Beta endorfina
Δ	Receptor delta-opioide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	HOMEOSTASIA DO SÓDIO.....	17
2.2	MECANISMOS NEURAIS QUE CONTROLAM A SEDE E O APETITE POR SÓDIO.....	21
2.3	OPIOIDES E INGESTÃO DE SAL.....	28
3	OBJETIVOS	33
4	METODOLOGIA	
4.1	ANIMAIS	35
4.2	CÁLCULO AMOSTRAL.....	35
4.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	35
4.4	PROTOCOLO DE DEPLEÇÃO DE SÓDIO.....	36
4.5	PROTOCOLO DE INGESTÃO DE ÁGUA E SAL INDUZIDA POR ANGIOTENSINA.....	37
4.6	PROTOCOLO DO TESTE DE SOBREMESA.....	37
4.7	PROTOCOLO DO TESTE DE CAMPO ABERTO	38
4.8	PROTOCOLO DA MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL	38
4.9	DROGAS E MICROINJEÇÕES	39
4.10	HISTOLOGIA	40
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.12	GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
5	RESULTADOS	51
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

Desde a identificação da presença do sistema opioidérgico no sistema nervoso central, diversos estudos tem sido realizados no intuito de esclarecer as propriedades dos opioides endógenos, quais tipos de receptores são ativados por estes, qual a sua distribuição anatômica e a significância funcional deste sistema neuronal (PERT; SNYDER, 1973a; 1973b; SNYDER, 1980).

Ao longo da história o uso de opioides esteve associado principalmente ao seu efeito analgésico na prática clínica. A morfina é o agonista dos receptores mu-opioides mais estudado, seu efeito analgésico é acompanhado por efeitos adversos tais como depressão respiratória, constipação, tolerância e dependência. Agonistas para os receptores delta e kappa-opioides também vêm sendo investigados quanto ao seu papel modulador na analgesia em substituição à morfina. Esses estudos mostram que agonistas dos receptores delta e kappa-opioides apresentam efeitos colaterais diferentes daqueles observados após administração da morfina. Contudo, efeitos colaterais como sedação, disforia e diurese são observados após utilização de agonistas delta e kappa-opioides (SOUKARA ET AL., 2001; HOLZGRABE; BRANDT, 2003; DEHAVEN-HUDKINS; DOLLE, 2004). O esclarecimento de aspectos fisiológicos e fármaco/toxicológicos dos opioides centrais possui indubitável importância, haja vista que este sistema é alvo de fármacos empregados na clínica médica, além de substâncias de uso ilegal.

Além do controle da dor, tem sido demonstrado que o sistema opioidérgico central está envolvido em diversas funções, incluindo atividade sexual, controle da temperatura corporal e da pressão sanguínea e atua no sistema de recompensa, sendo importante para o comportamento motivado de ingestão de alimentos e de abuso de drogas (BARDO; BEVINS, 2000; LE MERRER ET AL., 2009; VUONG ET AL., 2010). Em relação à ingestão de água e ao apetite por sódio, alguns estudos mostram que drogas agonistas e antagonistas opioidérgicas parecem ter efeito modulador sobre este comportamento em resposta a estímulos exógenos que produzem efeito natriorexigênico. A administração i.c.v. de antagonistas mu-opioides parece exercer ação inibitória sobre o comportamento ingestivo de sal e de água enquanto a administração central de seus agonistas parece exercer um papel estimulatório. A injeção central de antagonistas específicos para os receptores mu-opioides, naloxone e

naltrexone, inibe a ingestão de água em ratos mantidos sob privação hídrica (BRYANT ET AL., 1985). Outros trabalhos mostram que a ingestão de solução salina hipotônica ou isotônica é reduzida por estes mesmos antagonistas quando administrados centralmente em ratos privados de água (BODNAR ET AL., 1995). Mais recentemente, foi mostrado que a injeção do agonista específico para os receptores mu-opioides, DAMGO, aumenta a ingestão de sal, de sacarina e de álcool em ratos submetidos ao protocolo de privação de água assim como em rato não privados (ZHANG; KELLEY, 2002).

O aumento na ingestão de sódio está associado a alguns quadros patológicos tais como síndrome metabólica, hipertensão arterial, doenças cardiometabólicas e obesidade (BI et al., 2014; LICHTENSTEIN ET AL., 2014; NERBASS ET AL., 2014). O apetite por sal tem sido extensamente estudado com base em diferentes modelos experimentais que estimulam o apetite específico por sódio em ratos (DE LUCA ET AL., 2010; ANDRADE-FRANZÉ ET AL., 2010; NA; MORRIS; JOHNSON, 2012; MCKINLEY; HARDS; OLDFIELD, 2003). Alguns autores sugerem que o apetite por sódio possui valor hedônico, haja vista o aumento na ingestão de salina hipertônica por animais que sofrem o desafio homeostático da depleção deste íon (NA; MORRIS; JOHNSON, 2012; D'AQUILA ET AL., 2012). Diversos sistemas neurotransmissores parecem participar do controle do apetite por sódio, mas o papel do sistema opioidérgico central ainda não é claro. Assim, decidimos investigar o papel dos receptores delta-opioides central no controle do apetite por sal em dois modelos de indução do apetite por sódio: depleção de sódio e ativação angiotensinérgica central.

Dados anteriores de nosso laboratório mostram que injeção i.c.v. de antagonista kappa-opioide inibe em modo dose dependente a ingestão de salina hipertônica em dois modelos de estudo: animais depletados de sódio e animais que sofreram ativação angiotensinérgica central (NASCIMENTO ET AL., 2012). Partindo destes resultados de bloqueio geral dos receptores kappa-opioides decidimos estudar o papel destes receptores localizados em três áreas cerebrais: OSF, MnPO e BLA sobre o apetite específico por sódio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HOMEOSTASIA DO SÓDIO

O equilíbrio dos líquidos corporais é estritamente regulado por um sistema endócrino e neural. Após mudanças na volemia ou na composição do líquido do compartimento extracelular (LEC) esse sistema de controle desencadeia ações compensatórias apropriadas para trazer de volta os níveis homeostáticos normais.

Na equação do equilíbrio hidroeletrolítico, a água e os íons de sódio (Na^+) são duas variáveis primárias relevantes e ajustes na ingestão e excreção de água e Na^+ mantêm este equilíbrio e são fundamentais para manutenção da volemia (ANTUNES-RODRIGUES ET AL., 2004; GEERLING; LOEWY, 2008; HARRING; DEAL; KUO, 2014). Os mecanismos regulatórios da ingestão e excreção de água e Na^+ tem sido tema de vários estudos, porém os mecanismos de controle do apetite por Na^+ ainda não são totalmente compreendidos.

O Na^+ é o soluto mais abundante no meio extracelular (em torno de 140 mM) e sua concentração é o principal determinante da osmolaridade do LEC, cerca de 290 mOsm/L. A osmolaridade extracelular é regulada primariamente pela ingestão e excreção de água, enquanto o volume do LEC é diretamente proporcional ao conteúdo de Na^+ total no corpo. Assim, quando Na^+ é excretado em excesso o volume plasmático sofre uma redução, ao contrário, quando o Na^+ é ingerido em excesso ou retido o volume plasmático é elevado. Com isso, apesar de o Na^+ representar menos que 1% em peso, quando comparado aos outros eletrólitos que compõem o LEC, a massa de Na^+ necessária para restaurar o volume extracelular é muito pequena, evidenciando sua importância na manutenção da volemia (VERBALIS, 2003; DANIELS; FLUHARTY, 2004; GEERLING; LOEWY, 2008). A importância do Na^+ fica evidente quando ocorre aumento na sua concentração sanguínea, hipernatremia, resultando em condições patológicas tais como síndrome metabólica e hipertensão arterial sistêmica. Por outro lado, a deficiência de Na^+ , hiponatremia, pode resultar em complicações neurológicas resultantes do movimento transcelular de água do LEC (hipotônico) para os neurônios ocasionando sintomas como dor de cabeça, letargia, confusão mental e, em uma condição hiponatrêmica mais severa, pode levar a convulsões, ao coma e à morte (LIN; LIU; LIM, 2005; HARRING; DEAL; KUO, 2014).

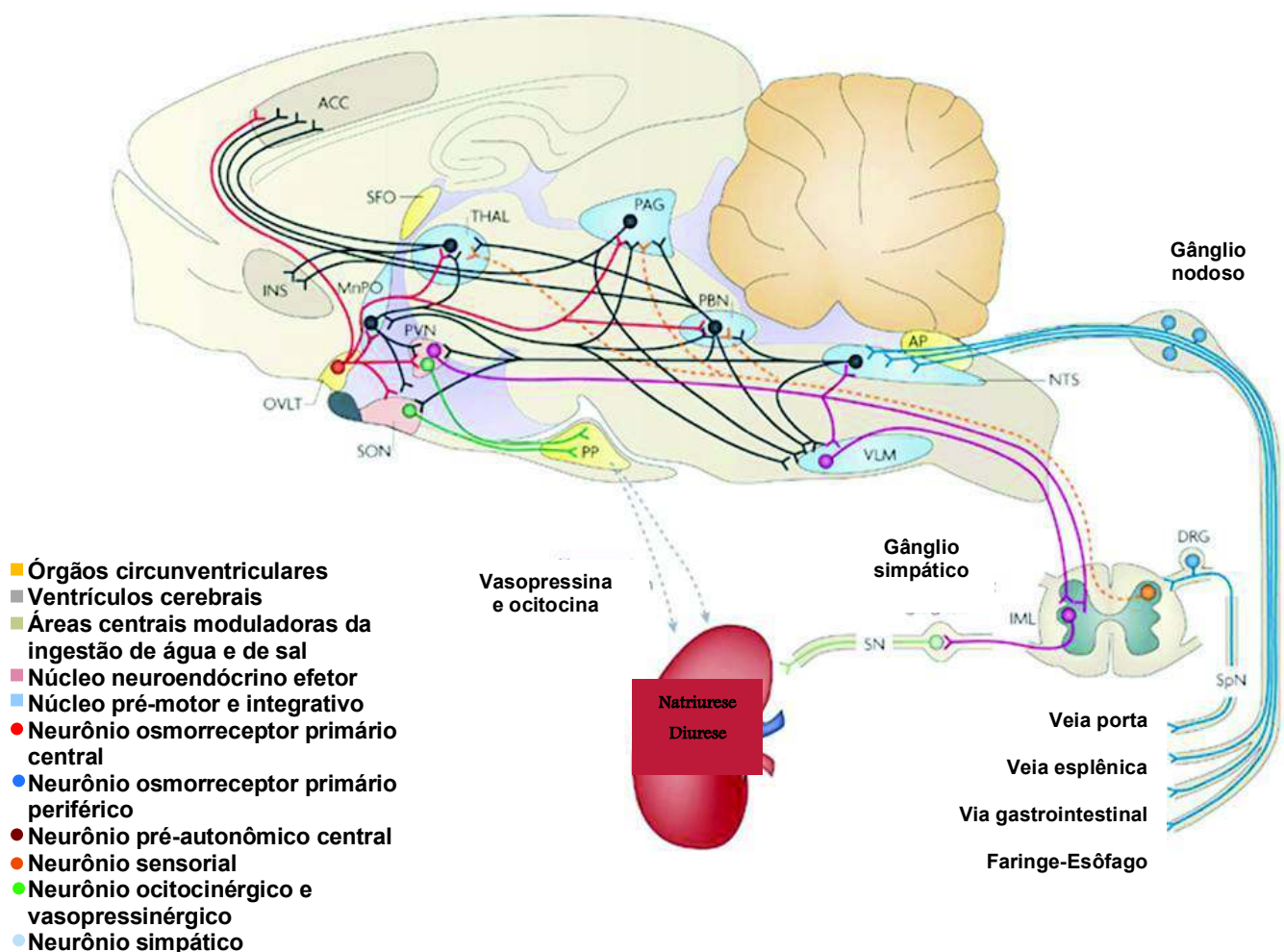
A regulação da concentração de Na^+ e da osmolaridade do LEC depende tanto do controle da ingestão quanto da excreção urinária. Esta regulação envolve mecanismos hormonais e neurais. O controle da excreção renal de Na^+ é regulado pela aldosterona (ALDO) e pelo hormônio natriurético atrial, enquanto a água excretada depende do hormônio antidiurético (ADH) que é secretado em condições de aumento da osmolaridade plasmática. O ADH atua no túbulo contornado distal e no túbulo coletor aumentando a expressão de aquaporinas que resulta em aumento na reabsorção da água livre, tendendo a diluir o plasma e reequilibrar a osmolaridade. Aumento de 1 a 2% na osmolaridade plasmática é suficiente para estimular a secreção do ADH, enquanto redução de 5% do volume sanguíneo é necessário para estimular a síntese desse hormônio (BOURQUE, 2008; GEERLING; LOEWY, 2008; HARRING; DEAL; KUO, 2014).

Os mecanismos de controle da ingestão de água e Na^+ são mais complexos, não são totalmente compreendidos e parecem depender de comportamentos motivados. Alguns estímulos fisiológicos estão envolvidos no estímulo da sede como, por exemplo, o ressecamento da mucosa da boca que gera estímulos sensoriais percebidos por receptores na cavidade orofaríngea, cujos sinais são enviados por vias neurais ao tronco cerebral e deste para regiões prosencefálicas envolvidas no mecanismo da sede. Um indivíduo com sede decorrente deste estímulo pode sentir saciedade imediata à ingestão de água mesmo antes desta ter sido absorvida pelo trato gastrointestinal e antes de qualquer alteração da osmolaridade extracelular (JOHNSON; THUNHORST, 1997). A ingestão hídrica nessas circunstâncias promove alívio parcial e temporário da sede, mas a sensação de saciedade não é de longa duração (JOHNSON, 2007).

Diversos mecanismos estimulam a sede, mas a osmolaridade merece especial atenção haja vista a distribuição dos líquidos entre os compartimentos intra e extracelular que é determinada principalmente pelo efeito osmótico de solutos de baixo peso molecular, como Na^+ , cloreto (Cl^-) e outros eletrólitos, que atuam sobre a membrana celular (BOURQUE ET AL., 2007; BOURQUE, 2008). A composição e a osmolaridade dos líquidos corporais são mantidas em faixas estreitas de variação, determinadas pela regulação de mecanismos que controlam de forma independente a sede, diurese, apetite por sal e natriurese, como pode ser observado no esquema 1. Diversos estudos sugerem que este controle homeostático é mediado por neurônios presentes em estruturas periventriculares tais como OSF e MnPO, sensíveis ao aumento

ou a redução da osmolaridade e com deficiência na barreira hematoencefálica (BHE). As células epiteliais que compõem a BHE interagem com os neurônios das estruturas periventriculares e atuam como mediadores entre o líquido plasmático e o encéfalo, regulando o transporte e o metabolismo de substâncias presentes na circulação sanguínea (DANIELS; FLUHARTY, 2004; BOURQUE ET AL., 2007).

A ingestão de Na^+ é o único mecanismo para reposição do sódio perdido na urina. A motivação para buscar ou ingerir alimentos que contêm Na^+ é aparentemente inata e é referida como apetite por sódio. Do ponto de vista comportamental este apetite é demonstrado por mamíferos herbívoros e/ou onívoros,



Esquema 1 - Ilustração de corte sagital de encéfalo de rato mostrando as estruturas envolvidas no controle osmótico da resposta osmorregulatória, mostradas em um único plano. ACC, córtex cingulado anterior; AP, área postrema; DRG, gânglio dorsal; IML, núcleo intermediolateral; INS, ínsula; MnPO, núcleo preóptico mediano; NTS, núcleo do trato solitário; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; PAG, substância periaquedutal; PBN, núcleo parabraquial; PP, pituitária posterior; PVN, núcleo paraventricular; SFO, órgão subfornical; SN, nervo simpático; SON, núcleo supraóptico; SpN, nervo esplênico; THAL, tálamo; VLM, medula ventrolateral osmorregulatória (modificado de BOURQUE, 2008).

bem como aves e répteis e caracteriza-se por alterações na preferência natural em ingerir alimentos que contenham Na^+ em maior concentração (JONHSON, 2007).

Semelhante a muitos animais humanos mostram maior tendência a ingerir alimentos ricos em Na^+ . Na língua há sensores específicos para detectar o sabor salgado e há um circuito cerebral de recompensa que os motiva a ingerir alimentos que contenham Na^+ (MORIMOTO; CASSELL; SIGMUND, 2002; GOLDSTEIN; LESHEM, 2014). Assim como o que é observado em roedores, humanos desenvolvem avidez por Na^+ ao longo da vida quando são privados deste íon antes do nascimento (LESHEM, 2009).

A reação do animal em aumentar a ingestão de soluções salinas apresenta uma função de “U” invertido (DANIELS; FLUHARTY, 2004). Ratos que se encontram em condição normonatremica normalmente rejeitam soluções com concentração de sódio muito baixa ou muito alta. A preferência é maior por solução salina 0,9% que é isotônica ao plasma. Solução salina com concentração maior que 1% é naturalmente aversiva para ratos. No entanto, ratos neonatos que recebem injeção intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídio renina e levados a ingerir solução salina hipertônica apresentam ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) cerebral 24 horas após essas injeções e demonstram preferência por ingerir soluções hipertônicas 72 horas após essa ativação cerebral (MOE, 1986; LESHEM, 1999). Outros estudos mostram que em ratos deficientes de Na^+ há mudanças nas curvas de preferência/aversão às diferentes doses de solução salina (isotônica e hipertônica, respectivamente). A preferência-aversão a uma solução salina é demonstrada por meio do teste de reação ao sabor, em que reações aversivas à solução salina hipertônica desaparecem em animais depletados de sódio (ANDRADE ET AL., 2011; NA; MORRIS; JOHNSON, 2012).

Alguns modelos experimentais foram criados para estimular o apetite por sódio em animais de laboratório. O modelo pioneiro baseou-se na perda de Na^+ na urina em decorrência da retirada das glândulas adrenais (RICHTER, 1936). Outro modelo experimental empregado para mimetizar essa condição se dá pelo uso farmacológico de diuréticos como a furosemida (STARR; ROWLAND, 2006; NA ET AL., 2007). A furosemida é um potente diurético de alça que age sobre os canais cotransportadores de $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ localizados na membrana luminal das células epiteliais do ramo ascendente espesso da alça de Henle. O bloqueio deste cotransporte produz aumento no débito

urinário de Na^+ , Cl^- , K^+ , água e outros eletrólitos, em até vinte e cinco vezes acima do normal em apenas alguns minutos, dependendo da dose do diurético administrado. A combinação do uso de diurético com dieta hipossódica e livre ingestão de água permite a reposição do volume, mas gera intensa hiponatremia levando os animais a buscar e ingerir especificamente solução salina hipertônica.

Animais que não sejam submetidos a uma condição fisiológica de déficit de Na^+ também podem ser estimulados a desenvolver o apetite por Na^+ . Este é o caso da hipovolemia que pode ser alcançada pela administração de coloide subcutâneo, tal como o polietileno glicol que sequestra líquido do plasma no espaço intersticial alterando o volume do LEC e estimulando o apetite por Na^+ (SMITH ET AL., 2007; STRICKER; GRIGSON; NORGREN, 2013). Outros modelos de estudo podem ser citados, tais como: privação hídrica (DE LUCA ET AL., 2007; 2010), administração exógena de angiotensina (WILSON ET AL., 2005; THORNTON; OMOUESSI; FALCONETTI, 2007), injeção de bloqueadores de canais de sódio (ROITMAN; BERNSTEIN, 1999; FRINDT ET AL., 2002), depleção de sódio associada a aumento da angiotensina pela administração conjunta de furosemida e captopril (DE GOBBI ET AL., 2009; ANDRADE ET AL., 2015) e lesão em áreas cerebrais específicas envolvidas no controle do equilíbrio hidrossalino (OGIHARA ET AL., 2009; STRICKER; GRIGSON; NORGREN, 2013).

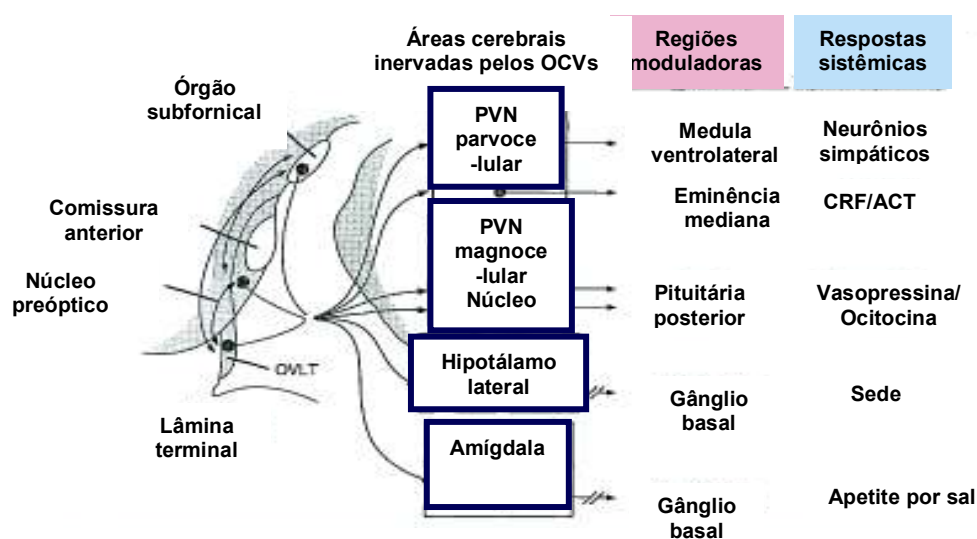
Cada um desses modelos fornece contribuição única e valiosa para conhecimento dos mecanismos endócrinos e neurais que modulam a homeostasia hidrossalina.

2.2. MECANISMOS NEURAIIS QUE CONTROLAM A SEDE E O APETITE POR SÓDIO

Os animais vertebrados possuem pequenas estruturas periventriculares denominadas de órgãos circunventriculares (OCVs) que possuem BHE constituída por capilares fenestrados, sem junções aderentes entre as células endoteliais e formam uma rede vascular complexa extensa que os torna distintos dos demais capilares cerebrais (GLOOR ET AL., 2001; ENGELHARDT, 2003; CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010). Essas características maximizam a área de exposição de substâncias oriundas da corrente sanguínea. Além disso, os OCVs contêm diferentes tipos de receptores para

uma variedade de substâncias produzidas na circulação periférica, como o peptídeo regulatório angiotensina, esteroides e íons específicos (NODA, 2007; MIMEE; SMITH; FERGUSON, 2013; COBLE ET AL., 2014; UFNAL; SKRZYPECKI, 2014). Esses aspectos anatômicos tornam os OCVs sensores potenciais na monitoração dos constituintes da circulação periférica e capazes de transportar estas informações, enviando projeções aferentes aos centros de controle hipotalâmico e autonômico, modificando o comportamento dos animais, como pode ser observado no esquema 2.

Dentre os OCVs, o OSF se constitui em uma importante área de estudo sobre o equilíbrio hidrossalino. O OSF está localizado medialmente no teto do 3º ventrículo cerebral e consiste primariamente de corpos celulares e de aferentes que trazem informações oriundas da periferia (SMITH; FERGUSON, 2010). O OSF contém uma variedade de receptores para diversas substâncias e neurotransmissores. Neurônios com receptores para angiotensina II (AII) estão presentes em alta concentração no OSF, receptores de AII tipo 1 (AT1), que podem ser ativados em condição de desidratação aguda, enquanto que os receptores para AII tipo 2 (AT2) são ativados após injeções i.c.v. de AII (VANHOUTEN ET AL., 1980; MENDELSON ET AL., 1984; HWANG; WU; SEVERS, 1986; NAZARALI; GUTKIND; SAAVEDRA, 1987; PLUNKETT ET AL., 1987). Neurônios com sítios ativos para o peptídeo natriurético atrial foram identificados no OSF e é possível que estejam associados à inibição da secreção de ADH (QUIRION ET AL., 1984; CASTREN; SAAVEDRA, 1989; JURZAK; MULLER; GERSTBERGER, 1995).



Esquema 2 - Ilustração de corte sagital do encéfalo de rato mostrando a organização das estruturas que compõem a lâmina terminal e suas projeções neuronais para áreas envolvidas na regulação do equilíbrio hidrossalino (modificado de JOHNSON, 2007).

O OSF é constituído por duas regiões distintas, uma região central e outra periférica, com diferentes projeções neuronais e diferentes sítios ligantes (MCKINLEY ET AL., 1998). Projeções neuronais eferentes monossinápticas e polissinápticas são enviadas a sítios de controle autonômico e neuroendócrino localizados no hipotálamo, tais como núcleo paraventricular e supraóptico. Neurônios eferentes são enviados a núcleos adjacentes à parede anterior do 3º ventrículo cerebral (AV3V), especialmente ao núcleo preóptico mediano (MnPO) e ao órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) que, por sua vez, fazem comunicação com os núcleos paraventricular e supraóptico (LIND; VANHOESEN; JOHNSON., 1982; MISELIS; SHAPIRO; HAND, 1979). Estudos anatômicos sugerem que os neurônios do OSF possuem dendritos relativamente compactos e não recebe uma extensa rede neuronal (DELLMAN, 1998) reforçando sua principal função como receptor das informações homeostáticas que se originam periféricamente.

Sinais gustatórios referentes ao sabor salgado são enviados aos neurônios que inervam o núcleo do trato solitário através dos nervos craniais VII, IX e X (FRANKMANN; SOLLARS; BERNSTEIN, 1996; ROITMAN; BERNSTEIN, 1999; BLONDE; GARCEA; SPECTOR, 2006). Neurônios sensíveis às variações de osmolaridade estão distribuídos no sistema nervoso central (SNC) e periférico. No SNC estão presentes em áreas cerebrais como os OCVs e estruturas presentes na lâmina terminal, tais como o OVLT e OSF (BOURQUE ET AL., 2007; NODA, 2007; NODA; HIYAMA, 2005). Estudos de imagem por meio de ressonância magnética funcional revelam que AV3V é ativada durante aumento da osmolaridade em animais e humanos sugerindo a presença de osmossensores nessa região cerebral (EGAN ET AL., 2003; MORITA ET AL., 2004). Injeção de salina hipertônica no 3º ventrículo cerebral de ratos estimula a secreção de ADH e a resposta dipsogênica enquanto lesões no OSF, no MnPO e no OVLT reduzem esta resposta dipsogênica (MANGIAPANE ET AL., 1984; BUGGY ET AL., 1979; MCKINLEY ET AL., 2004). Esses estudos sugerem que sensores para variações na osmolaridade e no volume do líquido intracelular (LIC) e do LEC estão presentes nessas regiões cerebrais.

A existência de um circuito neuronal inibitório e excitatório que controla o equilíbrio hidrossalino foi estabelecida através de diversos estudos e abrangendo diferentes protocolos. Estudos neuroanatômicos e métodos de mapeamento funcional utilizando os modelos de estimulação elétrica, ativação metabólica, lesão eletrolítica e

expressão de genes imediatos como *c-fos* mostram o envolvimento de diferentes áreas encefálicas no processamento das informações sobre o volume do LEC e do LIC. As áreas mais implicadas nesses processos são a área postrema, o núcleo do trato solitário, núcleos ventral e lateral da medula nas suas porções caudal e rostral, o núcleo parabraquial, OSF, MnPO, OVLT, hipotálamo nas suas porções magnocelular e parvocelular, núcleo supraóptico, amígdala, leito do núcleo da estria terminal (BST), hipotálamo lateral, dorsomedial e ventromedial, *locus coeruleus*. Nestes estudos foi observada uma coleção de estruturas e suas conexões, constituindo uma rede neural que integra informações acerca do balanço hidroeletrólítico (COVIAN; ANTUNES-RODRIGUES, 1963; DORN; PORTER, 1970; ANDERSSON, 1977; JOHNSON; THUNHORST, 1997; FITZSIMONS, 1999; DE LUCA ET AL., 2002; GODINO ET AL., 2010). O sistema constituído pela integração neurohipófise-hipotálamo se constitui na principal via de manutenção do equilíbrio hidrossalino através do mecanismo inibitório em que ocitocina é secretada em resposta a estímulos osmóticos e não-osmóticos (ANTUNES-RODRIGUES ET AL., 2004; GEERLING; LOEWY, 2008).

O apetite por Na^+ , estimulado pelo modelo de diálise peritoneal, resulta na expressão de *c-fos* em dois momentos, durante o estímulo deste apetite e quando ocorre sua saciedade pelo acesso a solução salina. O padrão cerebral de expressão da proteína FOS permite identificar aumento na densidade de neurônios ativados no OSF, OVLT, núcleos central e medial da amígdala, núcleo supraóptico e núcleo paraventricular durante a fase de depleção de Na^+ induzida pela administração de furosemida (FITCH; PATEL; WEISS, 2000).

Depleções repetidas levam ao aumento de núcleos FOS positivos no OSF, no núcleo basolateral da amígdala (BLA) e no núcleo *accumbens*, sugerindo que as respostas neurais e comportamentais resultantes desta ativação estão associadas com o sistema de recompensa e motivação (NA ET AL., 2007; MCKINLEY; HARDS; OLDFIELD, 1994; FRANCHINI; RUBSTEIN; VIVAS, 2003; GODINO ET AL., 2010). Elevação da osmolaridade do LEC e do líquido cefalorraquidiano elevam a osmolaridade extracelular do OSF e OVLT pelo transporte transcelular de água pelas aquaporinas nas células endoteliais. O transporte de água para o meio extracelular causa retração citoplasmática e abertura dos canais potencial receptor transiente (TRP) dos osmosensores. O influxo de Ca^{2+} através dos canais TRP causa despolarização

desses neurônios e estímulo à síntese de ADH (SHIMIZU ET AL., 2007; SHARIF-NAEINI ET AL., 2008).

Os OCVs possuem também receptores para peptídios vasoativos tais como AII e endotelinas (FITZSIMONS, 1999; HINDMARCH ET AL., 2008). O SRA é ativado em situação de desidratação ou de depleção de Na^+ promovendo ingestão de água e de solução salina bem como reabsorção de água e Na^+ por via renal sob a ação do ADH e ALDO, respectivamente (FERAILLE; DOUCET, 2001; GEERLING; LOEWY, 2008).

Os aferentes que chegam ao OSF são originados das mesmas áreas às quais ele envia seus neurônios eferentes, incluindo o hipotálamo, MnPO, núcleo do trato solitário, rafe, núcleo parabraquial, núcleo *reunions* do tálamo e OVLT, sugerindo importantes comunicações neuronais de caráter recíproco entre essas regiões (LIND; SWANSON; GANTEN, 1984). O mecanismo celular envolvido na detecção e integração das informações sistêmicas foi observado por meio da técnica de mapeamento funcional da proteína FOS. Privação hídrica de 24 e 48 horas induz expressão de FOS nas populações neuronais presentes em estruturas circunventriculares e em outros sítios integrativos, tais como OSF e MnPO, (DENTON; MCKINLEY; WEISINGER, 1996). As informações que chegam ao MnPO são integradas e enviadas a centros cerebrais superiores, como hipotálamo e amígdala, que iniciam uma resposta motivada (MCKINLEY ET AL., 1995; 2004; MANGIAPANE ET AL., 1984).

O MnPO conecta-se anatômica e funcionalmente com os OCVs e é considerado área integrativa das informações sistêmicas envolvendo o balanço hidromineral. Parte da conexão OSF/MnPO envia informações osmóticas do LEC relacionadas com o balanço hidrossalino (MANGIAPANE ET AL., 1984; MCKINLEY ET AL., 1999; GROB; MOUGINOT, 2005). Informações de neurônios osmossensíveis também chegam ao MnPO originárias do OVLT e do núcleo do trato solitário (SAPER; LEVISOHN, 1983; ANDERSON; BRUNI; KAUFMANN, 1990). Além disso, o MnPO apresenta conectividade com outras subregiões da área preóptica com outras áreas hipotalâmicas como o núcleo paraventricular e regiões do tronco cerebral que permitem ao MnPO participar da modulação da sede e do apetite por sódio e outras funções não relacionadas com o equilíbrio hidrossalino como ingestão alimentar e termorregulação (MISELIS, 1981; LIND; VAN HOESEN; JOHNSON, 1982; SAPER; LEVISOHN, 1983; SWANSON; LIND 1986; OLDFIELD; HARDS; MCKINLEY, 1992; LARSEN; MIKKELSEN, 1995).

A amígdala é uma estrutura complexa que compõe o sistema límbico, localizada na porção medial do lobo temporal e interconectada com estruturas subcorticais. Essa estrutura parece exercer uma influência regulatória sobre muitas funções do SNC. A amígdala dos mamíferos possui duas divisões nucleares principais: um grupo filogeneticamente mais antigo, núcleos medial, central e cortical, e um grupo filogeneticamente mais recente formado pelos núcleos lateral e basal (GEWIRTZ; DAVIS, 1997). O grupo cortico-medial da amígdala é maior nos animais inferiores enquanto que o grupo basolateral é maior em primatas alcançando um alto grau de diferenciação morfológica em humanos (BLANCHAR; BLANCHAR, 1972; CANTERAS; SWANSON, 1992).

Os núcleos da amígdala e seus subnúcleos apresentam características citoarquitetônicas, histoquímicas e de conexões intra e internuclear distintas (ALHEID; HEIMER, 1988; MCDONALD, 1998). O grupo nuclear basolateral localiza-se na porção mais profunda da amígdala e é composto pelos núcleos lateral e basal que juntos são chamados de núcleo basolateral. Além do núcleo BLA o núcleo basal acessório, também denominado de basomedial, compõe este grupo. O conjunto formado por esses três núcleos é denominado complexo basolateral. O segundo grupo nuclear da amígdala, corticomedia, é composto pelo núcleo lateral do trato olfatório, leito do núcleo do trato olfatório acessório, pelos núcleos corticais anteriores posterior e pelo córtex periamigdalóide. O grupo nuclear centromedial da amígdala localiza-se na porção dorso-medial do complexo amigdalóide e é formado pelos núcleos medial e central da amígdala e pela parte amigdalóide do BST (JOLKKONEN; PITKANEN, 1998; SAH ET AL., 2003).

Outras classificações têm sido propostas com base no conhecimento obtido acerca das conexões interneuronais presentes na amígdala e com base em sua heterogeneidade estrutural e funcional. A amígdala envia projeções para o BST e para a substância inominata e essas estruturas apresentam conexões eferentes similares às projeções descendentes da amígdala sugerindo, então, que o núcleo centromedial da amígdala e o BST podem ser denominados de amígdala estendida (ALHEID; HEIMER, 1988).

A amígdala está envolvida na modulação de diversas funções fisiológicas associadas a estímulos ambientais e eventos de reforço comportamental, especialmente evidentes em estudos de condicionamento aversivo. Estudos comportamentais

demonstram o envolvimento de diferentes grupos neuronais na modulação da ansiedade e do medo (LEDOUX, 2003; KNOLL ET AL., 2011; BUTLER ET AL., 2012; CARVALHO ET AL., 2013). O núcleo BLA é um substrato crítico para a modulação de diferentes comportamentos. Alguns estudos sugerem seu envolvimento na aprendizagem condicionada pelo método Pavloviano, medo condicionado, e pela atribuição de valores a um comportamento aprendido, no controle da atenção e da vigilância, na memória emocional e regulação da ansiedade e no comportamento de busca por drogas de abuso (GEWIRTZ; DAVIS, 1997; GALE ET AL., 2004; TRUITT ET AL., 2009; PESSOA, 2011; KNOLL ET AL., 2011). Em situações de estímulo emocional, influenciado ou não por hormônios do estresse, o núcleo BLA facilita a consolidação da memória de longo prazo em outras estruturas cerebrais cuja memória fica estocada. Isto se deve à extensa conectividade característica deste núcleo (BLANK ET AL., 2014; NONAKA ET AL., 2014).

Alguns estudos fornecem evidências quanto ao envolvimento da amígdala na modulação do apetite por Na^+ . A amígdala é um núcleo que apresenta receptores para ALDO e é provável que a ativação desses receptores esteja envolvida na mediação da regulação da ingestão de sódio (DENICOLA; GRILLO; GONZALEZ, 1992; MCEWEN ET AL., 1986; NITABACH; SCHULKIN; EPSTEIN, 1989; SAKAI ET AL., 1996; SCHULKIN; MARINI; EPSTEIN, 1989; ZHANG; EPSTEIN; SCHULKIN, 1993). Além disso, imunorreatividade a angiotensina também foi evidenciada na amígdala (MENDELSON ET AL., 1984). O núcleo CeA também apresenta neurônios angiotensinérgicos bem como receptores para mineralocorticoides sendo postulado como possível sítio de interação entre AII e ALDO que agem sinergicamente na indução do apetite por Na^+ , em condições de depleção de sódio corporal (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; THORNTON; NICOLAIDIS, 1994). Estudos utilizando o modelo de lesão eletrolítica no núcleo CeA sugerem que ele exerce papel modulador sobre a ingestão de solução salina. Animais depletados de sódio ou submetidos a outros modelos que estimulam o apetite por Na^+ apresentam uma redução na ingestão de solução salina e, em alguns casos, chegam a abolir completamente esta ingestão (FLYNN ET AL., 1991; GALAVERNA ET AL., 1992; ZARDETTO-SMITH; BELTZ; JOHNSON, 1994). Lesões eletrolíticas bilaterais no núcleo CeA de ratos, também canulados bilateralmente no núcleo parabraquial lateral, abolem completamente a ingestão de solução salina a 0,3M após injeções bilaterais de monoxindina. Redução no

aumento da ingestão foi também observada após injeções bilaterais de metisergida (ANDRADE-FRANZÉ ET AL., 2010).

2.3. OPIOIDES E INGESTÃO DE SAL

Dentre as diversas vias neuromoduladoras envolvidas na regulação da homeostase hidrossalina o sistema opioidérgico central parece exercer importante contribuição nesse mecanismo homeostático. Tanto as vias opioidérgicas quanto seus receptores estão vastamente distribuídos no sistema nervoso central, inclusive em áreas envolvidas no equilíbrio hidroeletrólítico como hipotálamo, BLA, CeA, OSF, MnPO, área tegmental ventral, núcleo do trato solitário e núcleo ambíguo (DEPAOLI ET AL., 1994; MANSOUR ET AL., 1987; 1994; 1995; GACKENHEIMER ET AL., 2005).

A existência de múltiplas formas de receptores opioides foi postulada inicialmente por Martin e colaboradores (1976) com base na tolerância cruzada e síndrome de abstinência em cães. Os tipos básicos definidos foram μ ou receptor para morfina (μ), kappa ou receptor para ketociclozacin (κ) e sigma para o agonista SKF 10047. As drogas com afinidade para o receptor κ foram distinguidas daquelas para o receptor μ pela ausência de bradicardia e por falhar na supressão da síndrome de abstinência. Em contraste o SKF 10047 produziu uma ativação geral do SNC, incluindo dilatação pupilar, taquipnéia e taquicardia (PASTERNAK; CARROLLBUATTI; SPIEGEL, 1981; SU, 1982).

Com o desenvolvimento de ligantes opioides específicos foi possível a identificação de outros tipos de receptores opioides. O isolamento e identificação dos heptapeptídeos Leu- e Met-encefalina revelou um receptor com afinidade para encefalina denominado de receptor delta (ROSENBAUM ET AL., 1984). O receptor opioide para o peptídeo orfanina (ORL 1) se estabeleceu na literatura após identificação do ligante endógeno para esse receptor, o heptadecapeptídeo denominado orfanina FQ também conhecido como nociceptina (MOGIL; PASTERNAK, 2001).

Todas as dinorfinas e neo-endorfinas mostram afinidade κ , mas dinorfina A, sequência 1-8, retém capacidade de ligação ao receptor δ e dinorfina A, sequência 1-13, tem alta afinidade aos receptores μ e κ . A dinorfina A também pode apresentar afinidade para o receptor ORL 1, haja vista a homologia estrutural entre elas. A β -END, derivada da proopiomelanocortina, tem afinidade μ , δ e épsilon sendo preferencial para

δ (CHANG ET AL., 1979; SCHULZ; WUSTER; HERZ, 1981; WATSON ET AL., 1982; AKIL ET AL., 1984; KELSEY ET AL., 1986). Numa situação *in vivo*, o peptídeo interage com diversos neurotransmissores e com uma gama de receptores na fenda sináptica, podendo apresentar uma relação de afinidade diferente da mostrada nos estudos *in vitro*.

Os receptores opioides pertencem à subfamília A de receptores acoplados à proteína G. Eles possuem um domínio extracelular N-terminal, com sete hélices transmembrana ligadas a três domínios intracelulares e apresentam três domínios extracelulares e um domínio intracelular C-terminal, possivelmente formando uma quarta alça intracelular. As sete hélices transmembrana são arranjadas sequencialmente formando uma estrutura helicoidal densa que, junto com o domínio extracelular do receptor, fornece uma interface dinâmica para os ligantes opioides. Os receptores opioides apresentam cerca de 60% de homologia nas hélices transmembrana e grande diversidade na alça extracelular e nas porções terminais C e N. Além disso, esses receptores apresentam resíduos altamente conservados, característicos da família à qual pertencem responsáveis pela afinidade ligante-receptor (FILIZOLA; LAAKKONEN; LOEWY, 1999; TRECOT ET AL., 2008).

Os receptores opioides estão acoplados a subunidades alfa de proteína $G_{i2\alpha}$, $G_{i3\alpha}$ e $G_{o2\alpha}$ e podem interagir com essas proteínas ativando diversas vias no ambiente intracelular que pode resultar em efeitos inibitórios ou excitatórios. A ligação do receptor à proteína G pode depender de diferenças na sequência de proteínas das alças e à carga elétrica dos radicais dos receptores (PERT; SNYDER, 1973b; EVANS ET AL., 1992; MOGIL; PASTERNAK, 2001; EVANS ET AL., 2010). Quando o peptídeo se liga ao receptor opioide a guanosina bifosfato é convertida em guanosina trifosfato causando dissociação do trímero da proteína G em dois componentes ativados – subunidade alfa e o complexo beta/gama. A subunidade alfa age sobre o sistema efetor por inibição da via da adenil ciclase que atua principalmente regulando canais iônicos, especialmente no aumento na condutância ao K^+ e na inativação dos canais de cálcio (MUELLER; HALLERMANN; SWANDULLA, 1999).

Apenas um grupo de quatro genes homólogos é responsável pela existência dos múltiplos receptores opioides. Três deles codificam os receptores μ , δ e κ e o quarto codifica ORL 1, com uma sequência 55% semelhante aos outros receptores (SIMONIN ET AL., 1995; CLARKE ET AL., 2002). Apesar disso, há heterogeneidade

farmacológica e fisiológica nos fenótipos apresentados que podem ser evidenciadas através de modificações pós-translacionais, *splicing* de RNAm alternativo, homo e heterodimerização (AKIL ET AL., 1984; MOGIL; PASTERNAK, 2001; PAN ET AL., 2005; HOJO ET AL., 2008; WALWYN ET AL., 2009; PASTERNAK, 2010).

Alguns trabalhos sobre comportamento ingestivo de água e de sal têm mostrado que drogas agonistas e antagonistas opioidérgicas parecem ter efeito no comportamento de ingestão de água e de sal em resposta a AII e a outros agentes dipsogênicos e natriorexigênicos. A administração de injeção i.c.v. dos opioides endógenos β -End, Leu-encefalina ou Met-encefalina inibe a ingestão de água induzida por AII em ratos normoidratados. Este efeito é bloqueado pelo antagonista dos receptores opioides subtipo μ , naloxone (DE OLIVEIRA; DE LUCA; MENANI, 2008). Mais recentemente foi mostrado que a injeção do agonista μ , DAMGO, aumenta a ingestão de sal, mas mantém inalterada a ingestão de água, quando os animais são submetidos ao protocolo de privação hídrica (ZHANG; KELLEY, 2002).

A administração sistêmica de agonistas dos receptores μ sobre o apetite por sal foi investigada, animais depletados de sódio aumentam a ingestão de sal quando injetados com morfina, agonista μ , em uma dose menor (0,3 mg/kg) enquanto a dose maior (3,0 mg/kg) reduz essa ingestão. Ao contrário o naltrexone, antagonista μ , produz efeito inibitório sobre a ingestão de sal, mas não altera a ingestão de água (HUBBEL; MCCUTCHEON, 1993). Em estudo semelhante animais pré-tratados com agonistas μ , κ e δ , apresentam redução no comportamento ingestivo de água (WHITE ET AL., 2008). O naloxone, outro antagonista μ , injetado subcutaneamente reduz a ingestão de água em animais mantidos em restrição alimentar, mas, quando sofrem privação de água reduzem também a ingestão de sal (OSTROWSKI ET AL., 1981). Em síntese, fica claro que o sistema opioidérgico central está envolvido na regulação do equilíbrio hidrossalino e que, dentre os diferentes tipos de receptores opioides, o subtipo μ exerce uma função importante na regulação hidrossalina, enquanto a participação dos receptores opioides δ e κ nesta função regulatória ainda não está estabelecida.

Dados do nosso laboratório, publicados anteriormente, mostraram inibição do apetite por sódio em ratos depletados deste íon após bloqueio i.c.v. dos receptores kappa-opioides (NASCIMENTO ET AL., 2012). É pertinente questionarmos e investigarmos o papel de outro tipo de receptor opioide para melhor definir a participação do sistema opioidérgico central na modulação do comportamento de

ingestão de sal. Então, assim como os receptores kappa opioides, é possível que haja participação dos receptores delta-opioides centrais no controle do apetite por sódio? Assim, na primeira parte do presente estudo investigamos a ação geral do bloqueio dos receptores delta-opioides sobre a ingestão de sal utilizando o método de injeção intracerebroventricular.

Sabendo que os ventrículos cerebrais são circundados por estruturas circunventriculares que apresentam neurônios opioidérgicos, cabe-nos esclarecer o envolvimento destes neurônios na resposta apresentada na primeira parte do estudo. Dada a resposta obtida sobre a participação dos receptores kappa-opioides centrais observada em resultados anteriores (NASCIMENTO ET AL., 2012) nos perguntamos: quais estruturas periventriculares estariam sendo ativadas e, conseqüentemente, participando da modulação do apetite por sódio? Assim, na segunda parte do presente estudo investigamos a ação específica do bloqueio dos receptores kappa-opioides localizados no OSF e no MnPO sobre a ingestão de sal. Uma vez que o OSF é uma estrutura periventricular que possui neurônios sensíveis às variações de osmolaridade achamos pertinente investigar sua participação na resposta inibitória observada, mediada pelos receptores kappa-opioides. Apesar de o MnPO não fazer parte dos OCVs decidimos investigar sua participação na modulação do apetite por sódio mediada pelos receptores kappa-opioides, uma vez que este núcleo encontra-se localizado adjacente à parede anterior do 3º ventrículo cerebral e se constituir em sítio integrador das informações que chegam ao OSF com outros núcleos cerebrais.

O apetite por sódio é uma resposta fisiológica que resulta em um comportamento motivado de busca e ingestão de sódio. Respostas comportamentais são mediadas por estruturas encefálicas superiores tais como córtex pré-frontal e amígdala. Sabendo que o MnPO apresenta conexões neuronais com o complexo amigdalóide, que este complexo possui neurônios opioidérgicos e que seu núcleo BLA está envolvido no comportamento motivado e nas respostas de recompensa e aversão, nos perguntamos se este núcleo da amígdala estaria envolvido na modulação do comportamento motivado de ingestão de sódio. De um modo geral, a hipótese central deste estudo é que o sistema opioidérgico central é ativado em condições de depleção de sódio e de ativação angiotensinérgica central modulando o apetite por sódio. Podemos ainda levantar a hipótese de que os receptores delta e kappa-opioides distribuídos amplamente no cérebro e mais

especificamente aqueles presentes no OSF, no MnPO e no núcleo BLA podem mediar a ação natriorexigênica da encefalina e da dinorfina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL 1- Investigar o papel dos receptores delta-opioides no sistema nervoso central sobre o apetite por sódio em ratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.A - Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, inibe a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon.

3.2.B – Investigar o efeito da estimulação central dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de agonista seletivo destes receptores, sobre a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon.

3.2.C – Estudar o efeito do bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, sobre a ingestão de sódio induzida pela angiotensina.

3.2.D – Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, altera inespecificamente a ingestão por substâncias palatáveis.

3.2.E - Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, altera inespecificamente a atividade locomotora.

3.2.F - Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, altera a pressão arterial.

3.3. OBJETIVO GERAL 2- Investigar o papel dos receptores kappa-opioides em áreas cerebrais específicas sobre o apetite por sódio em ratos.

3.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.4.A - Estudar o efeito do bloqueio dos receptores kappa-opioides nas áreas cerebrais específicas: OSF, MnPO e BLA, sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon.

3.4.B – Investigar o efeito da estimulação central dos receptores kappa-opioides, por meio de administração de agonista seletivo destes receptores no OSF, MnPO e BLA, sobre a ingestão de sódio em ratos normonatrêmicos.

3.5.C – Verificar se o bloqueio dos receptores kappa-opioides, por meio de administração de antagonista seletivo destes receptores no OSF, MNPO e BLA, altera inespecificamente a ingestão por substâncias palatáveis.

3.6.D - Verificar se o bloqueio dos receptores kappa-opioides, por meio de administração de antagonista seletivo destes receptores no OSF, MnPO e BLA, altera inespecificamente a atividade locomotora.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

O presente estudo utilizou ratos Wistar, com 9 a 11 semanas de idade (270 ± 20 g), provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de 22 ± 2 °C e luz controlada com período de claro\escuro de 12 horas. Ração (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, Brasil) e água foram oferecidos livremente. Os animais foram reutilizados nas sessões experimentais e o cuidado com os mesmos obedeceu aos princípios do bem estar animal. O trabalho foi submetido à análise e aprovação pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA e foi registrado com o número 025/2013.

4.2. CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho da amostra foi determinado por meio do programa BioEstat versão 5.0, considerando-se a diferença mínima entre as médias dos tratamentos de 1 ml de volume por peso corrigido, desvio padrão de 0,5 em 4 tratamentos diferentes, poder do teste em 90% e alfa de 0,05. Com base neste cálculo e nos trabalhos existentes na literatura sobre a mesma temática consideramos que um número de ± 8 animais por tratamento foi satisfatório. Para os testes de preferência pelo sabor, medida do deslocamento e medida da pressão arterial média o número de ± 6 animais por tratamento foi satisfatório. A porcentagem de erro estabelecida é 10%.

4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica sob anestesia com cetamina/xilazina (80-7 mg/kg, 0,110 ml/100 g i.p.), para canulação do VL esquerdo (escolha aleatória), do OSF, do MnPO e canulação bilateral do núcleo BLA. Após assepsia, remoção do escalpe e exposição da sutura sagital foi realizado o implante das cânulas com base nas coordenadas estereotáxicas definidas para cada área cerebral (PAXINOS; WATSON, 1998): **VL esquerdo**: -0,9 mm posterior ao bregma, -1,2 mm lateral a linha sagital e -3,6 mm vertical, a partir da calota craniana; **OSF**: -0,9 mm posterior ao bregma, 0,0 mm lateral a linha sagital e -4,6 mm vertical; **MnPO**: -0,3 mm posterior ao bregma, 0,0 mm lateral a linha sagital e -5,6 mm vertical, a partir da calota craniana; **BLA**: -2,2 mm posterior ao bregma, -5,5 mm lateral a linha sagital e -7,6 mm vertical, a partir da calota craniana. As cânulas foram confeccionadas com agulhas

hipodérmicas de aço inoxidável, diâmetro de 0,7 mm, que foram fixadas ao crânio do animal com acrílico dentário auto-polimerizante. Ao final da cirurgia as cânulas foram ocluídas por mandris removíveis, feitos a partir de fio de aço inoxidável, a fim de evitar o entupimento das mesmas. Após a canulação todos os animais receberam medidas profiláticas pós cirúrgicas com aplicação intramuscular de pentabiótico veterinário (Benzilpenicilinabenzatina; Benzilpenicilina procaína; Benzilpenicilina potássica; Diidroestreptomicina base; Estreptomicina base, 0,2ml/rato) e analgésico (flunixinameglumina, 2,5 g/ml, 0,1ml/100g). No período pós-operatório os animais foram acomodados em caixas plásticas individuais e mantidos em salas com temperatura em torno de 22 ± 2 °C, ciclo claro\escuro (luzes acesas das 07:00 às 19:00 horas). Além disso, tiveram acesso a bebedouros contendo água destilada (H₂O_d), solução salina hipertônica e ração. Neste período os animais foram manipulados diariamente, os mandris eram trocados, o volume dos bebedouros contendo solução salina hipertônica eram medidos para acompanhamento da natriofilia, os bebedouros de H₂O_d e as caixas eram trocados e a ração repostas.

4.4. PROTOCOLO DE DEPLEÇÃO DE SÓDIO

Este procedimento teve como objetivo investigar o envolvimento dos receptores opioides centrais no apetite por sódio em ratos depletados deste íon e se baseou em trabalhos anteriores do Laboratório de Neurociências (LUZ ET AL., 2007). Cinco dias após a canulação central os animais receberam injeção subcutânea de furosemida (Lasix, 20mg/kg, 1ml/rato, i.p.) ou salina isotônica estéril. Com o término da diurese que se segue a esse procedimento, cerca de 3 a 3,5 h, os animais eram mantidos em dieta hipossódica (0,001% Na⁺ e 0,33% K⁺ + H₂O_d) durante 24 h. Os animais controles receberam salina i.p no lugar da furosemida. No experimento, os animais pertencentes ao grupo experimental foram injetados centralmente com a droga, enquanto os animais do grupo controle foram injetados com salina isotônica 0,9%, como explicitado no tópico “Grupos Experimentais”. Após as injeções centrais os animais foram pesados e recolocados em caixas individuais e 15 minutos depois tiveram acesso a bebedouros graduados contendo H₂O e solução salina hipertônica 1,5%, cujo volume foi registrado a partir de 5 minutos após a colocação dos bebedouros, permanecendo até 120 minutos.

Para os animais que tiveram a medida da ingestão de salina hipertônica 1,5% em condição de normonatremia (não foram submetidos ao protocolo de depleção de sódio

através da furosemda) o experimento se realizou no quarto dia pós-cirúrgico onde, após as injeções centrais, os animais foram pesados e recolocados em caixas individuais e 15 minutos depois tiveram acesso a bebedouros graduados contendo H₂O_d e solução salina hipertônica 1,5%, cujo volume foi registrado a partir de 5 minutos após a colocação dos bebedouros e permanecendo até os 120 minutos.

4.5. PROTOCOLO DE INGESTÃO DE ÁGUA E SAL INDUZIA POR ANGIOTENSINA

O modelo da ativação da via angiotensinérgica central para induzir o apetite por sódio é amplamente usado na literatura e mostra-se um método bastante eficaz (NASCIMENTO ET AL., 2012; 2014). Este modelo foi usado apenas para os animais canulados no VL esquerdo. Neste protocolo os animais receberam duas injeções i.c.v. sendo que o antagonista delta-opioide, naltrindole, foi injetado 15 minutos antes da injeção i.c.v. de angiotensina II. O antagonista foi usado nas doses de 5, 10 e 20 nmol/2 µL por animal associado com angiotensina II na dose de 10 ng/2 µL por animal. No quinto dia, os animais foram divididos em três grupos:

Grupo I - primeira injeção i.c.v. de naltrindole + segunda injeção i.c.v. salina isotônica estéril;

Grupo II - primeira injeção i.c.v. de naltrindole + segunda injeção i.c.v. AII;

Grupo III – primeira injeção i.c.v. salina + segunda injeção i.c.v. AII.

Os bebedouros de água destilada e salina foram oferecidos imediatamente após a segunda injeção i.c.v. e a ingestão cumulativa de H₂O_d e de solução salina hipertônica 1,5% foi registrada a partir de 5 minutos após a colocação dos bebedouros e permanecendo até os 120 minutos.

4.6. PROTOCOLO DO TESTE DE SOBREMESA

Consistiu em oferecer uma solução palatável ao animal e verificar se o comportamento ingestivo de solução salina hipertônica foi realmente alterado pelos antagonistas opioides. Este protocolo se baseou em trabalhos anteriores do Laboratório de Neurociências (LUZ ET AL, 2007; NASCIMENTO ET AL., 2012; 2014) em que uma solução de sacarina 0,1% foi oferecida aos animais a partir do primeiro dia, após a cirurgia central. Durante o período pós-operatório os animais foram mantidos em

condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro e temperatura), com bebedouros de água filtrada e ração livre. Durante 4 dias, em um período de 2 horas, os animais eram colocados em uma caixa teste (caixa com o fundo forrado com papel absorvente no lugar da maravalha), a ração era removida e os animais recebiam bebedouros de água filtrada e de solução sacarina 0,1%. Ao final deste procedimento o volume dos bebedouros era registrado e os animais retornavam para caixas com maravalha, ração e bebedouro de água filtrada. 24 horas antes da sessão experimental os animais foram privados de água. No dia do experimento os animais retornaram às caixas teste após administração do antagonista opioide (ver Grupos Experimentais) ou salina. A oferta dos bebedouros contendo água filtrada e solução sacarina 0,1% se deu 15 minutos após as injeções. O volume ingerido foi registrado a partir de 5 minutos após a colocação dos bebedouros durante 120 minutos.

4.7. PROTOCOLO DO TESTE DE CAMPO ABERTO

Consistiu na observação da atividade locomotora dos animais após serem depletados e receberem injeções centrais dos antagonistas opioides. Para tanto, foi usada uma caixa circular de 60 cm de diâmetro e 60 cm de comprimento com uma abertura superior e piso dividido em 8 áreas circulares de igual tamanho (42,43 cm), conforme protocolo descrito por Luz e colaboradores (2007). À medida que os animais se deslocavam, com as quatro patas em cada área, a mesma era contabilizada e o deslocamento quantificado. Para a realização deste teste os animais sofreram depleção por furosemida combinada com dieta hipossódica. No 5º dia receberam as injeções dos antagonistas opioides, para os grupos experimentais, e de salina isotônica estéril, para os animais do grupo controle. O teste foi registrado em vídeo com tempo de corte de 10 minutos e sua análise foi feita pelo método de cegamento.

4.8. PROTOCOLO DA MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL

Consistiu no monitoramento da pressão arterial dos animais por meio da cateterização da artéria carótida comum esquerda, para registro e monitorização da pressão sanguínea e frequência cardíaca e se baseou em trabalhos anteriores do Laboratório de Neurociências (LUZ ET AL., 2007; NASCIMENTO ET AL., 2012; 2014). Para a realização deste teste os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para canulação do VL esquerdo, com peso entre 280 e 300 g. Após o período de habituação, no 4º dia, foram submetidos à canulação da carótida e no 5º dia

foram depletados. Cateteres (PE50) contendo solução salina heparinizada (500 UI/ml) foram inseridos na artéria carótida esquerda dos animais, sob anestesia com cetamina/xilazina (80-7 mg/kg, 0,110ml/100 g i.p.). Os cateteres foram exteriorizados subcutaneamente na região dorsal do pescoço. Os animais sofriam heparinização 4 horas antes dos experimentos e recebiam injeções i.c.v. de NTI (ver Grupos Experimentais). Antes de iniciar a sessão experimental, extensores de polietileno (PE50) ligados aos transdutores foram conectados à cânula carótida para permitir o registro da pressão sanguínea e da frequência cardíaca. A pressão sanguínea era continuamente monitorada através do cateter posicionado na artéria carótida conectado a um transdutor de pressão (World Precision Instruments) cujo sinal era amplificado e digitalizado por um programa analógico-digital (AqDados, Lynx Tecnologia Eletrônica, São Paulo, Brasil, versão 7.0) e gravado (1 kHz) em um computador para posterior análise. A pressão arterial média foi calculada da pressão sistólica e diastólica e a frequência cardíaca determinada pela pulsação da pressão arterial, usando o software Spike, versão 2.0, desenvolvido pela Biopac Systems, CA, EUA. A pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram registradas continuamente por 120 min após a injeção das drogas e expressas como delta da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), em relação aos valores pré-injeção. Durante o experimento, os animais permaneciam conectados ao transdutor de pressão por 165 minutos, sendo os 15 minutos iniciais para registro dos valores basais (-45 min), ao final dos quais o animal recebia injeção i.c.v. (-30 min) e o registro permanecia por mais 120 min.

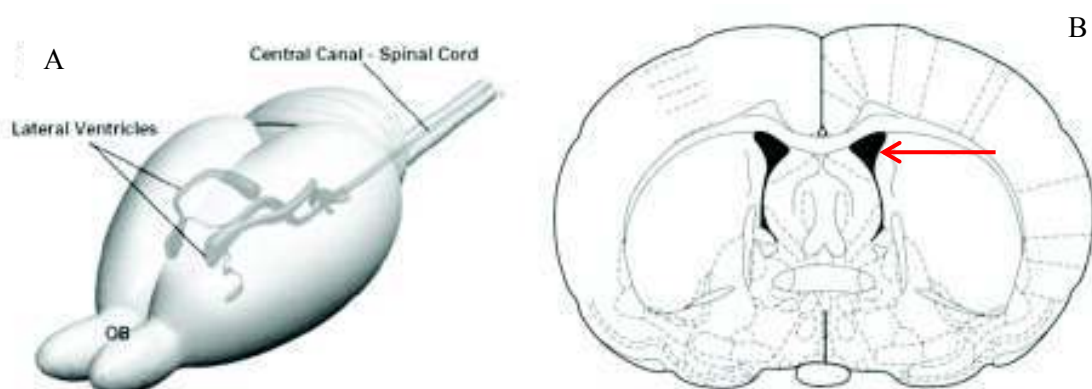
4.9. DROGAS E MICROINJEÇÕES

O antagonista específico kappa, 17,17'-(Dicyclopropylmethyl)-6,6',7,7'-6,6'-imino-7,7'-binorphan-3,4',14,14'-tetrol dihydrochloride (norbinaltorfimina -Nor-BNI, nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2µL), o agonista kappa 2-(3,4-Diclorofenil)-*N*-metil-*N*-[(1*S*)-1-fenil-2-(1-pirrolidinil)etilacetamida cloridrato (ICI_{199,441}, nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2µL), o antagonista específico delta, naltrindole isotiocianeto (NTI, nas doses de 5, 10 e 20 nmol/2 µL), o agonista delta, deltorfina II (Delt II, nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 nmol/2 µL), angiotensina II (AII, na dose de 10 ng/2 µL) foram obtidos da TOCRIS, Ballwin, MO. A furosemida (Lasix 10mg/kg) foi obtida da Aventis, São Paulo, Brasil. As doses das drogas e o volume injetado foram baseados nos trabalhos de Bodnar e colaboradores (1995) e Bruchas e colaboradores (2009).

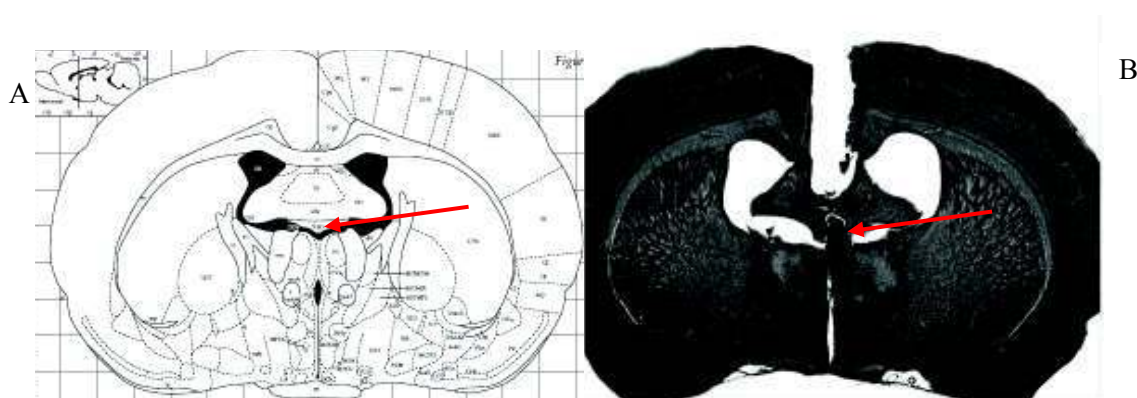
Durante a realização dos experimentos injeções centrais foram efetuadas através de uma microsseringa de 5 μ l (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.), conectada a uma agulha odontológica nº 30G com 15 mm de comprimento, através de um tubo de polietileno (PE10). O volume total de 0,2 μ L foi injetado no MnPO e no OSF, o núcleo BLA recebeu um volume de 0,2 μ L de cada lado, enquanto que no VL o volume injetado foi de 2 μ L. todas as injeções duraram, aproximadamente, 60 segundos.

4.10. HISTOLOGIA

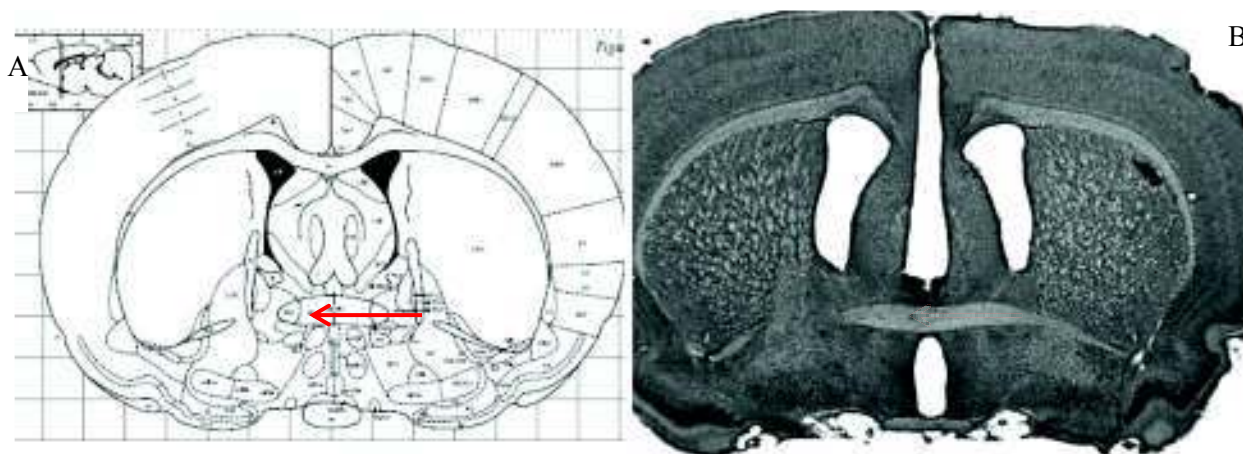
Ao final das sessões experimentais os animais foram perfundidos transcardiacamente com solução salina glicosada e formol 10%, os cérebros eram removidos e conservados em formaldeído para posterior processamento histológico. O método de coloração usado foi cresil violeta. Apenas os dados referentes aos animais cuja canulação localizava-se nas áreas estudadas foram utilizados neste trabalho. A cavidade ventricular e os núcleos canulados estão ilustrados a seguir.



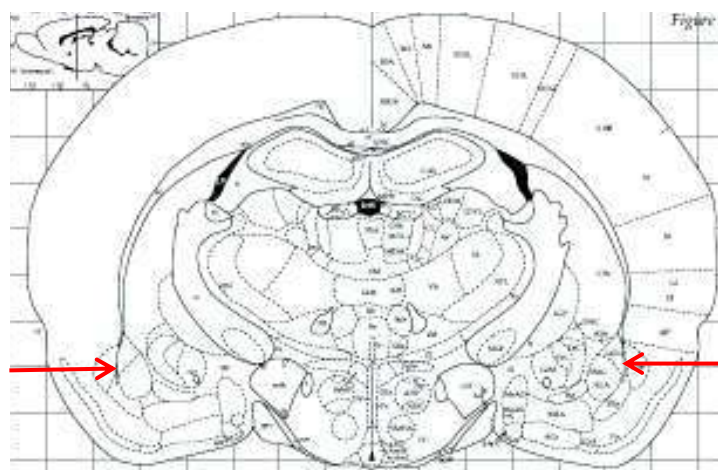
Esquema 5 - (A) Desenho tridimensional de encéfalo de rato mostrando localização do sistema ventricular cerebral e (B) diagrama de corte coronal identificando local das microinjeções no VL esquerdo (PENCKA ET AL., 2001).



Esquema 6 - (A) Diagrama de corte coronal do cérebro de rato (PAXINOS; WATSON, 1998) e (B) micrografia eletrônica (cresil violeta) identificando local das microinjeções no OSF.



Esquema 7 - (A) Diagrama de corte coronal de encéfalo de rato (PAXINOS; WATSON, 1998) e (B) micrografia eletrônica (cresil violeta) identificando local das microinjeções no MnPO.



Esquema 8 - (A) Diagrama de corte coronal de encéfalo de rato identificando local das microinjeções no núcleo BLA (PAXINOS; WATSON, 1998).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após verificação da normalidade dos dados por meio do programa Sigma Stat utilizou-se ANOVA modelo misto de duas vias para medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações na análise dos dados obtidos nos protocolos de medida da ingestão cumulativa e para o teste de medida da pressão arterial. A comparação da ingestão final de salina e H₂O entre as áreas cerebrais estudadas na segunda parte do trabalho foi realizada por meio de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. O teste t de Student não pareado foi utilizado para analisar os resultados dos testes de sobremesa e de campo aberto. A análise dos dados foi feita através do programa GraphPad versão 6.0. As diferenças

mínimas entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm EPM.

4.12. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo Experimental I – Investigar o papel dos receptores delta-opioides no sistema nervoso central sobre o apetite por sódio.

Objetivo 1.A - Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, inibe a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon.

Planejamento Experimental 1: Os animais sofreram implante de cânula no VL esquerdo e, durante os 4 dias de recuperação cirúrgica, foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. No 5º dia os animais foram depletados de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O_d. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista delta-opioide NTI nas doses de 5, 10 e 20 nmol/2µL e após 15 minutos receberam bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂O_d. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Foram realizados dois grupos controles, o primeiro grupo de animais foi depletado de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O_d. O segundo grupo de animais recebeu injeção subcutânea de salina isotônica (0,9%) e teve acesso a solução salina 1,5%, H₂O_d e ração livre. Para confirmar a seletividade do antagonista os animais receberam microinjeção do antagonista delta-opioide NTI na dose de 20 nmol/2 µL e 15 minutos depois receberam injeção do agonista delta-opioide deltorfina II nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 nmol/2 µL. 15 minutos mais tarde receberam os bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂O_d. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 132):

Controle Depletado de sódio (n=12)

Controle Normonatremico Salina (n=12)

Salina (n=11)

NTI 5 nmol/2 μ L, (n=10)

NTI 10 nmol/2 μ L, (n=10)

NTI 20 nmol/2 μ L, (n=10)

Salina+Salina, (n=10)

NTII 20 nmol/2 μ L +Salina (n=12)

NTI 20 nmol/2 μ L+Delt II 2,5 nmol/2 μ L, (n=12)

NTI 20 nmol/2 μ L+Delt II 5nmol/2 μ L, (n=13)

NTI 20 nmol/2 μ L+Delt II 10nmol/2 μ L, (n=8)

NTI 20 nmol/2 μ L+Delt II 20nmol/2 μ L, (n=12)

Objetivo 1.B – Investigar o efeito da estimulação central dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de agonista seletivo destes receptores, sobre a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon.

Planejamento Experimental 2: Os animais sofreram implante de cânula no VL esquerdo e, durante os 4 dias de recuperação cirúrgica, foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. Os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo de animais foi depletado de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O. O segundo grupo de animais recebeu injeção subcutânea de salina isotônica (0,9%) e teve acesso à solução salina 1,5%, H₂O e ração livre. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do agonista delta-opioide deltorfina II na dose de 20 nmol/2 μ L e 15 minutos mais tarde receberam os bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂O. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no lugar de deltorfina II. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 40):

Salina Depletado, (n=12)

Delt II 20 nmol/2 μ L, depletado, (n=8)

Salina Normonatrêmico, (n=12)

Delt II 20 nmol/2 μ L, normonatrêmico, (n=8)

Objetivo 1.C – Estudar o efeito do bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, sobre a ingestão de sódio induzida pela angiotensina.

Planejamento Experimental 3: Os animais sofreram implante de cânula no VL esquerdo e, durante os 4 dias de recuperação cirúrgica, foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista delta-opioide NTI nas doses de 5, 10 e 20 nmol/2 μ L e após 15 minutos receberam injeção de AII na dose de 10 ng/2 μ L com acesso imediato a bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂Od. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no VL no lugar do NTII. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 33):

Salina+AII (n=8)

NTI 5 nmol/2 μ L+AII 10 ng/2 μ L, (n=10)

NTI 10 nmol/2 μ L+AII 10 ng/2 μ L, (n=7)

NTI 20 nmol/2 μ L+AII 10 ng/2 μ L, (n=8)

Objetivo 1.D - Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, altera inespecificamente a ingestão por substâncias palatáveis.

Planejamento Experimental 4: Os animais sofreram implante de cânula no VL

esquerdo. Durante os 5 dias de recuperação cirúrgica foram habituados às condições experimentais onde eram colocados em uma caixa teste por 2 horas diárias e tinham acesso a bebedouros contendo água filtrada e solução sacarina 0,1% sem acesso a ração. No 6º dia os animais foram privados de água e mantidos com ração. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista delta-opioide naltrindole na dose de 20 nmol/2 µL, transferidos para a caixa teste e após 15 minutos receberam bebedouros graduados contendo água filtrada e solução sacarina 0,1%. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 15 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no VL no mesmo volume (2 µL) e condições dos grupos anteriores. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 24):

Salina (n=7)

NTI 20 nmol/2µL, (n=7)

Objetivo: 1.E – Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, altera inespecificamente a atividade locomotora.

Planejamento Experimental 5: Os animais sofreram implante de cânula no VL esquerdo e, durante os 4 dias de recuperação cirúrgica, foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. No 5º dia os animais foram depletados de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista delta-opioide naltrindole na dose de 20 nmol/2 µL e após 15 minutos foram transferidos para a caixa teste. A medida do deslocamento do animal na caixa teste durou 10 minutos. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no VL no mesmo volume (2 µL) e condições dos grupos anteriores. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h.

Grupos experimentais (n total = 22):

Salina (n=11)

NTI 20 nmol/2 μ L, (n=11)

Objetivo 1.F - Verificar se o bloqueio dos receptores delta-opioides, por meio de administração i.c.v. de antagonista seletivo destes receptores, altera a pressão arterial.

Planejamento Experimental 6: Os animais sofreram implante de cânula no VL esquerdo e, durante os 4 dias de recuperação cirúrgica, foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. No 5º dia os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização da carótida. 24 horas antes da sessão experimental foram depletados de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista delta-opioide naltrindole na dose 20 nmol/2 μ L e a seguir se deu o registro da pressão sanguínea e da frequência cardíaca durante 120 minutos. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no VL no mesmo volume (2 μ L) e condições dos grupos anteriores. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h.

Grupos experimentais (n total = 13):

Salina (n=5)

NTI 20 nmol/2 μ L, (n=8)

Grupo Experimental II – Papel dos receptores kappa-opioides no apetite por sódio

Objetivo 2.A - Estudar o efeito do bloqueio dos receptores kappa-opioides nas áreas cerebrais específicas: OSF, MnPO e BLA, sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon.

Planejamento Experimental 1: Os animais sofreram implante de cânula em áreas específicas, OSF, MnPO e BLA, durante os 4 dias de recuperação cirúrgica, foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. No 5º dia os animais foram depletados de sódio por meio da administração

subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O_d. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista kappa-opioide Nor-BNI nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2µL e após 15 minutos receberam bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂O_d. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Foram realizados dois grupos controles: o primeiro grupo de animais foi depletado de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O_d. O segundo grupo de animais recebeu injeção subcutânea de salina isotônica (0,9%) e teve acesso a solução salina 1,5%, H₂O_d e ração livre. Para confirmar a seletividade do antagonista os animais receberam microinjeção do antagonista kappa-opioide Nor-BNI na dose de 2,0 nmol/0,2 µL e 15 minutos depois receberam injeção do agonista kappa-opioide ICI_{199,441} na dose de 2,0 nmol/0,2 µL. 15 minutos mais tarde receberam os bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂O_d. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 241):

Depletado de sódio (n=12)

Normonatremico (n=12)

Injeção no OSF

Salina, (n=11)

Nor-BNI 0,5 nmol/0,1 µL, (n=13)

Nor-BNI 1,0 nmol/0,1 µL, (n=13)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 µL, (n=11)

Salina+Salina, (n=7)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL + Salina (n=7)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL + ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1µL, (n=5)

Injeção no MnPO

Salina, (n=12)

Nor-BNI 0,5 nmol/0,1 µL, (n=10)

Nor-BNI 1,0 nmol/0,1 µL, (n=12)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 µL, (n=12)

Salina+Salina, (n=10)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL + Salina (n=10)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL + ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1µL, (n=10)

Injeção na BLA

Salina, (n=12)

Nor-BNI 0,5 nmol/0,1 µL, (n=10)

Nor-BNI 1,0 nmol/0,1 µL, (n=11)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 µL, (n=12)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 µL + Salina (n=10)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 µL + ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 µL, (n=9)

Objetivo 2.B – Investigar o efeito da estimulação central dos receptores kappa-opioides, por meio de administração de agonista seletivo destes receptores no OSF, MNPO e BLA, sobre a ingestão de sódio em ratos normonatrêmicos.

Planejamento Experimental 2: Os animais sofreram implante de cânula em áreas específicas, OSF, MnPO e BLA, e durante os 4 dias de recuperação cirúrgica foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de H₂O, salina hipertônica e ração livres. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do agonista kappa-opioide ICI_{199,441} na concentração de 2,0 nmol/0,2µL e 15 minutos mais tarde receberam os bebedouros graduados contendo salina hipertônica 1,5% e H₂O. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 5 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no lugar do ICI_{199,441}. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 72):

Injeção no OSF

Salina (n=8)

ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 μL, (n=6)

Injeção no MnPO

Salina (n=7)

ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 μL, (n=7)

Injeção na BLA

Salina (n=9)

ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 μL, (n=9)

Objetivo 2.C - Verificar se o bloqueio dos receptores kappa-opioides, por meio de administração de antagonista seletivo destes receptores no OSF, MNPO e BLA, altera inespecificamente a ingestão por substâncias palatáveis

Planejamento Experimental 3: Os animais sofreram implante de cânula em áreas específicas, OSF, MnPO e BLA. Durante os 4 dias de recuperação cirúrgica foram habituados às condições experimentais onde eram colocados em uma caixa teste por 2 horas diárias e tinham acesso a bebedouros contendo água filtrada e solução sacarina 0,1% sem acesso a ração. No 5º dia os animais foram privados de água e mantidos com ração. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista kappa-opioide Nor-BNI na dose de 2,0 nmol/0,2 μL, eram transferidos para a caixa teste e após 15 minutos recebiam bebedouros graduados contendo água filtrada e solução sacarina 0,1%. A medida da ingestão cumulativa se iniciou 15 minutos após a oferta dos bebedouros e durou 120 min. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no mesmo volume (0,2 μL) e condições dos grupos anteriores. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h e os animais não tiveram acesso à ração durante este período.

Grupos experimentais (n total = 48):

Injeção no OSF

Salina (n=9)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 μL, (n=13)

Injeção no MnPO

Salina (n=8)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 µL, (n=8)

Injeção na BLA

Salina (n=4)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 µL, (n=6)

Objetivo 2.D - Verificar se o bloqueio dos receptores kappa-opioides, por meio de administração de antagonista seletivo destes receptores no OSF, MnPO e BLA, altera inespecificamente a atividade locomotora.

Planejamento Experimental 4: Os animais sofreram implante de cânula em áreas específicas, OSF, MnPO e BLA e durante os 4 dias de recuperação cirúrgica foram habituados às condições experimentais onde tiveram oferta de água, salina hipertônica e ração livres. No 5º dia os animais foram depletados de sódio por meio da administração subcutânea do diurético furosemida na dose de 20 mg/kg e mantidos por 24 horas em dieta hipossódica e com livre acesso a H₂O_d. Na sessão experimental os animais receberam microinjeção do antagonista kappa-opioide, Nor-BNI, na dose 2,0 nmol/0,2 µL e após 15 minutos foram transferidos para a caixa teste. A medida do deslocamento do animal na caixa teste durou 10 minutos. Os grupos controles receberam microinjeções de salina (0,9%) no mesmo volume (0,2 µL) e condições dos grupos anteriores. Os experimentos foram realizados entre 07:00 e 12:00 h.

Grupos experimentais (n total = 28):

Injeção no OSF

Salina (n=5)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 µL, (n=5)

Injeção no MnPO

Salina (n=4)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 µL, (n=4)

Injeção na BLA

Salina (n=5)

Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 µL, (n=5))

5. RESULTADOS

Parte 1: Resultados dos dados referentes ao estudo do papel do receptor delta-opioide central publicado no periódico *Peptides* 55:110–9, 2014 doi:10.1016/j.peptides.2014.02.012 com o título “*Blockade of central delta-opioid receptors inhibits salt appetite in sodium-depleted rats.*” (APÊNDICE)

Parte 2: Resultados dos dados referentes ao estudo do papel dos receptores kappa-opioides em áreas cerebrais específicas (em fase de redação do manuscrito do segundo artigo).

1. Comparação da ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% em animais submetidos à depleção de sódio e em ratos normonatrêmicos.

A figura 1 mostra a resposta da ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% em ratos depletados de sódio e em ratos normonatrêmicos. Como esperado os animais que receberam injeção intraperitoneal de furosemida (20 mg/kg) associada a uma dieta hipossódica (depletados de sódio, n=12) apresentaram aumento da ingestão de solução salina hipertônica 1,5% a partir do tempo 5 minutos ($1,06 \pm 0,15$ ml/100g do peso corporal), mantendo-se assim até o final da sessão experimental, aos 120 minutos ($5,81 \pm 0,12$ ml/100g do peso corporal), quando comparados aos animais controles (normonatrêmicos, n=12), que receberam injeção intraperitoneal de solução salina isotônica (0,9%) (5 min $0,00 \pm 0,00$ ml/100g do peso corporal; 120 min: $0,00 \pm 0,00$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto para duas vias mostra diferença significativa entre os tratamentos [$F(7,77)=161$; $p<0,0001$], na interação tempos X tratamentos [$F(7,77)=161$; $p<0,0001$] e nos tempos [$F(1,11)=617,2$; $p<0,0001$], respectivamente.

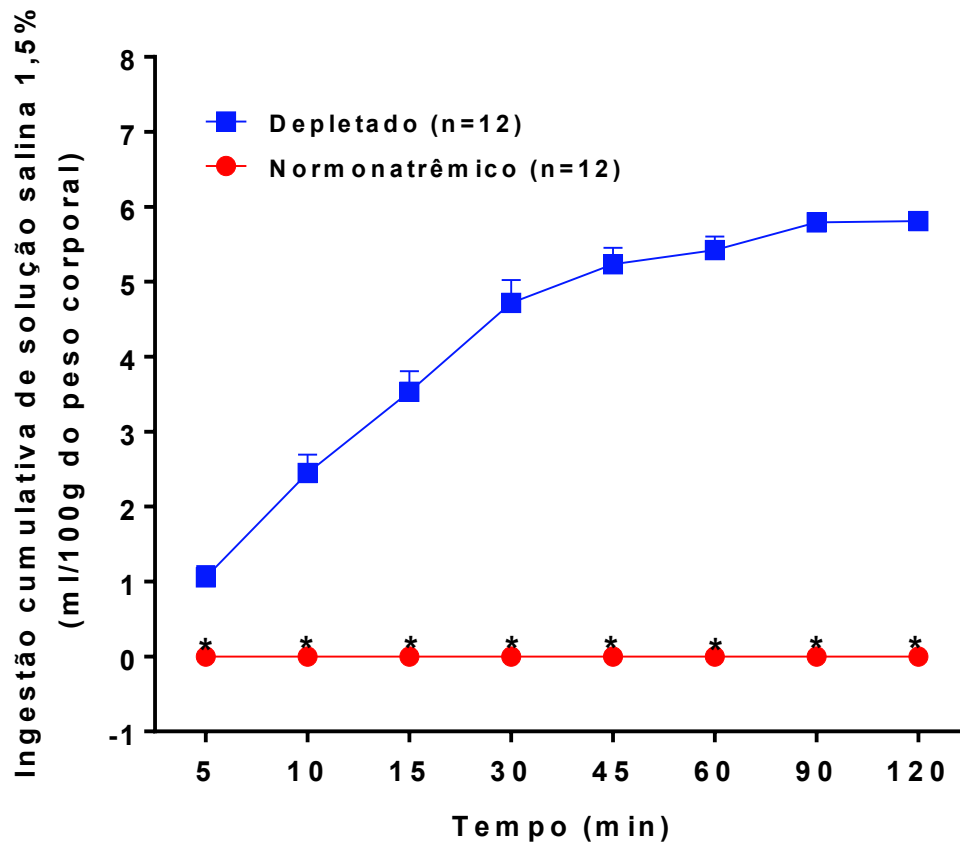


Figura 1: Comparação da ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% em animais submetidos à depleção de sódio e em ratos normonatremicos. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa entre os grupos. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

2. Efeito do bloqueio dos receptores opioides subtipo kappa no OSF sobre o apetite por sódio.

A figura 2 mostra os resultados de ingestão cumulativa de água (painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (painel B) em animais que receberam injeções no OSF do antagonista seletivo para os receptores kappa-opioides, Nor-BNI, nas doses de 0,5 (n=13), 1,0 (n=13) e 2,0 nmol/0,2 μ L (n=11) e o grupo controle recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 μ L; n=11). Os dados mostram que a ingestão de água permaneceu inalterada até o fim da sessão experimental tanto nos animais controles ($0,00 \pm 0,00$ ml/100g do peso corporal) como naqueles que receberam injeções de Nor-BNI no OSF nas doses de 0,5 ($0,00 \pm 0,00$ ml/100g do peso corporal), 1,0 ($0,12 \pm 0,12$ ml/100g do peso corporal) e 2,0 nmol/0,2 μ L ($0,19 \pm 0,19$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica que não há diferença entre os tratamentos [F(2, 16)=0,6617; p=0,5296], na interação tempos X tratamentos [F(14, 112)=0,6617; p=0,8068] e nos tempos [F(7, 112)=0,5811; p=0,7701], respectivamente.

Como esperado, os animais controles depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% no OSF, apresentaram aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% (painel B). Os animais tratados com Nor-BNI apresentaram redução na ingestão de salina hipertônica a partir do tempo 10 minutos para as doses de 0,5 ($0,59 \pm 0,22$ ml/100g do peso corporal) 1,0 ($0,56 \pm 0,31$ ml/100g do peso corporal) e 2,0 nmol/0,2 μ L ($0,26 \pm 0,13$ ml/100g do peso corporal) quando comparados aos animais do grupo controle ($2,66 \pm 0,19$ ml/100g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($2,26 \pm 0,73$; $2,08 \pm 0,62$; $1,68 \pm 0,75$ e $5,59 \pm 0,24$ ml/100g do peso corporal, para as respectivas doses de Nor-BNI 0,5 1,0 e 2,0 nmol/0,2 μ L e para os controles). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa nos tratamentos [F(4, 50)=7,835; p<0,0001], na interação tempos X tratamentos [F(28, 350)=1,397; p=0,0903] e nos tempos [F(7, 350)=38,25; p<0,0001], respectivamente.

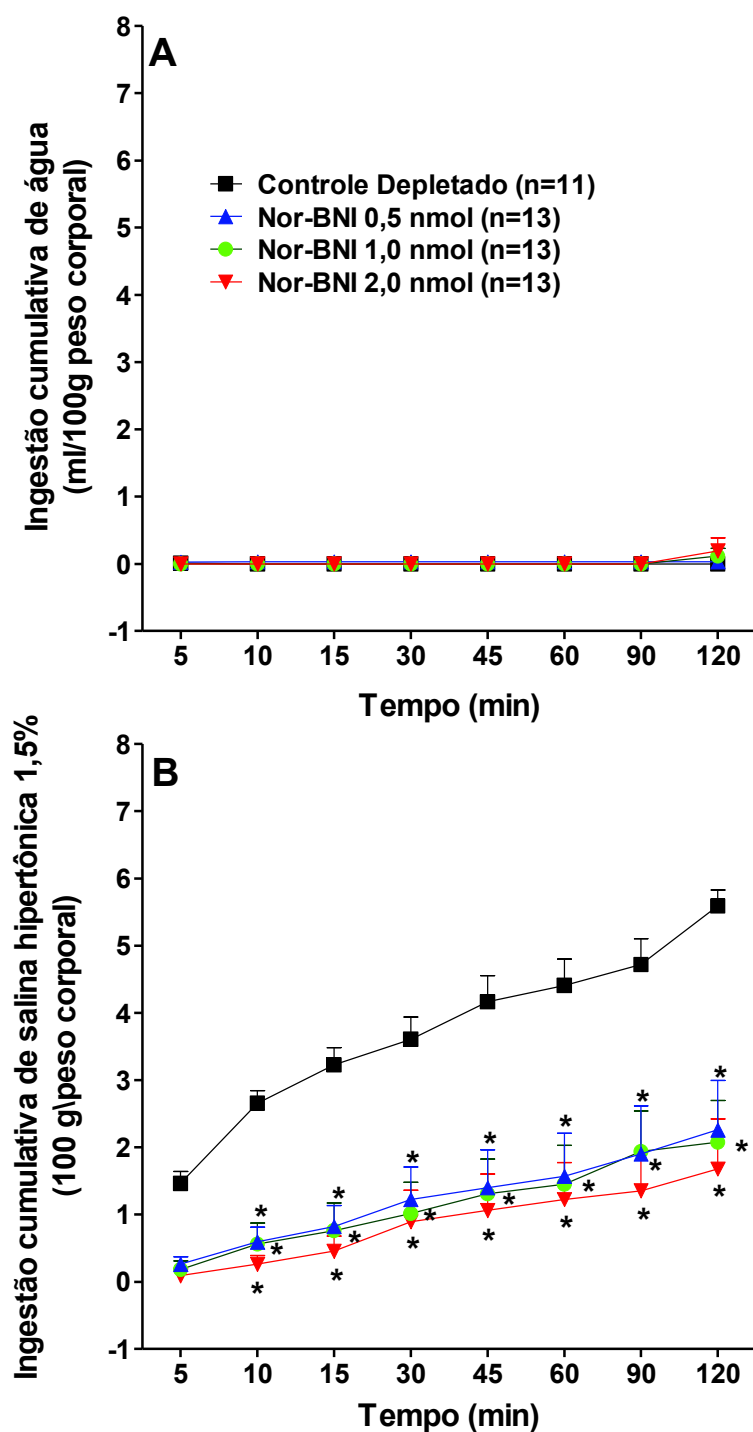


Figura 2: Comparação da ingestão cumulativa de água (Painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (Painel B) em animais depletados de sódio após microinjeções de Nor-BNI no OSF nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2µL ou salina isotônica. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais controles. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

3. Efeito do bloqueio dos receptores opioides subtipo kappa no MnPO sobre o apetite por sódio

A figura 3 mostra os resultados da administração do antagonista seletivo para os receptores kappa-opioides, Nor-BNI, no MnPO sobre a ingestão de água (painel A) e de salina hipertônica 1,5% (painel B) em ratos depletados de sódio. Nor-BNI foi administrado nas doses de 0,5 (n=10), 1,0 (n=12) e 2,0 nmol/0,2µL (n=12) nos animais do grupo experimental e o grupo controle recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL; n=12). Os dados mostram que a ingestão de água (painel A) permaneceu inalterada até o fim da sessão experimental tanto nos animais controles ($0,02 \pm 0,11$ ml/100g do peso corporal) como naqueles que receberam injeções de Nor-BNI no MnPO nas doses de 0,5 ($0,00 \pm 0,00$ ml/100g do peso corporal), 1,0 ($0,08 \pm 0,07$ ml/100g do peso corporal) e 2,0 nmol/0,2 µL ($0,00 \pm 0,00$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias indica que não houve alteração nos tratamentos [F(3, 41)=0,9232; p=0,44382]; na interação tempos X tratamentos [F(21, 287)=0,9324; p=0,5492] e nos tempos [F(7, 287)=1,031; p=0,4093], respectivamente.

Como esperado, os animais controles depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% no MnPO, apresentaram aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% (painel B). Os animais que receberam Nor-BNI apresentaram redução na ingestão de salina hipertônica a partir do tempo 10 minutos para todas as doses (0,5 nmol $0,55 \pm 0,29$; 1,0 nmol $0,55 \pm 0,18$ e 2,0 nmol/0,2 µL $0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal) quando comparados aos animais controles ($2,12 \pm 0,47$ ml/100 g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos. Os grupos experimentais que receberam Nor-BNI nas doses de 0,5 e 1,0 nmol/0,2 µL foram semelhantes entre si ($3,80 \pm 0,46$ e $3,04 \pm 0,52$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente, aos 120 min), mas apresentaram ingestão de salina hipertônica menor do que o grupo controle ($7,44 \pm 0,38$ ml/100 g do peso corporal, aos 120 min). O grupo que recebeu a dose de 1,0 nmol/0,2 µL mostrou diferença em relação à dose de 2,0 nmol/0,2 µL a partir do tempo 30 minutos ($1,46 \pm 0,36$ e $0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente), enquanto a dose de 0,5 nmol/0,2 µL mostrou diferença a partir do tempo 45 minutos ($1,95 \pm 0,44$ ml/100 g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias indica diferença estatística significativa nos tratamentos [F(3, 41)=49,63; p<0,0001], na interação tempos X tratamentos [F(7, 287)=118; p<0,0001] e nos tempos [F(7, 287)=118; p<0,0001], respectivamente.

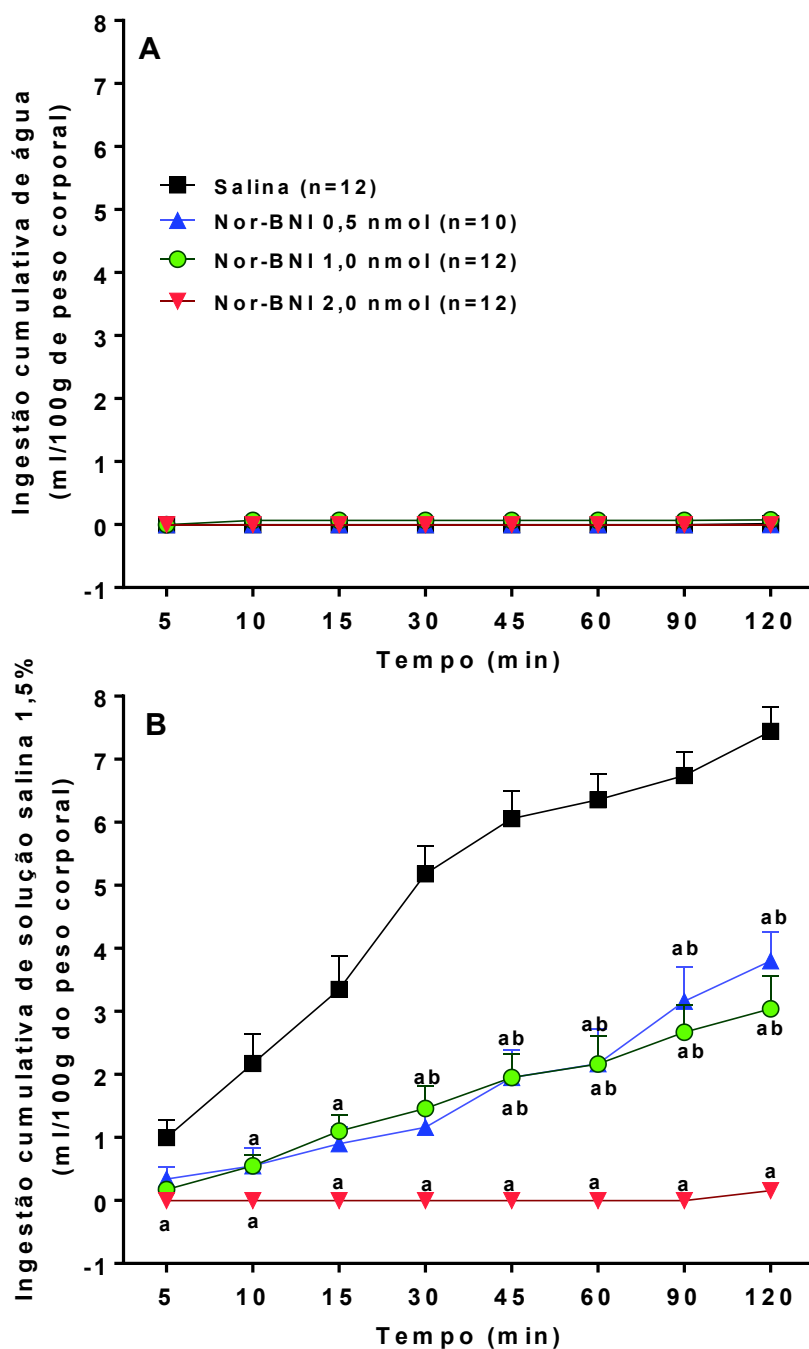


Figura 3: Comparação da ingestão cumulativa de água (Painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (Painel B) em animais depletados de sódio após microinjeções de nor-bni no MnPO nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2 μ L ou salina isotônica. A letra a indica diferença estatística significativa em relação aos animais controles, b indica diferença estatística significativa em relação à nor-bni na dose de 2,0 nmol/0,2 μ LOs dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguido do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

4. Efeito do bloqueio dos receptores kappa-opioides no núcleo BLA sobre o apetite por sódio

A figura 4 mostra os efeitos da administração do antagonista seletivo para os receptores kappa -opioides, Nor-BNI, na BLA sobre a ingestão de água e de salina hipertônica 1,5% em ratos depletados de sódio. O Nor-BNI foi administrado nas doses de 0,5 (n=10), 1,0 (n=11) e 2,0 nmol/0,2 µL (n=12) nos animais do grupo experimental e o grupo controle recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL; n=12). Os dados mostram que a ingestão de água (painel A) permaneceu inalterada até o fim da sessão experimental tanto nos animais controles ($0,02 \pm 0,11$ ml/100 g do peso corporal) como naqueles que receberam injeções de Nor-BNI no núcleo BLA nas doses de 0,5 ($0,51 \pm 0,51$ ml/100 g do peso corporal), 1,0 ($0,70 \pm 0,57$ ml/100 g do peso corporal) e 2,0 nmol/0,2 µL ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica que não há diferença estatística significativa nos tratamentos [$F(3, 41)=1,573$; $p=0,2106$]; na interação tempos X tratamentos [$F(21, 287)=0,6171$; $p=0,9054$] e nos tempos [$F(7, 287)=3,018$; $p=0,0045$], respectivamente.

Como esperado, os animais controles depletados de sódio e tratados com salina isotônica no núcleo BLA, apresentaram aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% (painel B). Os animais tratados com Nor-BNI apresentaram redução na ingestão de salina hipertônica. Essa redução se iniciou no tempo 15 minutos para as doses de 0,5 ($1,55 \pm 0,36$ ml/100 g do peso corporal) 1,0 ($1,24 \pm 0,39$ ml/100 g do peso corporal) e 2,0 nmol/0,2 µL ($0,19 \pm 0,11$ ml/100 g do peso corporal), quando comparados aos animais do grupo controle ($3,71 \pm 0,33$ ml/100 g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($3,86 \pm 0,68$; $3,35 \pm 0,59$; $1,41 \pm 0,41$ e $6,56 \pm 0,21$ ml/100 g do peso corporal, para as respectivas doses de Nor-BNI 0,5 1,0 e 2,0 nmol/0,2 µL e para os controles). Animais tratados com Nor-BNI nas doses de 0,5 e 1,0 nmol/0,2 µL tiveram ingestão de salina diferente a partir do tempo 15 minutos ($1,55 \pm 0,36$ e $1,24 \pm 0,39$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente), em relação aos animais tratados com a dose de 2,0 nmo/0,2 µL ($0,19 \pm 0,11$ ml/100 g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa nos tratamentos [$F(3, 33)= 28,43$; $p<0,0001$], na interação tempos X tratamentos [$F(21, 231)=10,43$; $p<0,0001$] e nos tempos [$F(7, 77)=158,1$; $p<0,0001$], respectivamente.

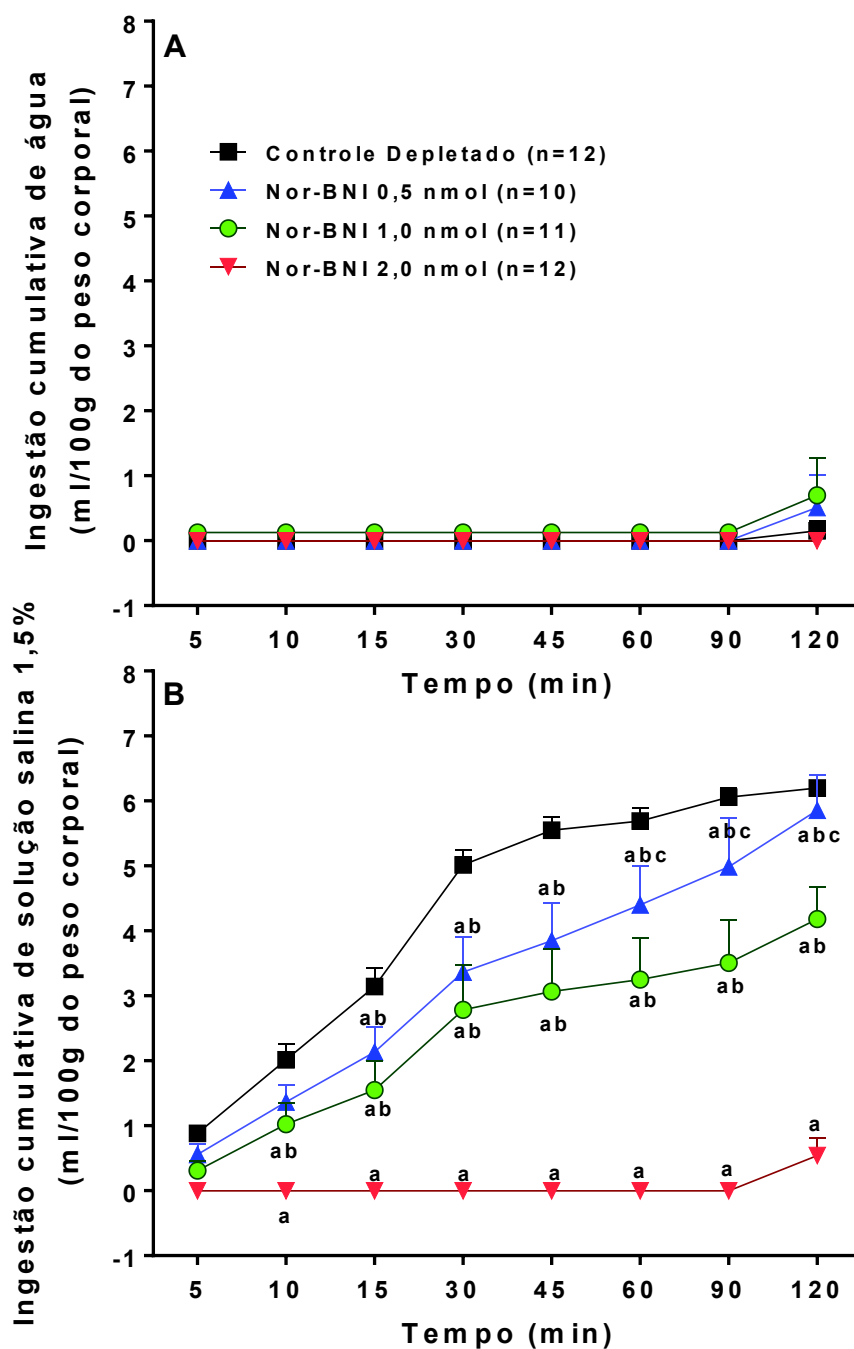


Figura 4: Comparação da ingestão cumulativa de água (Painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (Painel B) em animais depletados de sódio após microinjeções de Nor-BNI no núcleo BLA nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 nmol/0,2 μ L ou salina isotônica. A letra a indica diferença estatística significativa em relação aos animais controles; b indica diferença estatística significativa em relação à dose de 2,0 nmol/0,2 μ L e c indica diferença estatística significativa em relação à dose de 1,0 nmol/0,2 μ L. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

5. Comparação dos efeitos antinatriorexigênicos induzido pelo bloqueio dos receptores opioides subtipo kappa nas diferentes áreas cerebrais (OSF, MnPO, e BLA).

A figura 5 mostra a porcentagem de ingestão de solução salina hipertônica 1,5% em animais tratados com Nor-BNI em relação à média de ingestão de salina dos grupos controles. Nor-BNI foi administrado nas doses de 0,5 (OSF n=13; MnPO n=10; BLA n=10), 1,0 (OSF n=13; MnPO n=12; BLA n=11) e 2,0 nmol/0,2 μ L (OSF n=11; MnPO n=12; BLA n=12). Os resultados mostram que na dose de 2,0 nmol/0,2 μ L de nor-bni a ingestão de solução salina hipertônica foi menor do que 20% da ingestão do controle. Dos animais injetados com nor-bni na dose de 0,5 nmol/0,2 μ L no OSF e MnPO apresentaram percentual de ingestão menor do que os animais injetados no núcleo BLA, enquanto que na dose de 1,0 nmol/0,2 μ L o percentual de ingestão no OSF foi menor que no núcleo BLA. A análise de variância de uma via da ingestão de solução salina hipertônica indica que há diferença estatística significativa nos tratamentos para nor-bni na dose de 0,5 nmol/0,2 μ L [$F(2, 30)=14,33$; $p<0,0001$] e de 1,0 nmol/0,2 μ L [$F(2, 32)=4,974$; $p = 0,0132$]. Não há diferença estatística significativa no tratamento para a dose de 2,0 nmol/0,2 μ L [$F(2,30)=0,6779$; $p=0,5153$].

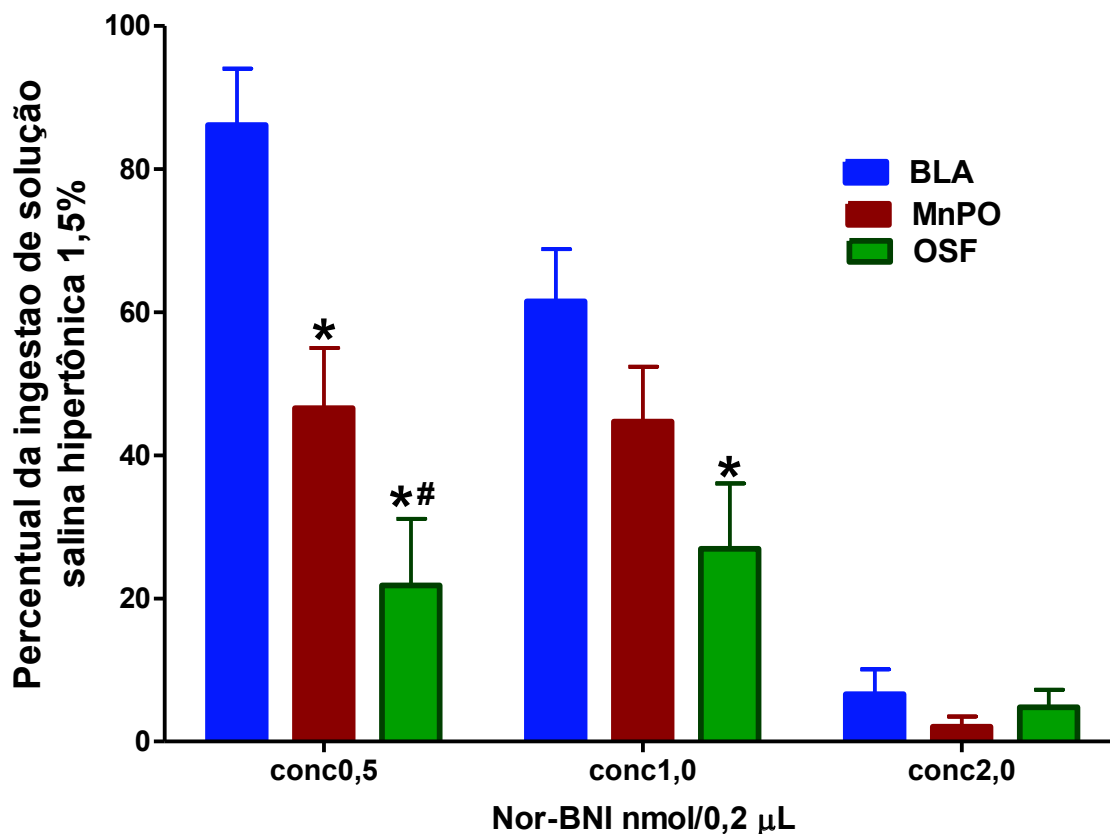


Figura 5: Comparação da ingestão de solução salina hipertônica 1,5% aos 120 minutos em animais depletados de sódio após microinjeções de Nor-BNI nas doses de 0,5 (OSF n=12; MnPO n=10; núcleo BLA n=10), 1,0 (OSF n=12; MnPO n=12; núcleo BLA n=11) e 2,0 nmol/0,2 μL (OSF n=12; MnPO n=12; núcleo BLA n=12). O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais injetados no núcleo BLA e o sustenido (#) indica diferença estatística significativa em relação aos animais injetados no MnPO. Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA de duas via seguido do pós-teste Bonferroni; $p < 0,05$).

6. Efeito do agonista dos receptores opioides subtipo kappa no OSF sobre a ação inibitória do Nor-BNI no apetite por sódio

A figura 6 mostra os efeitos da administração do agonista seletivo para os receptores kappa-opioides, ICI_{199,441}, em animais pré-tratados com o antagonista seletivo para os receptores kappa- opioides, nor-bni, no OSF, sobre a ingestão de água e de salina hipertônica 1,5% em ratos depletados de sódio. Os animais do grupo experimental foram pré-tratados com nor-bni na dose de 2,0 nmol/0,1 µL e injetados com salina (nor-bni+salina n=7) ou ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 µL (nor-bni+ICI_{199,441} n=5) e o grupo controle recebeu duas injeções separadas de 0,1 µL de solução salina isotônica 0,9% no OSF (salina+salina, n=7). Os dados mostram que a ingestão de água (painel A) permaneceu inalterada até o fim da sessão experimental tanto para os animais controles ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal) como para os que receberam injeções de nor-bni+salina ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal) ou nor-bni+ICI_{199,441} no OSF ($0,16 \pm 0,99$ ml/100 g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica que não houve diferença estatística significativa nos tratamentos [$F(2, 18)=4,571$; $p=0,0248$], na interação tempos X tratamentos [$F(14, 126)=4,571$; $p<0,0001$] e nos tempos [$F(7, 126)=5,333$; $p<0,0001$], respectivamente.

Como esperado, a ingestão de solução salina hipertônica 1,5% (painel B) nos animais controles depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% no OSF (salina+salina), apresentaram aumento significativo na ingestão de salina hipertônica. Os animais tratados com nor-bni+salina apresentaram redução na ingestão de solução salina hipertônica a partir do tempo 5 minutos ($0,04 \pm 0,04$ ml/100g do peso corporal) quando comparados aos animais do grupo controle ($1,3 \pm 0,16$ ml/100g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($0,26 \pm 0,15$ e $5,31 \pm 0,12$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). A injeção de ICI_{199,441} em ratos pré-tratados com Nor-BNI (Nor-BNI+ICI_{199,441}) impediu o efeito antinatriorexigênico de Nor-BNI a partir do tempo 10 minutos ($1,75 \pm 0,43$ ml/100g do peso corporal) quando comparado ao grupo Nor-BNI+salina ($0,04 \pm 0,04$ ml/100g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($2,78 \pm 0,55$ e $0,26 \pm 0,15$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa nos tratamentos [$F(2, 17)=81,04$; $p<0,0001$], na interação tempos X

tratamentos [F(14, 119)=20,68; $p<0,0001$] e nos tempos [F(7, 119)=61,63; $p<0,0001$], respectivamente.

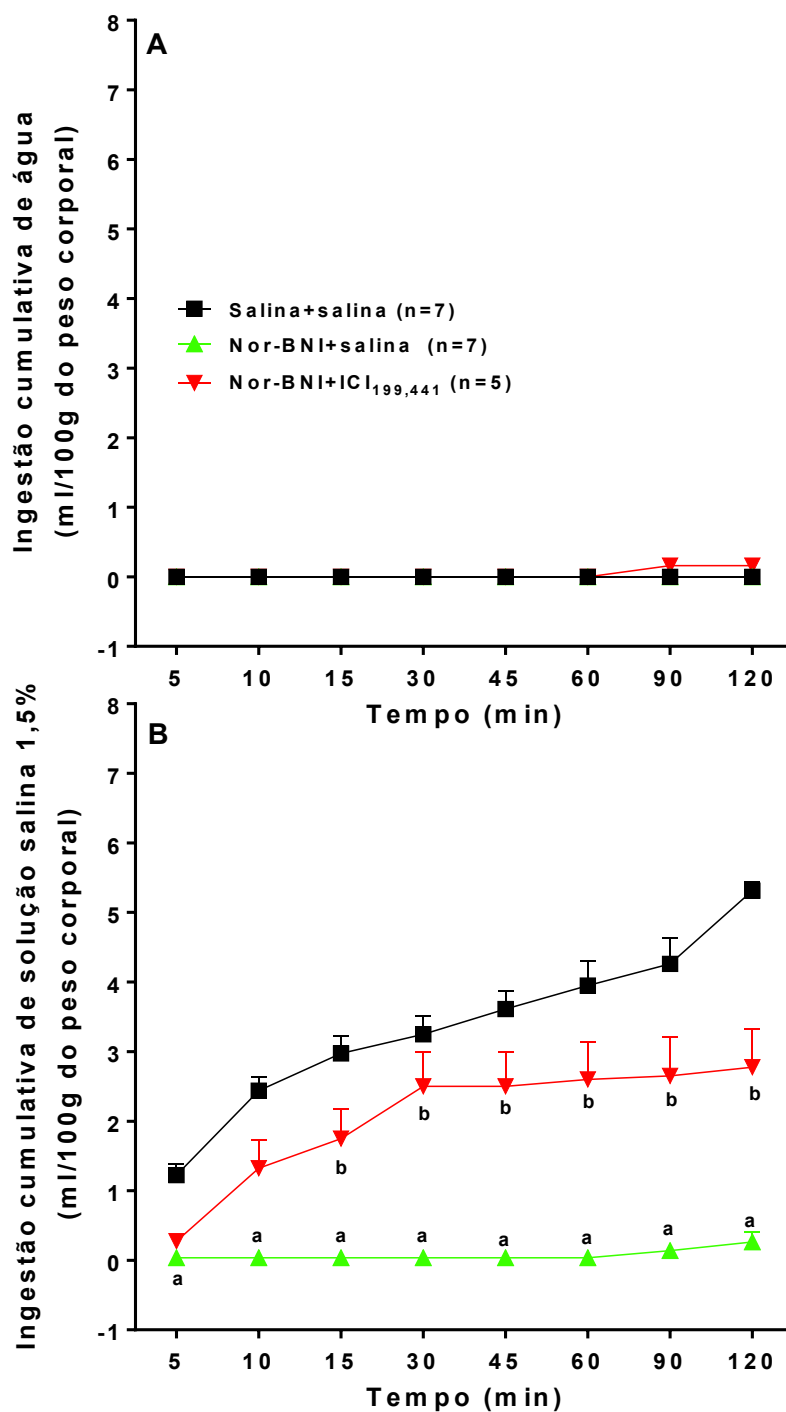


Figura 6: Comparação da ingestão cumulativa de água (Painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (Painel B) em animais depletados de sódio após microinjeções de salina+salina, Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 μ L+salina e Nor-BNI 2,0 nmol/0,1 μ L+ ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 μ L no OSF. A letra *a* indica diferença estatística significativa em relação aos animais salina+salina; letra *b* indica diferença estatística significativa em relação aos animais Nor-BNI+salina. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguida do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

7. Efeito do agonista dos receptores kappa-opioides no MnPO sobre a ação inibitória do Nor-BNI no apetite por sódio

A figura 7 mostra os efeitos da administração do agonista seletivo para os receptores opioides subtipo kappa, ICI_{199,441} em animais pré-tratados com o antagonista seletivo para os receptores kappa-opioides, nor-bni, no MnPO, sobre a ingestão de água e de salina hipertônica 1,5% em ratos depletados de sódio. Os animais do grupo experimental foram pré-tratados com nor-bni na dose de 2,0 nmol/0,1 µL e injetados com salina (nor-bni+salina n=10) ou ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 µL (Nor-BNI+ICI_{199,441} n=10) e o grupo controle recebeu duas injeções de 0,1 µL de solução salina isotônica 0,9% no MnPO (salina+salina n=10). Os dados mostram que a ingestão de água (painel A) permaneceu inalterada até o fim da sessão experimental tanto para os animais controles ($0,08 \pm 0,08$ ml/100 g do peso corporal) como para os que receberam injeções de Nor-BNI+salina ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal) ou Nor-BNI+ICI_{199,441} ($0,12 \pm 0,12$ ml/100 g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica que não houve diferença estatística significativa nos tratamentos [$F(2, 25)=0,8039$; $p=0,4588$], na interação tempos X tratamentos [$F(14, 175)=0,8454$; $p=0,6192$] e nos tempos [$F(7, 175)=1,119$; $p=0,3535$], respectivamente.

Como esperado, os animais controles, depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% (salina+salina) no MnPO, apresentaram aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% (painel B). Os animais tratados com Nor-BNI+salina apresentaram redução na ingestão de solução salina hipertônica a partir do tempo 15 minutos ($0,40 \pm 0,28$ ml/100g do peso corporal) quando comparados aos animais do grupo controle ($2,49 \pm 0,29$ ml/100 g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($1,29 \pm 0,53$ e $6,34 \pm 0,27$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). Os grupos Nor-BNI+ICI_{199,441} e salina+salina mostraram diferença na ingestão de salina a partir do tempo 90 minutos ($3,07 \pm 0,80$ e $5,01 \pm 0,49$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente). A injeção de ICI_{199,441} em ratos pré-tratados com Nor-BNI (Nor-BNI+ICI_{199,441}) impediu o efeito antinatriorexigênico resultante da administração de Nor-BNI a partir do tempo 45 minutos ($2,40 \pm 0,66$ ml/100g do peso corporal) quando comparado ao grupo Nor-BNI+salina ($0,58 \pm 0,32$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa nos

tratamentos [F(2, 25)=12,97; p=0,0001]; na interação tempos X tratamentos [F(14, 175)=6,636; p<0,0001] e nos tempos [F(7, 175)=37,47; p<0,0001], respectivamente.

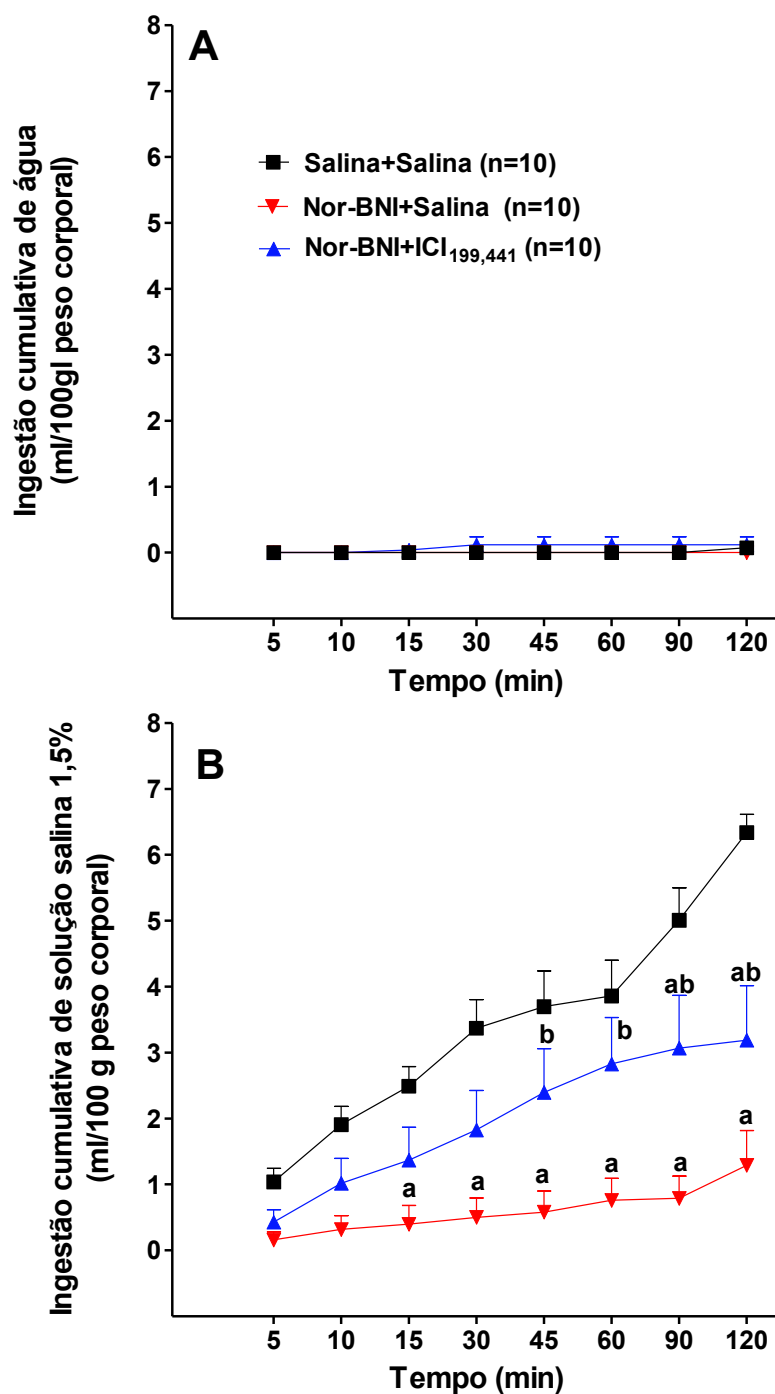


Figura 7: Comparação da ingestão cumulativa de água (Painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (Painel B) em animais depletados de sódio após microinjeções de salina+salina, Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL+salina e Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL+ ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1µL no MnPO. A letra a indica diferença estatística significativa em relação aos animais salina+salina; letra b indica diferença estatística significativa em relação aos animais Nor-BNI+salina. Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguida do pós-teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

8. Efeito do agonista dos receptores kappa-opioides no núcleo BLA sobre a ação inibitória do Nor-BNI no apetite por sódio

A figura 8 mostra os efeitos da administração do agonista seletivo para os receptores opioides subtipo kappa, ICI_{199,441} em animais pré-tratados com o antagonista seletivo para os receptores opioides kappa, Nor-BNI, no núcleo BLA, sobre a ingestão de água e de salina hipertônica 1,5% em ratos depletados de sódio. Os animais do grupo experimental foram pré-tratados com Nor-BNI na dose de 2,0 nmol/0,1 µL e injetados com salina (Nor-BNI+salina n=10) ou ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1 µL (Nor-BNI+ICI_{199,441} n=9) e o grupo controle recebeu duas injeções de 0,1 µL de solução salina isotônica 0,9% no núcleo BLA (salina+salina n=10). Os dados mostram que a ingestão de água (painel A) permaneceu inalterada até o fim da sessão experimental, tanto para os animais salina+salina ($0,18 \pm 0,18$ ml/100 g do peso corporal) como para os que receberam injeções de Nor-BNI+salina ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal) ou Nor-BNI+ICI_{199,441} ($0,08 \pm 0,08$ ml/100 g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica que não houve diferença estatística significativa nos tratamentos [F(2, 26)=0,6029; p=0,5547], na interação tempos X tratamentos [F(14, 182)=0,7997; p=0,6688] e nos tempos [F(7, 182)=1,354; p=0,2276], respectivamente.

Como esperado, os animais controles, depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% (salina+salina) no núcleo BLA, apresentaram aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% (painel B). Os animais tratados com Nor-BNI+salina apresentaram redução na ingestão de solução salina hipertônica a partir do tempo 10 minutos ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal) quando comparados aos animais do grupo controle ($1,73 \pm 0,38$ ml/100 g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($0,00 \pm 0,00$ e $6,06 \pm 0,25$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente). Os grupos Nor-BNI+ICI_{199,441} e salina+salina não apresentaram diferença na ingestão de salina (120 minutos - $5,00 \pm 0,63$ e $6,06 \pm 0,25$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente). A injeção de ICI_{199,441} em ratos pré-tratados com Nor-BNI (Nor-BNI+ICI_{199,441}) impediu o efeito antinatriorexigênico resultante da administração de Nor-BNI a partir do tempo 10 minutos ($1,61 \pm 0,47$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente), quando comparados a Nor-BNI+salina ($0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($5,00 \pm 0,63$ e $0,00 \pm 0,00$ ml/100 g do peso corporal,

respectivamente). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa nos tratamentos [$F(2, 26)=22,51$; $p<0,0001$]; na interação tempos X tratamentos [$F(14, 182)=12,52$; $p<0,0001$] e nos tempos [$F(7, 182)=80,40$; $p<0,0001$], respectivamente.

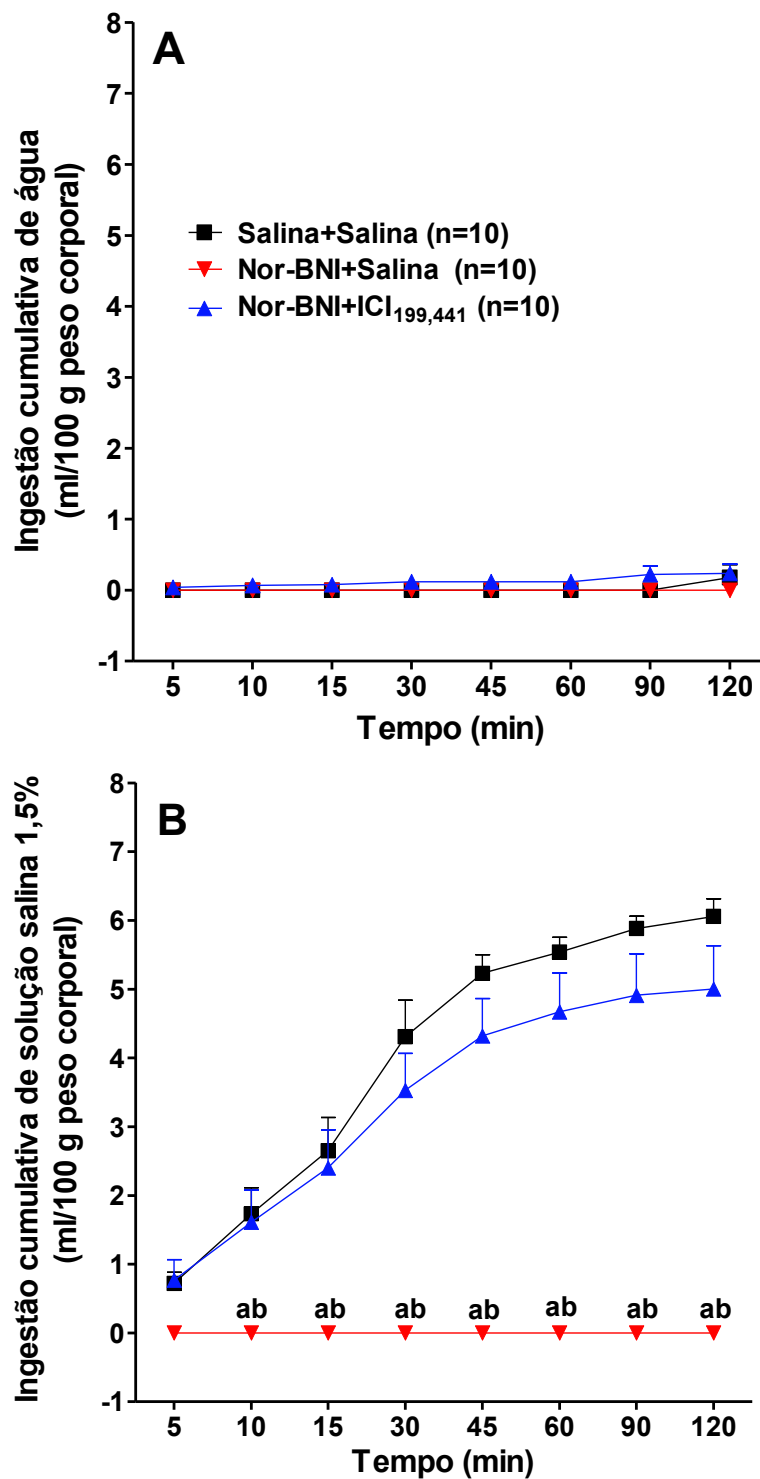


Figura 8: Comparação da ingestão cumulativa de água (Painel A) e de solução salina hipertônica 1,5% (Painel B) em animais depletados de sódio após microinjeções de salina+salina, Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL+salina e Nor-BNI 2,0 nmol/0,1µL+ ICI_{199,441} 2,0 nmol/0,1µL no núcleo BLA. A letra a indica diferença estatística significativa em relação aos animais salina+salina; letra b indica diferença estatística significativa em relação aos animais Nor-BNI+salina. Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguida do pós-teste de Bonferroni; p<0,05).

9. Efeito da estimulação dos receptores kappa-opioides no OSF, MnPO e no núcleo BLA sobre o apetite por sódio

A tabela 1 mostra os efeitos da administração do agonista seletivo para os receptores opioides subtipo kapa, ICI_{199,441}, no OSF, MnPO e na BLA sobre a ingestão de água e de salina hipertônica 1,5% em ratos normonatrêmicos. O ICI_{199,441} foi administrado na dose de 2,0 nmol/0,2 µL nos animais do grupo experimental e os animais controles receberam injeções de solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL). Os dados mostram que a ingestão de água permaneceu inalterada nos grupos estudados até o fim da sessão experimental quando comparados aos seus respectivos controles. A análise de variância de duas vias modelo misto para medidas repetidas para OSF indica que não há alteração nos tratamentos [F(2, 16)=0,6617; p=0,5296], na interação tempos X tratamentos [F(14, 112)=0,6617; p=0,8068] e nos tempos [F(7, 112)=0,5811; p=0,7701]; para o MnPO não há alteração nos tratamentos [F(1, 6)=3,036; p = 0,1321], na interação tempos X tratamentos [F(7, 42)=2,591; p = 0,0258] e nos tempos [F(7,42)=0,591; p = 0,0258] e para BLA não há alteração nos tratamentos [F(1, 6)=3,036; p = 0,1321], na interação tempos X tratamentos [F(7, 84)=1,929; p = 0,0750] e nos tempos [F(7, 84)=1,929; p = 0,0750], respectivamente.

A ingestão de solução salina hipertônica 1,5% permaneceu inalterada durante toda a sessão experimental para os animais normonatrêmicos injetados no OSF (0,27 ± 0,18 ml/100 g do peso corporal), no MnPO (0,00 ± 0,00 ml/100 g do peso corporal) e no núcleo BLA (0,00 ± 0,00 ml/100 g do peso corporal) quando comparados aos seus respectivos controles (0,00 ± 0,00; 0,00 ± 0,00 e 0,16 ± 0,16 ml/100 g do peso corporal). A análise de variância de duas vias para medidas repetidas indica que não há alteração para o OSF nos tratamento para OSF [F(2,56)=0,3953; p=0,6799], na interação tempos X tratamentos [F(14, 112)=0,3953; p = 0,9738] e nos tempos [F(7, 112)=1,637; p = 0,1321]; para o MnPO não há alteração nos tratamentos [F(1, 6)=2,359; p = 0,1755], na interação tempos X tratamentos [F(14, 112)=0,3953; p = 0,9738] e nos tempos [F(7, 42)=2,137; p = 0,0603] e para BLA não há alteração nos tratamentos [F(1, 12)=0,5357; p = 0,4783], na interação tempos X tratamentos [F(7, 84)=0,5357; p = 0,8051] e nos tempos [F(7, 84)=0,5357; p = 0,8051], respectivamente.

Tabela 3 - Efeitos da administração do agonista seletivo para os receptores opioides subtipo kappa, ICI_{199,441}, (2,0 nmol/0,2 µL) injetado no OSF, MnPO e na BLA de ratos normonatrêmicos sobre a ingestão de água e de salina hipertônica 1,5% (ml/100 g do peso corporal).

			5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
SFO	Controle	Água	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		Sal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	ICI _{199,441}	Água	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		Sal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,12	0,27 ± 0,18
MnPO	Controle	Água	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,11	0,41 ± 0,25	0,41 ± 0,25
		Sal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	ICI _{199,441}	Água	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		Sal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
BLA	Controle	Água	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		Sal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,16	0,16 ± 0,16	0,16 ± 0,16
	ICI _{199,441}	Água	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08
		Sal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA de duas vias modelo misto seguida do pós-teste de Bonferroni; p<0,05). OSF controle n=8, ICI_{199,441} n=6; MnPO controle n=7, ICI_{199,441} n=7; BLA controle n=9, ICI_{199,441} n=5.

10. Efeito do bloqueio dos receptores kappa-opioides no OSF, MnPO e no núcleo BLA sobre a preferência em ingerir sacarina 0,1%

A figura 9 mostra o Teste de Sobremesa que foi aplicado para verificar se a administração do antagonista seletivo para os receptores kappa-opioides, Nor-BNI, gera inibição específica da ingestão de solução salina hipertônica 1,5% ou inibe inespecificamente qualquer comportamento ingestivo. Neste teste os animais foram privados de água por 24 horas e nas sessões experimentais receberam injeções de Nor-BNI na dose de 2,0 nmol/0,2 μ L e foram transferidos para as caixas testes onde recebiam os bebedouros contendo solução sacarina e água filtrada. Os animais controles receberam injeções de solução salina isotônica 0,9% (0,2 μ L). Os dados mostram que a ingestão de solução sacarina 0,1% observada entre os animais que receberam injeções de Nor-BNI e o grupo controle foi similar entre os animais canulados nas diferentes áreas, OSF ($3,82 \pm 0,66$ e $3,97 \pm 0,91$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente), MnPO ($3,34 \pm 1,03$ e $4,67 \pm 1,35$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente) e BLA ($4,99 \pm 0,77$ e $5,63 \pm 0,33$ ml/100 g do peso corporal, respectivamente). A análise não pareada do teste “t” de Student indica para o OSF [$t=0,2621$; $df=18$; $p=0,7962$], para o MnPO [$t=0,08715$; $df=14$; $p=0,9318$] e para BLA [$t=0,6448$; $df=8$; $p=0,5381$] respectivamente.

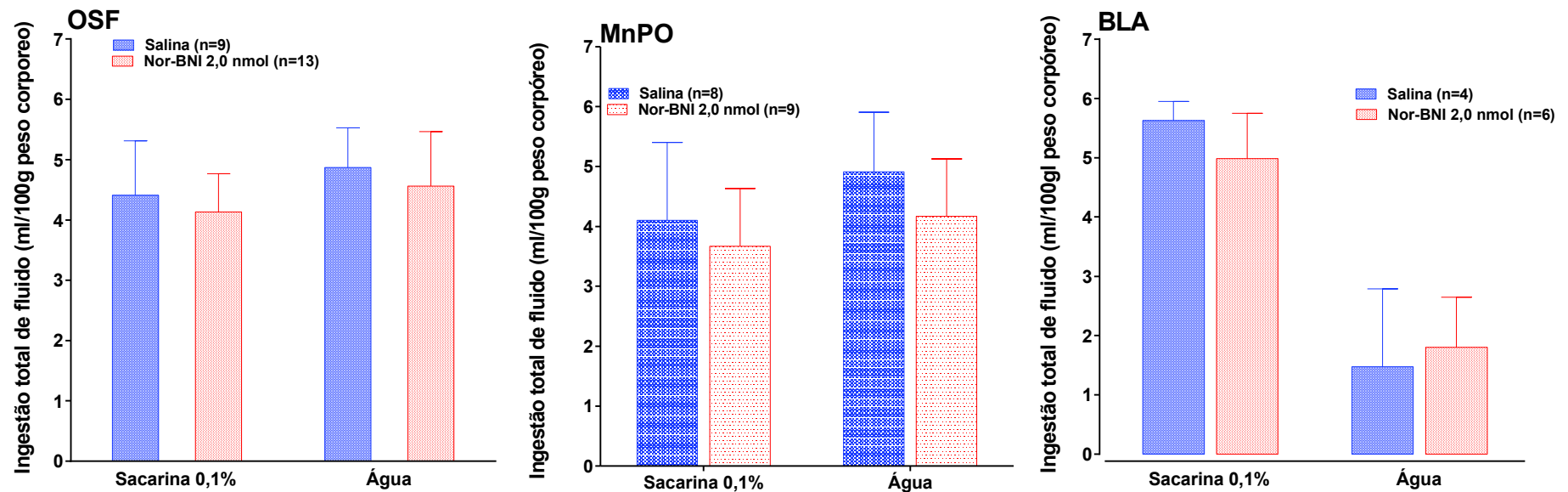


Figura 9: Teste de Sobremesa realizado em animais privados de água por 24 horas e tratados com Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 μ L no OSF, MnPO e BLA sobre a ingestão total de sacarina 0,1% e de água. Os animais controles foram tratados com salina 0,9% (n=9; n=8; n=4, respectivamente). Os dados são apresentados como médias \pm EPM. A análise estatística foi feita por meio do Teste “t” de Student não pareado, $p < 0,05$.

11. Efeito do bloqueio dos receptores kappa-opioides no OSF, MnPO e BLA sobre a atividade locomotora

A figura 10 mostra o Teste de Campo Aberto que foi realizado para verificar se a administração do antagonista seletivo para os receptores kappa-opioides, Nor-BNI, administrado em experimentos anteriormente descritos poderia ter alterado o padrão de atividade locomotora dos animais. Durante as sessões experimentais animais depletados de sódio receberam injeções de Nor-BNI na dose de 2,0 nmol/0,2 μ L e os animais controles receberam injeções centrais de solução salina isotônica 0,9% (0,2 μ L) e foram transferidos para a caixa teste. Os dados mostram que a atividade locomotora dos animais que receberam injeções de Nor-BNI e os animais controles foi similar entre os animais canulados nas diferentes áreas. A análise não pareada do teste “t” de Student indica para OSF [t=6; df=0,5439; p=0,6061], para MnPO [t=6; df=2,227; p=0,0675] e para BLA [t=8; df=1,249; p=0,2469], respectivamente.

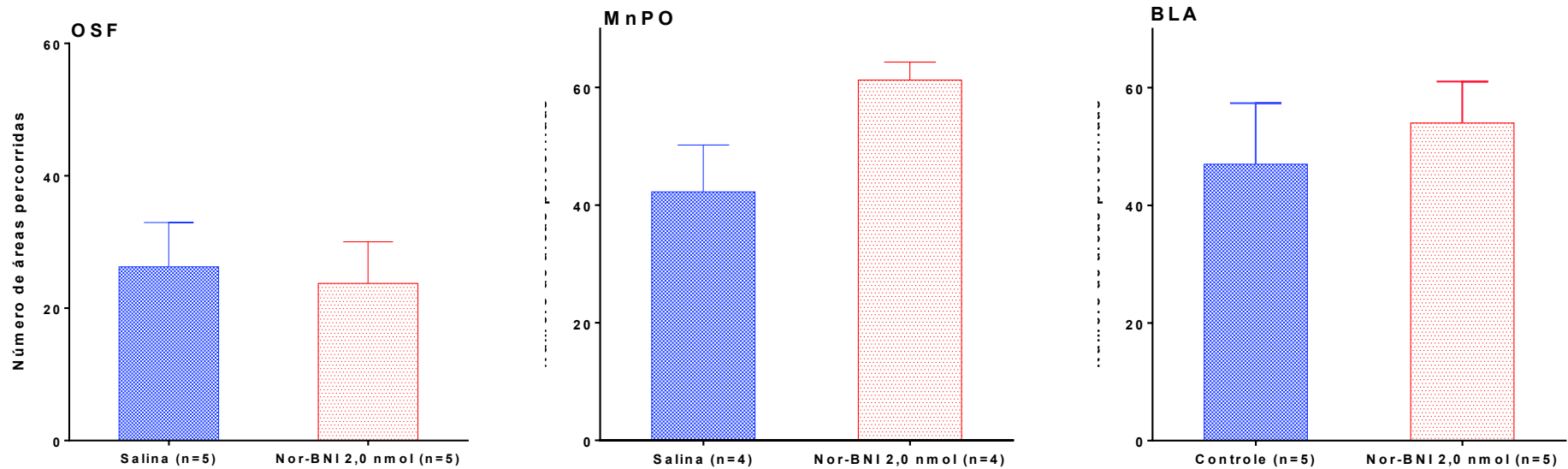


Figura 10: Teste de Campo Aberto realizado em animais depletados de sódio e tratados com Nor-BNI 2,0 nmol/0,2 μ L no OSF, MnPO e BLA. Os animais controles foram tratados com salina (n=5; n=4; n=5, respectivamente). Os dados são apresentados como médias \pm EPM. A análise estatística foi feita por meio do Teste “t” de Student não pareado, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi dividido em duas partes, na primeira parte investigou-se o papel dos receptores delta-opioides centrais sobre o apetite específico por sódio e na segunda parte verificou-se a participação dos receptores kappa-opioides localizados no OSF, no MnPO e no núcleo BLA sobre o apetite por sódio.

O antagonista naltrindole e o agonista deltorfina II utilizados na primeira parte do presente estudo apresentam alta potência e seletividade aos receptores delta-opioides demonstradas em estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes tecidos corporais (PORTOGHESE; SULTANA; TAKEMORI, 1988; 1990a; 1990b; ERSPAMER ET AL., 1989). A presença de um domínio C-terminal, localizado na terceira alça extracelular dos receptores delta-opioides se constitui em sítio de ligação ao grupo fenólico do NTI (PORTOGHESE; SULTANA; TAKEMORI, 1990b; LI ET AL., 1996; FUKUDA; KATO; MORI, 1995). A capacidade de ligação do NTI ao receptor delta-opioide foi demonstrada por Portoghese e colaboradores (1990b) com constante de dissociação (K_i) de $0,03 \pm 0,001-0,17$. A deltorfina II é um heptapeptídeo de ocorrência natural com alta afinidade e seletividade para os receptores delta-opioides demonstrada em estudos *in vivo* utilizando tecido cerebral de ratos. A ligação da deltorfina II ao domínio C-terminal dos receptores delta-opioides se dá pela sequência tripeptídica N-terminal (tirosina-D-alanina-fenilalanina) com K_i de $1,03 \pm 0,21$ (ERSPAMER ET AL., 1989; MELCHIORRI ET AL., 1991; BARRA ET AL., 1994). Injeção intratecal de deltorfina II em ratos produz inibição dose dependente da resposta à dor produzida no teste *tail-flick* durante o tempo de 10 a 60 segundos. Este efeito inibitório desaparece quando naltrindole é injetado bloqueando deltorfina II com uma potência 4 vezes maior que outros agonistas utilizados (IMPROTA; BROCCARDO, 1992; LUNZER; PORTOGHESE, 2007). Esses estudos mostram que o efeito produzido por deltorfina II pode ser revertido pelo antagonista naltrindole haja vista a afinidade de ligação ao mesmo sítio no receptor delta-opioide.

Na segunda parte do presente estudo investigamos o papel dos receptores kappa-opioides em áreas cerebrais específicas sobre o controle do apetite por sódio. Para tal utilizamos agonistas e antagonistas específicos, ICI_{199,441} e Nor-BNI, respectivamente. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram alta seletividade e afinidade de Nor-BNI para os receptores kappa-opioides testadas em vários sistemas e ensaios farmacológicos

(PORTOGHESE ET AL., 1988; TAKEMORI ET AL., 1988). A carga negativa do domínio extracelular dos receptores kappa-opioides, diferenças nas estruturas secundária e terciária do receptor e sequências N e C-terminal da alça extracelular diferentes dos outros tipos de receptores opioides contribui para seletividade de ligantes ao receptor kappa-opioide (MENG ET AL., 1993; CHEN ET AL., 1997). Portoghesse e colaboradores (1988) demonstraram que Nor-BNI possui um grupo hidroxil fenólico livre que se liga aos receptores kappa-opioides. Estudos *in vivo* mostram K_i de $3,28 \pm 0,43 \text{ sec}^{-1}$ para Nor-BNI (MARKI ET AL., 2000). O ICI_{199,441} é um agonista opioide pertencente à classe aril acetamida que possui alta afinidade e seletividade para os receptores kappa-opioides demonstrada em estudos *in vitro* (CHEN ET AL., 1997; KUMAR ET AL., 2000). Possui K_i de $0,054 \pm 0,039-0,076$ e é 146 vezes mais potente em ligar-se aos receptores kappa-opioides do que o agonista U50,488 demonstrada *in vivo* no modelo *vas deferens* em camundongos (COSTELLO ET AL., 1991; KUMAR ET AL., 2000). Estudo de nocicepção induzido pelo teste de pressão da pata realizado em ratos mostra que ICI_{199,441} injetado subcutaneamente produz antinocicepção em modo dose dependente. Esta resposta é significativamente inibida quando os animais são pré-tratados com Nor-BNI subcutaneamente, demonstrando afinidade ao receptor opioide e capacidade de reverter o efeito de sua ligação (ENDO ET AL., 2000).

Na primeira parte deste estudo observa-se que o bloqueio dos receptores delta-opioides centrais reduz significativamente o apetite específico por sódio induzido em duas condições experimentais: administração de furosemida e estimulação farmacológica das vias angiotensinérgicas centrais. Por outro lado, a estimulação dos receptores delta-opioides centrais aumenta significativamente a ingestão de sal em ratos repletos de sódio. A redução do apetite específico por sódio verificado após o bloqueio dos receptores delta-opioides centrais parece ser uma ação específica relacionada à ingestão de sódio e não uma inibição generalizada do comportamento ingestivo, desde que a ingestão de sacarina, que traduz um comportamento hedônico na espécie animal utilizada, não foi modificada após tal procedimento farmacológico. Além disso, podemos excluir que a inibição do apetite específico por sódio, verificado após o bloqueio delta-opioide central, seja consequente a qualquer tipo de depressão geral do SNC que pudesse ter gerado inibição da atividade locomotora dos animais e que inviabilizasse o acesso destes aos bebedouros. É também importante ressaltar que a redução do apetite específico por sódio que ocorre após o bloqueio delta-opioide central

não é decorrente de modificações da pressão sanguínea, desde que esta variável não foi significativamente modificada após administração central do mesmo antagonista delta-opioide seletivo que produziu a resposta antinatriorética aqui evidenciada.

O papel dos receptores delta-opioides no controle do apetite específico por sódio não é claro, assim, optamos por fazer a administração do agonista e do antagonista delta-opioide na cavidade ventricular (VL esquerdo), uma vez que as cavidades ventriculares refletem a *status* osmótico do LIC além de possuir estruturas adjacentes que possuem neurônios osmosensíveis. A administração i.c.v. possibilita a avaliação funcional geral no SNC dos receptores delta-opioides sobre o apetite específico por sódio. OCVs são ricamente vascularizados com capilares fenestrados próximos a neurônios eferentes pericapilares e estão envolvidos na transmissão das informações relacionadas com o equilíbrio hidrossalino originadas na circulação sanguínea periférica e apresentando receptores para diversos peptídeos circulantes, tais como AII, peptídeo natriurético atrial e interleucina (MANGIAPANE ET AL., 1984; TANAKA; HORI; NOMURA, 2001; PULMAN ET AL., 2006). Além disso, os OCVs apresentam diferentes tipos de receptores opioides identificados em áreas envolvidas no controle do equilíbrio hidrossalino como OSF, OVLT e área postrema e apresentam ampla distribuição no SNC (MANSOUR ET AL., 1987). O sistema neuronal produtor de endorfinas, encefalinas e dinorfinas é encontrado em diversas áreas cerebrais tais como amígdala, área tegmental ventral, área preóptica, núcleo *accumbens*, caudado e *putamen* (MOSKOWITZ; GOODMAN, 1984; MANSOUR ET AL., 1987).

Neurônios sensíveis às variações de osmolaridade estão distribuídos no SNC em áreas cerebrais como os OCVs e estruturas presentes na lâmina terminal, tais como o OVLT e OSF (NODA; HIYAMA, 2005; BOURQUE ET AL., 2007; NODA, 2007). Estudos de imagem por meio de ressonância magnética funcional revelam que AV3V é ativada durante aumento da osmolaridade em animais e humanos sugerindo a presença de osmosensores nessa região cerebral (EGAN ET AL., 2003; MORITA ET AL., 2004). Injeção de salina hipertônica no 3º ventrículo cerebral de ratos estimula a secreção de ADH e a resposta dipsogênica enquanto lesões no OSF, no MnPO e no OVLT reduzem esta resposta dipsogênica (MANGIAPANE ET AL., 1984; THRASHER; KEIL 1987; BUGGY ET AL., 1979).

Diversos estudos evidenciam o envolvimento do OSF na modulação do equilíbrio dos líquidos corpóreos (PULMAN ET AL., 2006; NA ET AL., 2007; DE LUCA ET AL., 2010; PEREIRA-DERDERIAN ET AL., 2010). Achados neuroanatômicos demonstram que carbacol e AII injetados periféricamente atuam no OSF estimulando o comportamento de ingestão, enquanto que lesão nessa área aboliu esse comportamento (SIMPSON; ROUTTENBERG, 1973; 1975; 1978). A importância funcional do OSF sobre o controle do balanço dos líquidos corpóreos é confirmado por diferentes estudos em que a ingestão de água e de salina em ratos depletados de sódio foi reduzida (CREWS; ROWLAND, 2005; BADAUE-PASSOS ET AL., 2007; NA ET AL., 2007). Além disso, outros estudos demonstram ativação da proteína FOS no OSF após episódios de depleção de sódio ou administração central de angiotensina I e II (HOUP ET AL., 1998; THUNHORST ET AL., 1998; ROWLAND; GOLDSTEIN; ROBERTSON, 2003; CREWS; ROWLAND, 2005).

O MnPO é um subnúcleo da área preóptica, ocupando a maior parte da linha medial da lâmina terminal (CIRIELLO; GUTMAN, 1991; GUTMAN; CIRIELLO; MOGENSEN, 1986; LIND; JOHNSON, 1982; MISELIS; SHAPIRO; HAND, 1979; SAPER; LEVISOHN, 1983). Anatomicamente, a lâmina terminal forma a parede anterior do terceiro ventrículo cerebral e é constituída por três estruturas, o MnPO, o OSF e o OVLT, sendo que os neurônios dos dois últimos núcleos fazem contato com a cavidade ventricular e fazem parte dos OCVs (GROB ET AL., 2003). Estudos de lesão no MnPO mostram redução na ingestão de solução salina induzida por tratamento crônico com captopril por via oral ou depleção de sódio sem afetar a ingestão de água estimulada por diferentes tratamentos (FITTS ET AL., 2003). Resultado semelhante é observado quando as lesões ocorrem no hipotálamo com ativação angiotensinérgica no MnPO em animais pré-tratados com fenilefrina (DOVALE ET AL., 1997). Estudos de expressão da proteína FOS mostram aumento da imunorreatividade a essa proteína no OSF, MnPO e núcleo paraventricular quando camundongos recebem injeção i.c.v. de AII (CREWS; ROWLAND, 2005). Expressão FOS é também observada no MnPO, OVLT e nos núcleos supraóptico e paraventricular quando animais são desidratados (GOTTLIEB ET AL., 2006). Esses achados sugerem que o MnPO ou as fibras de passagem que o atravessam podem desempenhar importante papel no controle da ingestão de água e de Na⁺.

Os OCVs apresentam conexões neurais com outras estruturas cerebrais, tais como área hipotalâmica, BST, núcleos supraóptico e paraventricular e amígdala (MISELIS; SHAPIRO; HAND, 1979; WILKIN ET AL., 1989; MCKINLEY; HARDS; OLDFIELD, 2003). Localizada no lobo temporal, a amígdala apresenta conexões recíprocas com o núcleo do trato solitário e com o núcleo paraventricular, que recebem informações referentes ao sabor dos alimentos e sinais viscerais decorrentes de mudanças homeostáticas (SAH ET AL., 2003). Além disso, a amígdala apresenta receptores para ALDO e AII e é provável que a ativação desses receptores esteja envolvida na mediação da regulação da ingestão de sódio (DENICOLA; GRILLO; GONZALEZ, 1992; MCEWEN ET AL., 1986; NITABACH; SCHULKIN; EPSTEIN, 1989; SAKAI ET AL., 1996; SCHULKIN; MARINI; EPSTEIN, 1989; ZHANG; EPSTEIN; SCHULKIN, 1993). Apesar dessas evidências poucos estudos têm demonstrado a participação da amígdala na regulação da ingestão de sal. Estudos com lesão eletrolítica bilateral no núcleo CeA mostram redução na ingestão diária de salina hipertônica após bloqueio serotoninérgico no núcleo parabraquial lateral e em ratos injetados com furosemida isolada ou associada com captopril, deoxicorticosterona ou ioimbina (GALAVARNA ET AL., 1992; ZARDETTO-SMITH; BELTZ; JOHNSON., 1994; VENDRAMINI ET AL., 2009; ANDRADE-FRANZÉ ET AL., 2010).

Uma complexa rede neuronal amplamente distribuída no SNC está envolvida no controle da ingestão de alimentos tais como núcleo *accumbens*, área tegmental ventral, amígdala e núcleos hipotalâmicos (BERTHOUD, 2002). O comportamento ingestivo pode ser regulado pelo mecanismo de recompensa, envolvendo aspectos hedônicos dos alimentos (ingestão não homeostática), bem como pelo mecanismo homeostático, envolvendo a ingestão de micro ou macro nutriente contidos nos alimentos (GOSNELL; PATEL, 1993; BERRIDGE; ROBINSON; ALDRIDGE, 2009). O controle de ambos os mecanismos parece ter a participação dos receptores opioides (DEPAOLI ET AL., 1994; MANSOUR ET AL., 1987; 1994; GACKENHEIMER ET AL., 2005). Injeções centrais e periféricas de morfina, agonista específico dos receptores mu-opioides, aumenta a ingestão de alimentos de um modo geral e também mostram papel na preferência por alimentos de sabor doce ou ricos em gordura (BODNAR; KLEIN, 2005; BODNAR, 2014). Alguns estudos sugerem que os receptores opioides centrais participam da modulação do comportamento alimentar mediado pela palatabilidade pelo prazer que o alimento proporciona (KELLEY ET AL., 2002; GOSNELL; PATEL,

1993; INUI; SHIMURA, 2014; KATSUURA; TAHA, 2014). Além do seu envolvimento na ingestão de alimentos o sistema opioidérgico central participa da regulação de outras funções corporais tais como controle da pressão arterial, controle da temperatura corporal, atividade sexual, analgesia e comportamento emocional (BODNAR, 2014).

O bloqueio dos receptores delta-opioides centrais pelo antagonista específico delta-opioide, NTI, reduziu significativamente a ingestão de solução salina hipertônica a 1,5%, em modo dose dependente, em ratos depletados de sódio. A administração no VL do agonista delta-opioide específico, deltorfina II, em diferentes doses impede o efeito antinatriorético produzido pelo bloqueio do antagonista NTI em ratos depletados de sódio. A ingestão de água não foi alterada pela administração central de NTI ou de deltorfina II corroborando com dados de outros autores em que injeções centrais de drogas opioides não alteraram a ingestão de água (BECZKOWSKA ET AL., 1992; ZHANG; KELLEY, 2002; INUI; SHIMURA, 2014).

Alguns estudos vêm investigando quanto a participação do sistema opioidérgico na modulação do apetite por sódio, a maior parte destes tem focado o papel dos receptores mu-opioides sobre o comportamento ingestivo de água e de sal em diferentes modelos de estudo que induzem o apetite por sódio em ratos (ZHANG; KELLEY, 2002; YAN ET AL., 2014). Apesar do receptor delta-opioide ter sido identificado em áreas cerebrais envolvidas no equilíbrio hidrossalino, estudos que evidenciem sua participação no comportamento regulatório da ingestão de sal são poucos. Em um destes estudos verifica-se que injeções i.c.v. de naltrindole não altera a ingestão de salina hipotônica (0,6%) e hipertônica (1,7%) em teste de preferência de água e de solução salina em ratos privados de água por 24 horas (BODNAR ET AL., 1995). Neste estudo a dose de naltrindole usada foi maior (42 nmol/rato) do que aquela usada em nosso trabalho (5-20 nmol/2 µL) e o método de indução do apetite por sódio é menos eficaz do que a depleção de sódio induzida por furosemida (LUNDY ET AL., 2003; NA ET AL., 2007). Em outro estudo usando o modelo de depleção de sódio os autores observam que injeções centrais de naltrindole reduzem a ingestão de solução salina hipertônica (LUCAS; GRILLO; MCEWEN, 2003; 2007). Contudo, nesses estudos, naltrindole foi microinjetado em uma única dose enquanto que no presente estudo o uso de diferentes doses de naltrindole revelou uma inibição do apetite por sódio de modo dose dependente. Os dados da literatura e do presente trabalho sugerem que durante a

depleção de sódio pode ocorrer aumento na liberação de peptídeos opioides endógenos do tipo encefalina, que seria importante para induzir o apetite específico por sódio.

Estudos de expressão de RNAm para encefalina mostram aumento nos níveis de RNAm para encefalina na região de concha do núcleo accumbens de ratos depletados de sódio que tiveram acesso a bebedouros contendo solução salina hipertônica (LUCAS; GRILLO; MCEWEN, 2007). Esses autores sugerem que o sistema encefalinérgico central participa do mecanismo de recompensa, isso corrobora a ideia de que a encefalina central controla a ingestão de solução salina hipertônica em ratos depletados de sódio como o observado no presente trabalho.

Depleção de sódio induzida por injeções de furosemida aumenta a expressão da proteína FOS no OSF, no OVLT, no MnPO, no núcleo BLA, no núcleo *accumbens*, no BST, nos núcleos paraventricular, supraóptico, supraquiasmático e ventromedial do hipotálamo, no núcleo do trato solitário e no núcleo parabraquial lateral (THUNHORST, 1998; NA ET AL., 2007). Estudos de co-localização de receptores para angiotensina tipo 1 (AT1) e expressão de proteína FOS na população neuronal do OSF de animais depletados de sódio mostram a presença simultânea de receptores AT1 e ativação da proteína FOS (GROB; TROTTIER; MOUGINOT, 2004). A ativação da proteína FOS também foi observada em outras áreas cerebrais tais como núcleo *accumbens*, núcleo CeA e BST co-localizando com expressão de RNAm para o peptídeo encefalina (GRONDIN ET AL., 2011). A estimulação dessas estruturas durante o processo de depleção de sódio ativa uma rede neuronal moduladora do apetite por sódio com participação efetiva de neurônios encefalinérgicos.

No presente trabalho investigamos também o papel dos receptores delta-opioides centrais em um segundo modelo de indução do apetite por sódio pela administração central de AII. Verificou-se que o bloqueio dos receptores delta-opioides foi capaz de reduzir a ingestão de salina hipertônica a 1,5% mas não interferiu na ingestão de água induzida pela AII.

O sistema renina-angiotensina participa da modulação do apetite por sal em ratos depletados de sódio pela ação do diurético de alça, furosemida (JOHNSON; THUNHORST, 1997; FITZSIMONS, 1999). Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), tanto em nível central como periférico, reduz ou inibe completamente o apetite por sal induzido por furosemida (JOHNSON; THUNHORST,

1997). ALDO e AII secretadas periféricamente e SRA cerebral agem sinergicamente estimulando a ingestão de salina hipertônica de modo mais intenso do que se atuassem de modo isolado sobre este comportamento motivado (GEERLING; LOEWY, 2008). Além disso, a administração central de AII produz efeito dipsogênico e natriorexigênico em animais normoidratados e repletos de sódio, este efeito pode ser inibido pela administração i.c.v. de losartan, antagonista dos receptores AT1.

Evidências neuroanatômicas mostram a existência de uma interação entre os sistemas angiotensinérgico e encefalinérgico centrais. Estudo de imunomarcção histoquímica, usando análise microscópica eletrônica e óptica, detectou conexões neuronais sinápticas entre neurônios contendo AII e neurônios encefalinérgicos presentes na área postrema (GUAN ET AL., 2001). Alguns estudos têm demonstrado que ECA participa da inativação metabólica de neuropeptídios nos terminais neuronais encefalinérgicos (KONKOY; DAVIS, 1996; MALFROY ET AL., 1978; SKIDGEL; ERDÖS, 2004). Além disso, observa-se em ratos depletados de sódio sobreposição de áreas cerebrais que apresentam maior regulação de RNAm para receptores do tipo AT1 e para o peptídeo encefalina (GUAN ET AL., 2001; CHARRON ET AL., 2002; GROB; TROTTIER; MOUGINOT, 2004). Esses dados fornecem suporte neuroanatômico para explicar os presentes dados onde o bloqueio dos receptores delta-opioides inibiu de forma dose dependente o efeito natriorexigênico da AII.

Os efeitos da administração do antagonista delta-opioide sobre o efeito dipsogênico resultante da ativação angiotensinérgica central depende do protocolo experimental utilizado. Injeções centrais de naltrindole na dose de 40 nmol inibiu a ingestão de água induzida por angiotensina II em estudos que investigavam apenas esse comportamento ingestivo. Efeito oposto foi observado quando o agonista deltorfina II foi injetado, aumentando a ingestão de água (RUEGG; YU; BODNAR, 1997). Aumento na ingestão de água após estimulação delta-opioide pela administração de deltorfina II i.c.v. pode ainda ser observada quando angiotensina II é administrada em doses menores (0,02 ng/10 µL), mas, quando a concentração de angiotensina II se eleva (2 ng/10 µL), a ingestão de água não se altera (YU; BODNAR, 1997). No presente estudo o protocolo utilizado foi de dupla escolha e os animais tinham disponíveis bebedouros com água destilada e com salina 1,5%. Nestas condições tanto o naltrindole quanto deltorfina II não modificaram a ingestão de água induzida por angiotensina II.

Em nosso estudo, injeções i.c.v. de deltorfina II em animais repletos de sal aumentou a ingestão de solução salina hipertônica 1,5%. Resultados semelhantes com estimulação dos receptores mu-opioides pela injeção de DAMGO no núcleo CeA de ratos repletos de sódio estimula a ingestão de solução salina hipertônica 0,3 M (YAN ET AL., 2014). Os dados obtidos neste trabalho com o bloqueio e com a estimulação farmacológica dos receptores delta-opioides centrais sugerem um papel modulador desses receptores sobre o apetite por sódio. A deficiência de sódio produzida pela injeção de furosemida ativa o sistema opioidérgico central alterando a percepção do sabor salgado de uma solução naturalmente aversiva para ratos, induzindo-os a ingerir solução salina hipertônica. Em ambas as condições, depletados de sódio e repletos de sódio, os animais ingeriram água de modo semelhante aos respectivos controles, demonstrando que o bloqueio ou a estimulação farmacológica sobre os receptores delta-opioides centrais não interfere na quantidade de água ingerida nestes modelos experimentais.

Uma vez que o bloqueio dos receptores delta-opioides por administração i.c.v. de NTI mostrou inibição da ingestão de salina hipertônica decidimos avaliar o aspecto hedônico do comportamento ingestivo. Além disso, estudos sobre preferência alimentar e discriminação do sabor pela via orosensória podem ser alterados em função do uso de antagonistas opioides (MOOK, 1963; BECZKOWSKA ET AL., 1993 LEVENTHAL ET AL., 1995). O Teste de Sobremesa mostra que a ingestão ou a palatabilidade da solução de sacarina 0,1% não foi alterada pelas injeções de NTI no VL, sugerindo que, mudanças na ingestão de sal, promovidas pelo bloqueio dos receptores delta-opioides em animais depletados e em animais repletos de sódio, não estão relacionadas com mudanças gerais na palatabilidade do animal a ponto de alterar seu comportamento ingestivo.

Alguns estudos têm demonstrado que injeções centrais de antagonistas para os receptores delta-opioides exercem efeito sobre a atividade locomotora e estereotipada de alguns animais (LEVENTHAL; BODNAR, 1996). Essas alterações comportamentais podem influenciar a atividade locomotora dos animais influenciando seu comportamento ingestivo. Contudo, no presente estudo não ocorreu mudança na atividade locomotora dos animais, verificada através do Teste de Campo Aberto, em decorrência do uso do antagonista dos receptores delta-opioides, NTI, injetado no VL.

Dentre as diversas funções atribuídas aos peptídeos opioides está a regulação da função cardiovascular (BODNAR, 2014; VACCARINO; KASTIN, 2000). Alguns estudos têm demonstrado que os receptores opioides estão envolvidos na modulação da resposta hipotensiva assim como da resposta hipertensiva (LAUBIE ET AL., 1977; LANG ET AL., 1982; KU, 2006). Mudanças na pressão sanguínea podem afetar a ingestão de sal, contudo a hipertensão que poderia ser produzida pela diminuição na ingestão de sal observada neste estudo após injeção de NTI no VL não alterou a pressão arterial de ratos depletados de sódio.

Em dados anteriores do nosso grupo verificamos respostas semelhantes quando os receptores kappa-opioides centrais foram bloqueados por meio de antagonista específico (NASCIMENTO ET AL., 2012). Nor-BNI injetado i.c.v. inibe o apetite específico por sódio em ratos depletados deste íon e em ratos que foram induzidos ao apetite por sódio pela ativação angiotensinérgica central, em modo dose dependente. Ao contrário do presente estudo, a ativação dos receptores kappa-opioides não alterou a ingestão de solução salina hipertônica em animais repletos de sódio. Em contraste a esses resultados, outro estudo utilizando o modelo de privação de água por 24 horas, em que Nor-BNI foi injetado i.c.v., a ingestão de salina hipotônica e hipertônica não foi alterada (BODNAR ET AL., 1995). Analisando esses estudos observa-se que, no estudo realizado pelo grupo do Bodnar, a medida da ingestão das soluções salinas foi registrada durante 3 horas, com uma única medida da ingestão. Já no estudo realizado por nosso grupo a medida da ingestão foi cumulativa e realizada durante um período de 2 horas em intervalos regulares de tempo. Além disso, observa-se que o modelo de estudo para indução do apetite por sódio utilizado em nosso estudo, depleção de sódio induzida por injeção de furosemida, é mais eficiente do que o modelo de privação de água utilizado pelo grupo do Bodnar (LUNDY ET AL., 2003; NA ET AL., 2007).

No presente estudo decidimos também verificar o papel dos receptores kappa-opioides em áreas cerebrais específicas. Escolhemos duas áreas periventriculares e uma estrutura límbica envolvida no controle do apetite específico por sódio. Os dados obtidos na segunda parte deste trabalho evidenciam que o bloqueio dos receptores kappa-opioides centrais nas áreas específicas OSF, MnPO e núcleo BLA reduz significativamente o apetite específico por sódio induzido pela administração de furosemida. Essa inibição foi dose-dependente para os animais injetados com Nor-BNI no núcleo BLA e no MnPO enquanto os animais injetados no OSF apresentaram

inibição na ingestão de salina semelhante nas três doses de antagonista kappa-opioide que foram utilizadas, quando comparados aos grupos controles. A inibição na ingestão total de salina 1,5% ao final de 2 horas foi significativamente diferente entre os núcleos OSF, MnPO e BLA nas doses de Nor-BNI 0,5 e 1,0 nmol, sugerindo maior atividade dos receptores kappa-opioides no OSF e no MnPO. O efeito antinatriorexigênico produzido pelo bloqueio kappa-opioide foi impedido pela ação do agonista específico ICI_{199,441}. A ingestão de água observada após o bloqueio farmacológico dos receptores kappa-opioides localizados nas áreas específicas citadas acima não sofre modificação neste modelo de indução do apetite por sódio. A estimulação farmacológica dos receptores kappa-opioides no OSF, no MnPO e no núcleo BLA em ratos depletados de sódio, se mostrou incapaz de alterar a ingestão de salina hipertônica e de água em animais repletos de sódio. A redução do apetite específico por sódio verificado após o bloqueio dos receptores kappa-opioides no OSF, no MnPO e no núcleo BLA parece ser uma resposta relacionada à ingestão de sódio especificamente, uma vez que a ingestão de sacarina, que traduz um comportamento hedônico, não foi modificada após o farmacológico. Além disto, a inibição do apetite específico por sódio, verificado após o bloqueio kappa-opioide no OSF, no MnPO e no núcleo BLA, não parece ser devida a inibição generalizada da atividade cerebral desde que o Nor-BNI não modifica a atividade locomotora.

A distribuição anatômica dos receptores kappa-opioides sugere um importante papel para opioides endógenos no controle da recompensa e na modulação do comportamento ingestivo. Estudos em ratos mostram níveis elevados de expressão de RNAm para os receptores kappa-opioides na área tegmental ventral, na substância *nigra*, no núcleo *accumbens*, no caudado e *putamen*, no *claustrum*, no núcleo endopiriforme, em vários núcleos hipotalâmicos, no OSF, no MnPO e na amígdala (MANSOUR ET AL., 1987; MENG ET AL., 1993). A expressão de RNAm para os receptores kappa-opioides também foi detectada no cérebro de humanos, mostrando um perfil de similaridade com os ratos (SIMONIN ET AL., 1995; ZHU ET AL., 1995). Estudos de autorradiografia e de imunohistoquímica mostram a existência de sobreposição na expressão do RNAm para os receptores kappa-opioides e para o peptídeo endógeno dinorfina em ratos (MANSOUR ET AL., 1987; 1996). Vários modelos animais são usados para demonstrar o envolvimento dos receptores kappa-opioides centrais no mecanismo da recompensa à ingestão alimentar (MINER ET AL.,

2012; CASTRO; BERRIDGE, 2014), contudo, modelos que demonstrem seu envolvimento na modulação do comportamento ingestivo de água e de sal não estão bem estabelecidos.

Regiões osmorregulatórias centrais tais como núcleo hipotalâmico paraventricular, núcleo supraóptico, MnPO, OSF e OVLT, mostram aumento da expressão da proteína FOS em ratos depletados de sódio induzido por injeção subcutânea de furosemida (GRONDIN ET AL., 2011) e por injeção intraperitoneal de NaCl em camundongos nocaute para os receptores AT1 (MCKINLEY et al., 2008). Além disso, diferentes protocolos de indução do apetite por sódio como injeções periféricas do antagonista para os receptores AT1, losartan, ou injeções i.c.v. de ATII ou hipovolemia induzida por polietileno glicol, confirmam a expressão da proteína FOS nas áreas citadas acima (CREWS; ROWLAND, 2005). A ativação de núcleos centrais sensíveis às variações na osmolaridade plasmática após depleção de sódio induzida por furosemida altera também a excitabilidade de neurônios opioidérgicos localizados no MnPO (HENRY; DROLET; MOUGINOT, 2008).

Canais sensíveis a variações na concentração de Na^+ (Na_x) foram identificados em neurônios localizados no OSF, no OVLT e no MnPO (WATANABE ET AL., 2000; 2003; 2006; HIYAMA ET AL., 2004; NEHME ET AL., 2012). Dupla marcação imunohistoquímica revela que os canais Na_x estão localizados nos processos perineuronais de astrócitos e células endoteliais presentes no OSF e no OVLT (WATANABE ET AL., 2006; SHIMIZU ET AL., 2007). Apesar de fazer parte da família dos canais voltagem-dependente que transportam Na^+ , os canais Na_x são estruturalmente diferentes dos demais canais dessa família apresentando 50% de homologia (GOLDIN ET AL., 2000). Quando os animais são desidratados a concentração extracelular de Na^+ aumenta, de 145 mM para 170 mM, elevando também a concentração intracelular de Na^+ de grupos celulares localizadas no OSF, no MnPO e no OVLT que aumentam a expressão dos canais Na_x elevando o influxo de Na^+ (HYAMA ET AL., 2004; NODA; HYAMA 2005). Ativação dos canais Na_x leva à inativação dos canais $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ das células desses mesmos OCVs aumentando a captação de glicose e ativando a glicólise anaeróbica para produzir ATP. O lactato resultante deste processo ativa neurônios gabaérgicos envolvidos no controle da ingestão de sal.

O aspecto hedônico do comportamento ingestivo foi avaliado, uma vez que o bloqueio dos receptores kappa-opioides em áreas específicas por administração de Nor-BNI no OSF, no MnPO e no núcleo BLA do presente estudo, mostrou inibição da ingestão de salina hipertônica. Antagonistas opioides podem alterar a preferência alimentar e a discriminação do sabor pela via orosensória (MOOK, 1963; BECZKOWSKA ET AL., 1993 LEVENTHAL ET AL., 1995). O teste de sobremesa mostra que a palatabilidade da solução de sacarina a 0,1% não foi alterada por Nor-BNI no OSF, no MnPO e no núcleo BLA. Esses dados sugerem que mudanças na ingestão de sal promovidas pelo bloqueio dos receptores kappa-opioides em animais depletados e em animais repletos de sódio não estão relacionadas com mudanças gerais na palatabilidade do animal a ponto de alterar seu comportamento ingestivo. Além disso, fica evidente que o bloqueio kappa-opioide não impossibilita o animal de experimentar soluções prazerosas como a sacarina, uma vez que a anedonia se constitui em um dos principais sintomas de depressão do humor.

Alguns estudos têm demonstrado que injeções centrais de antagonistas para os receptores kappa-opioides reduzem significativamente a atividade locomotora e estereotipada de alguns animais (LEVENTHAL; COLE; BODNAR, 1996). Essas alterações comportamentais podem influenciar a atividade locomotora dos animais influenciando seu comportamento ingestivo. Contudo, no presente estudo não ocorreu mudança na atividade locomotora dos animais, verificada através do teste de campo aberto, em decorrência do uso do antagonista dos receptores kappa-opioides, Nor-BNI, injetados nas áreas específicas OSF, MnPO e BLA.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo confirmam nossa hipótese de que os receptores delta e kappa-opioides centrais participam da modulação da ingestão de solução salina hipertônica quando ocorre um desequilíbrio na homeostasia do sódio. Durante a depleção de sódio os receptores opioides podem ser ativados para modular o comportamento de ingestão de solução salina hipertônica e assim corrigir o desequilíbrio homeostático gerado pela depleção do sódio. É possível que em condição normonatrêmica o sistema opioidérgico não seja necessário para manutenção da homeostasia do sódio. A ativação geral do sistema opioidérgico (i.c.v.) leva à ativação

de estruturas importantes na transmissão de informações periféricas, como o OSF, sensíveis às variações plasmáticas no equilíbrio hidrossalino, que envia essas informações a núcleos integradores, como o MnPO, que, por sua vez, as envia para núcleos associados ao comportamento motivado, como o núcleo BLA. O bloqueio da ingestão de salina hipertônica observada nesse estudo mostrou-se específico à ingestão de sal sem alterar qualquer outro comportamento, como ingestão de solução sacarina, atividade locomotora e pressão arterial.

Durante a realização deste estudo foram encontrados alguns problemas e limitações. Animais que não se recuperaram bem da cirurgia estereotáxica e que foram, portanto, excluídos dos grupos experimentais, alguns erros de canulação dificultaram o fechamento dos grupos, além da natriofilia, ausente em alguns animais e custo elevado das drogas injetadas nos animais. Apesar dessas dificuldades o estudo foi realizado a contento e os resultados obtidos representam de modo fidedigno os comportamentos observados.

Mais estudos envolvendo o sistema opioidérgico e áreas envolvidas no equilíbrio hidroeletrólítico e no mecanismo de recompensa à ingestão alimentar precisam ser realizados para melhor elucidar o papel dos receptores delta e kappa-opioides centrais na modulação do apetite específico por sódio, haja vista a importância desse sistema de neurotransmissão na modulação de diversas funções fisiológicas.

REFERÊNCIAS

1. AKIL, H. et al. Endogenous opioids - biology and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 7, p. 223-255, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984SF81000010 >.
2. ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders - the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 1-39, 1988. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988Q633500001 >.
3. ANDERSON, W. A.; BRUNI, J. E.; KAUFMANN, A. Afferent connections of the rats supraoptic nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 191-200, 1990. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CU02200007 >.
4. ANDERSSON, B. Regulation of body-fluids. **Annual Review of Physiology**, v. 39, p. 185-200, 1977. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1977DA12100008 >.
5. ANDRADE, C. A. F. et al. Gabaergic and opioid receptors mediate the facilitation of NaCl intake induced by alpha(2)-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 535-541, 2015. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000347586300066 >.
6. ANDRADE, C. A. F. et al. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha(2)-adrenergic receptor agonist. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 702-708, 2011. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000296208200008 >.
7. ANDRADE-FRANZE, G. M. F. et al. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633-641, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000274002600001 >.
8. ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 169-208, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000187973900006 >.
9. BADAUE-PASSOS, D., JR. et al. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by depletion-induced sodium ingestion. **Experimental Neurology**, v. 206, n. 1, p. 86-94, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000247825000012 >.
10. BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 31-43, 2000. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000166220000003 >.

11. BARRA, D. et al. D-Leu(2) deltorphin, a 17 amino-acid opioid peptide from the skin of the brazilian hyloid frog, phyllomedusa-burmeisteri. **Peptides**, v. 15, n. 2, p. 199-202, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994ND90900001 >.
12. BECZKOWSKA, I. W. et al. Central opioid receptor subtype antagonists differentially reduce intake of saccharin and maltose dextrin solutions in rats. **Brain Research**, v. 618, n. 2, p. 261-270, 1993.
13. BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E.; ALDRIDGE, J. W. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 65-73, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000263817700011 >.
14. BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 393-428, 2002. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000178191300001 >.
15. BI, Z. et al. Hypertension Prevalence, Awareness, Treatment, and Control and Sodium Intake in Shandong Province, China: Baseline Results From Shandong-Ministry of Health Action on Salt Reduction and Hypertension (SMASH), 2011. **Preventing Chronic Disease**, v. 11, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000343522000021 >.
16. BLANCHAR. D.C.; BLANCHAR. R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n. 2, p. 281-290, 1972. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1972O049100015 >.
17. BLANK, M. et al. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 111, p. 1-8, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000335638100001 >.
18. BLONDE, G. D.; GARCEA, M.; SPECTOR, A. C. The relative effects of transection of the gustatory branches of the seventh and ninth cranial nerves on NaCl taste detection in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 580-589, 2006. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000238351300009 >.
19. BODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2013. **Peptides**, v. 62, p. 67-136, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000345614700010 >.
20. BODNAR, R. J.; GLASS, M. J.; KOCH, J. E. Analysis of central opioid receptor subtype antagonism of hypotonic and hypertonic saline intake in water-deprived rats. **Brain Research Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 293-300, 1995.
21. BODNAR, R. J. et al. General, mu and kappa-opioid antagonists in the nucleus-accumbens alter food-intake under deprivation, glucoprivic and palatable conditions. **Brain Research**, v. 700, n. 1-2, p. 205-212, 1995.

22. BODNAR, R. J.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2004. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2629-2711, 2005.
23. BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000256929300012 >.
24. BOURQUE, C. W. et al. Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 3, p. 499-505, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000245674500004 >.
25. BRUCHAS, M. R. et al. CRF1-R Activation of the Dynorphin/Kappa Opioid System in the Mouse Basolateral Amygdala Mediates Anxiety-Like Behavior. **Plos One**, v. 4, n. 12, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000207567200002 >.
26. BRYANT, H. U. et al. Effects of 2-percent sodium-chloride imbibition on various opiate related hyperphagic conditions. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 23, n. 3, p. 391-395, 1985.
27. BUGGY, J. et al. Osmo-sensitivity of rat 3rd ventricle and interactions with angiotensin. **American Journal of Physiology**, v. 236, n. 1, p. R75-R82, 1979. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1979GG94200067 >.
28. BUTLER, R. K. et al. Comparison of the activation of somatostatin- and neuropeptide Y-containing neuronal populations of the rat amygdala following two different anxiogenic stressors. **Experimental Neurology**, v. 238, n. 1, p. 52-63, 2012. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000309625400007 >.
29. BYKOWSKI, M. R.; SMITH, J. C.; STRICKER, E. M. Regulation of NaCl solution intake and gastric emptying in adrenalectomized rats. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 5, p. 781-789, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000251698400001 >.
30. CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 324, n. 2, p. 180-194, 1992. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992JP42000003 >.
31. CARDOSO, F. L.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain Research Reviews**, v. 64, n. 2, p. 328-363, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000282412900005 >.
32. CARVALHO, M. C. et al. Participation of NK1 receptors of the amygdala on the processing of different types of fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 102, p. 20-27, 2013. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000319543400004 >.

33. CASTREN, E.; SAAVEDRA, J. M. Lack of vasopressin increases hypothalamic atrial natriuretic peptide binding-sites. **American Journal of Physiology**, v. 257, n. 1, p. R168-R173, 1989. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989AF83000071 >.
34. CASTRO, D. C.; BERRIDGE, K. C. Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness "liking" and "wanting". **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 12, p. 4239-4250, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000333253300012 >.
35. CHANG, K. J. et al. Multiple opiate receptors - different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. **Molecular Pharmacology**, v. 16, n. 1, p. 91-104, 1979. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1979HE78300009 >.
36. CHARRON, G. et al. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. **Faseb Journal**, v. 16, n. 2, p. 610-612, 2002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174203700004 >.
37. CHEN, C. G. et al. Irreversible binding of *N*-methyl-*N*-(1*S*)-1-(4-isothiocyanatophenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)ethyl-3,4- dichlorophenylacetamide to the cloned rat kappa opioid receptor. **Life Sciences**, v. 61, n. 8, p. 787-794, 1997. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XN18400004 >.
38. CIRIELLO, J.; GUTMAN, M. B. Functional identification of central pressor pathways originating in the subfornical organ. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 1035-1045, 1991. ISSN 0008-4212. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991GB19500018 >.
39. CLARKE, S. et al. Autoradiography of opioid and ORL1 ligands in opioid receptor triple knockout mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 1705-1712, 2002. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000179240000009 >.
40. COBLE, J. P. et al. Activation of the renin-angiotensin system, specifically in the subfornical organ is sufficient to induce fluid intake. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 4, p. R376-R386, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000340834700003 >.
41. COSTELLO, G. F. et al. 2-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-methyl-*N*-2-(1-pyrrolidinyl)-1-substituted-ethy L-acetamides: the use of conformational-analysis in the development of a novel series of potent opioid kappa-agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 181-189, 1991. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991ET54500027 >.
42. COVIAN, M. R.; ANTUNES-RODRIGUES. J. Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in rat. **American Journal of Physiology**, v. 205, n. 5, p. 922-926, 1963.

43. CREWS, E. C.; ROWLAND, N. E. Role of angiotensin in body fluid homeostasis of mice: effect of losartan on water and NaCl intakes. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 3, p. R638-R644, 2005. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000226832800013 >.
44. D'AQUILA, P. S. et al. Possible role of dopamine D1-like and D2-like receptors in behavioural activation and "contingent" reward evaluation in sodium-replete and sodium-depleted rats licking for NaCl solutions. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 1, p. 99-106, 2012. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000301017500015 >.
45. DANIELS, D.; FLUHARTY, S. J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 319-337, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000222039600009 >.
46. DE GOBBI, J. I. F. et al. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Research**, v. 1301, p. 44-51, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000272100200005 >.
47. DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiology & Behavior**, v. 100, n. 5, p. 535-544, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000279988100016 >.
48. DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation and the double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 707-712, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000246576900015 >.
49. DE LUCA, L. A., JR et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R552-R559, 2002. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000173287100027 >.
50. DEHAVEN-HUDKINS, D. L.; DOLLE, R. E. Peripherally restricted opioid agonists as novel analgesic agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 7, p. 743-757, 2004. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000189383400005 >.
51. DELLMANN, H. D. Structure of the subfornical organ: A review. **Microscopy Research and Technique**, v. 41, n. 2, p. 85-97, 1998. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000073197400001 >.
52. DENICOLA, A. F.; GRILLO, C.; GONZALEZ, S. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of salt appetite control by mineralocorticoid action in brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 12, p. 1153-1162, 1992. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992KG52600001 >.

53. DENTON, D. A.; MCKINLEY, M. J.; WEISINGER, R. S. Hypothalamic integration of body fluid regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 14, p. 7397-7404, 1996.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1996UW79200102 >.
54. DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 350-358, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000258909300006 >.
55. DEPAOLI, A. M. et al. Distribution of kappa-opioid receptor mRNA in adult-mouse brain: an *in situ* hybridization histochemistry study. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 327-335, 1994.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994PA99900004 >.
56. DORN, J.; PORTER, J. C. Diencephalic involvement in sodium excretion in rat. **Endocrinology**, v. 86, n. 5, p. 1112-1117, 1970. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1970G342400025 >.
57. DOVALE, C. F. et al. Ibotenate lesion of the medial hypothalamus alters the salt intake and pressor responses to activation of the median preoptic nucleus in rats. **Journal of Physiology-Paris**, v. 91, n. 1, p. 31-37, 1997. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XB08900004 >.
58. DREBORG, S. et al. Evolution of vertebrate opioid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 40, p. 15487-15492, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000260360500050 >.
59. EGAN, G. et al. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15241-15246, 2003.
60. ENDOH, T. et al. Characterization of the antinociceptive effects of TRK-820 in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 2, p. 133-140, 2000.
61. ENGELHARDT, B. Development of the blood-brain barrier. **Cell and Tissue Research**, v. 314, n. 1, p. 119-129, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000186541800013 >.
62. ERSPAMER, V. et al. Deltorphins - a family of naturally-occurring peptides with high-affinity and selectivity for delta-opioid binding-sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5188-5192, 1989. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989AE15800081 >.

63. EVANS, C. J. et al. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1952-1955, 1992. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992KD08800037 >.
64. EVANS, R. M. et al. Heterodimerization of ORL1 and Opioid Receptors and Its Consequences for N-type Calcium Channel Regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 2, p. 1032-1040, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000273258200024 >.
65. FERAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: Hormonal control. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 345-418, 2001. ISSN 0031-9333. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000167405300010 >.
66. FILIZOLA, M.; LAAKKONEN, L.; LOEW, G. H. 3D modeling, ligand binding and activation studies of the cloned mouse delta, mu and kappa opioid receptors. **Protein Engineering**, v. 12, n. 11, p. 927-942, 1999.
67. FITCH, G. K.; PATEL, K. P.; WEISS, M. L. Activation of renal afferent pathways following furosemide treatment I. Effects of survival time and renal denervation. **Brain Research**, v. 861, n. 2, p. 363-376, 2000. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000086414100017 >.
68. FITTS, D. A. et al. Effects of central oxytocin receptor blockade on water and saline intake, mean arterial pressure, and c-Fos expression in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 6, p. R1331-R1339, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000186547300009 >.
69. FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. U4-U4, 1999. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000080163200001 >.
70. FLUHARTY, S. J.; EPSTEIN, A. N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin-II in the rat .2. synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 5, p. 746-758, 1983. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1983RL36900006 >.
71. FLYNN, F. W. et al. Central gustatory lesions .2. effects on sodium appetite, taste-aversion learning, and feeding behaviors. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 6, p. 944-954, 1991. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991GU02800015 >.
72. FRANCHINI, L. F.; RUBENSTEIN, M.; VIVAS, L. Reduced sodium appetite and increased oxytocin gene expression in mutant mice lacking beta-endorphin. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 875-881, 2003.

73. FRANKMANN, S. P.; SOLLARS, S. I.; BERNSTEIN, I. L. Sodium appetite in the sham-drinking rat after chorda tympani nerve transection. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, n. 2, p. R339-R345, 1996. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1996VE00200006 >.
74. FRINDT, G. et al. Epithelial Na channels and short-term renal response to salt deprivation. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 283, n. 4, p. F717-F726, 2002. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000177873300015 >.
75. FUKUDA, K.; KATO, S.; MORI, K. Location of regions of the opioid receptor involved in selective agonist binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 12, p. 6702-6709, 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QQ85500044 >.
76. GACKENHEIMER, S. L. et al. Localization of opioid receptor antagonist H-3 - LY255582 binding sites in mouse brain: Comparison with the distribution of mu, delta and kappa binding sites. **Neuropeptides**, v. 39, n. 6, p. 559-567, 2005. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000233960100003 >.
77. GALAVERNA, O. et al. Deficits in nacl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 89-98, 1992. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992GX88300011 >.
78. GALE, G. D. et al. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 15, p. 3810-3815, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000220845300012 >.
79. GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Central regulation of sodium appetite. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 2, p. 177-209, 2008.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000252443200002 >.
80. GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. **Nature**, v. 388, n. 6641, p. 471-474, 1997. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XN55300048 >.
81. GLOOR, S. M. et al. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 2-3, p. 258-264, 2001. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000172479100019 >.
82. GODINO, A. et al. Activation of lateral parabrachial afferent pathways and endocrine responses during sodium appetite regulation. **Experimental Neurology**, v. 221, n. 2, p. 275-284, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000274560800002 >.
83. GOLDIN, A. L. et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000165493700012 >.

84. GOLDSTEIN, A. Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain. **Science**, v. 193, n. 4258, p. 1081-1086, 1976. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1976CC91600008 >.
85. GOLDSTEIN, P.; LESHEM, M. Dietary sodium, added salt, and serum sodium associations with growth and depression in the US general population. **Appetite**, v. 79, p. 83-90, Aug 1 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000337879900011 >.
86. GOSNELL, B. A.; PATEL, C. K. Centrally administered mu-opioid and delta-opioid agonists increase operant responding for saccharin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 4, p. 979-982, 1993.
87. GOTTLIEB, H. B. et al. 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**, v. 290, n. 5, p. R1251-R1261, 2006. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000236664400012 >.
88. GROB, M.; MOUGINOT, D. Heterogeneous chloride homeostasis and GABA responses in the median preoptic nucleus of the rat. **Journal of Physiology-London**, v. 569, n. 3, p. 885-901, 2005. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000233808300016 >.
89. GROB, M. et al. Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge. **Neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 247-257, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000186584400023 >.
90. GROB, M.; TROTTIER, J. F.; MOUGINOT, D. Heterogeneous co-localization of AT (1A) receptor and Fos protein in forebrain neuronal populations responding to acute hydromineral deficit. **Brain Research**, v. 996, n. 1, p. 81-88, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000187861500010 >.
91. GRONDIN, M. E. et al. Na⁺ appetite induced by depleting extracellular fluid volume activates the enkephalin/mu-opioid receptor system in the rat forebrain. **Neuroscience**, v. 192, p. 398-412, 2011. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000295555100038 >.
92. GUAN, J. L. et al. Reciprocal synaptic relationships between angiotensin II-containing neurons and enkephalinergic neurons in the rat area postrema. **Synapse**, v. 41, n. 2, p. 112-117, 2001. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000169303500003 >.
93. GUTMAN, M. B.; CIRIELLO, J.; MOGENSEN, G. J. Electrophysiological identification of forebrain connections of the subfornical organ. **Brain Research**, v. 382, n. 1, p. 119-128, 1986. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986E041900015 >.

94. HARRING, T. R.; DEAL, N. S.; KUO, D. C. Disorders of Sodium and Water Balance. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 379-401, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000336188400010 >.
95. HENRY, M.; DROLET, G.; MOUGINOT, D. Postsynaptic mu-opioid receptor response in the median preoptic nucleus is altered by a systemic sodium challenge in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1197-1209, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000254273400014 >.
96. HERKENHAM, M.; PERT, C. B. Light microscopic localization of brain opiate receptors - a general autoradiographic method which preserves tissue quality. **Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 8, p. 1129-1149, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PG78700012 >.
97. HINDMARCH, C. et al. Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat: regulation by fluid and food deprivation. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 6, p. R1914-R1920, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000261559700024 >.
98. HIYAMA, T. Y. et al. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na-x sodium channels for the control of salt-intake behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9276-9281, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000224587200012 >.
99. HOJO, M. et al. Mu-opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB(1) receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 3, p. 308-319, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000261353400010 >.
100. HOLZGRABE, U.; BRANDT, W. Mechanism of action of the diazabicyclononane-type kappa-agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1383-1389, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000182036100013 >.
101. HOUP, T. A. et al. c-fos-like immunoreactivity in the subfornical organ and nucleus of the solitary tract following salt intake by sodium-depleted rats. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 4, p. 505-510, 1998. ISSN 0031-9384. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000072331100007 >.
102. HUBBELL, C. L.; MCCUTCHEON, N. B. Opioidergic manipulations affect intake of 3-percent nacl in sodium-deficient rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 46, n. 2, p. 473-476, 1993. ISSN 0091-3057.
103. HWANG, B. H.; WU, J. Y.; SEVERS, W. B. Effects of chronic dehydration on angiotensin-II receptor-binding in the subfornical organ, paraventricular hypothalamic nucleus and adrenal-medulla of long-evans rats. **Neuroscience Letters**, v. 65, n. 1, p. 35-40, 1986. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986C040100007 >.

104. IMPROTA, G.; BROCCARDO, M. Spinal antinociceptive effects of D-ala2 deltorphin-II, a novel and highly selective delta-opioid receptor agonist. **Peptides**, v. 13, n. 6, p. 1123-1126, 1992. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992KF12400016 >.
105. INUI, T.; SHIMURA, T. Delta-opioid receptor blockade in the ventral pallidum increases perceived palatability and consumption of saccharin solution in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 269, p. 20-27, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000337866400004 >.
106. JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1388-1400, 2007.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000248581500023 >.
107. JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: Visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 292-353, 1997. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XJ89900002 >.
108. JOLKKONEN, E.; PITKANEN, A. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the central nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 395, n. 1, p. 53-72, 1998. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000073290400005 >.
109. JURZAK, M.; MULLER, A. R.; GERSTBERGER, R. AVP-fragment peptides induce Ca²⁺ transients in cells cultured from rat circumventricular organs. **Brain Research**, v. 673, n. 2, p. 349-355, Mar 6 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QK71400024 >.
110. KATSUURA, Y.; TAHA, S. A. Mu opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens shell blocks consumption of a preferred sucrose solution in an anticipatory contrast paradigm. **Neuroscience**, v. 261, p. 144-152, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000331095400014 >.
111. KELLEY, A. E. et al. Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. **Physiology & Behavior**. v. 76, n. 3, p. 365-377, 2002.
112. KELSEY, J. E. et al. Characterization of proopiomelanocortin messenger-RNA detected by *in situ* hybridization. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 38-42, 1986. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986A567600005 >.
113. KONKOY C.S.; DAVIS, T.P. Ectoenzymes as sites of peptide regulation. **Trends Pharmacol Sci**. v. 17, n. 8, p. 288-94, 1996.
114. KNOLL, A. T. et al. Kappa Opioid Receptor Signaling in the Basolateral Amygdala Regulates Conditioned Fear and Anxiety in Rats. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 425-433, 2011. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000293576800012 >.

115. KU, Y. H. Role of limbic peptidergic circuits in regulation of arterial pressure, relevant to development of essential hypertension. **Neuropeptides**, v. 40, n. 5, p. 299-308, 2006. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000242297700001 >.
116. KUMAR, V. et al. Arylacetamides as peripherally restricted kappa opioid receptor agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 22, p. 2567-2570, 2000. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000165250800018 >.
117. LANG, R. E. et al. Opioid-peptides and blood-pressure regulation. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 4, n. 1-2, p. 249-269, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982NG41300018 >.
118. LARSEN, P. J.; MIKKELSEN, J. D. Functional identification of central afferent-projections conveying information of acute stress to the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 2609-2627, 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QT91300003 >.
119. LAUBIE, M. et al. Central cardiovascular effects of morphinomimetic peptides in dogs. **European Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 1, p. 67-71, 1977.
120. LE MERRER, J. et al. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 4, p. 1379-1412, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000270304700008 >.
121. LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4-5, p. 727-738, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000184589000023 >.
122. LESHEM, M. The ontogeny of salt hunger in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 649-659, 1999. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000080891100003 >.
123. _____. Biobehavior of the human love of salt. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000261137200001 >.
124. LEVENTHAL, L.; BODNAR, R. J. Different central opioid receptor subtype antagonists modify maltose dextrin and deprivation-induced water intake in sham feeding and sham drinking rats. **Brain Research**, v. 741, n. 1-2, p. 300-308, 1996.
125. LEVENTHAL, L.; COLE, J. L.; BODNAR, R. J. Reductions in Locomotor Activity Following Central Opioid Receptor Subtype Antagonists in Rats. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 3, p. 833-836, 1996.
126. LEVENTHAL, L. et al. Selective actions of central mu-opioid and kappa-opioid antagonists upon sucrose intake in sham-fed rats. **Brain Research**, v. 685, n. 1-2, p. 205-210, 1995.

127. LI, X. P. et al. delta-Opioid receptor: The third extracellular loop determines naltrindole selectivity. **European Journal of Pharmacology**, v. 300, n. 1-2, p. R1-R2, 1996. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1996UG94900028 >.
128. LICHTENSTEIN, A. H. et al. Food-intake patterns assessed by using front-of-pack labeling program criteria associated with better diet quality and lower cardiometabolic risk(1-3). **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 3, p. 454-462, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000332143900007 >.
129. LIN, M.; LIU, S. J.; LIM, I. T. Disorders of water imbalance. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 749-770, 2005. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000230779600009 >.
130. LIND, R. W.; JOHNSON, A. K. Subfornical organ median preoptic connections and drinking and pressor-responses to angiotensin II. **Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 8, p. 1043-1051, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PG78700004 >.
131. LIND, R. W.; SWANSON, L. W.; GANTEN, D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. **Brain Research**, v. 321, n. 2, p. 209-215, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984TT48000002 >.
132. LIND, R. W.; VANHOESEN, G. W.; JOHNSON, A. K. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 210, n. 3, p. 265-277, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PK33100005 >.
133. LUCAS, L. R.; GRILLO, C. A.; MCEWEN, B. S. Involvement of mesolimbic structures in short-term sodium depletion: *in situ* hybridization and ligand-binding analyses. **Neuroendocrinology**, v. 77, n. 6, p. 406-415, 2003.
134. _____. Salt appetite in sodium-depleted or sodium-replete conditions: possible role of opioid receptors. **Neuroendocrinology**, v. 85, n. 3, p. 139-147, 2007.
135. LUNDY, R. F. et al. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 3, p. 449-458, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000182338100014 >.
136. LUNZER, M. M.; PORTOGHESE, P. S. Selectivity of delta and kappa-opioid ligands depends on the route of central administration in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 1, p. 166-171, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000247348100020 >.
137. LUZ, C. P. et al. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: Role of 5-HT3 and 5-HT2C receptors. **Brain Research**, v. 1139, p. 178-194, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000245114300019 >.

138. MALFROY B et al. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. **Nature**, v. 276, n. 5687, p. 523-526, 1978.
139. MANGIAPANE, M. L. et al. Role for the subfornical organ in vasopressin release. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 1, p. 43-47, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984TJ38600004 >.
140. MANSOUR, A. et al. Immunohistochemical localization of the cloned kappa1, receptor in the rat CNS and pituitary. **Neuroscience**, v. 71, n. 3, p. 671-690, 1996. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1996TZ36800006 >.
141. MANSOUR, A. et al. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 1, p. 22-29, 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QB15200010 >.
142. MANSOUR, A. et al. Mu-opioid, delta-opioid, and kappa-opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an *in situ* hybridization study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 350, n. 3, p. 412-438, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994QF84800006 >.
143. MANSOUR, A. et al. Autoradiographic differentiation of mu-opioid, delta-opioid, and kappa-opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. **Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 2445-2464, 1987. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987J514400018 >.
144. MARKI, A. et al. Tritiated kappa receptor antagonist norbinaltorphimine: synthesis and *in vitro* binding in three different tissues. **Life Sciences**, v. 66, n. 1, p. 43-49, 2000. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000084262500006 >.
145. MARTIN, W. R. et al. Effects of morphine-like and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 197, n. 3, p. 517-532, 1976. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1976BW03200005 >.
146. MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 257-332, 1998. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000073894200003 >.
147. MCEWEN, B. S. et al. Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 43, n. 1, p. 38-43, 1986. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986C370500007 >.
148. MCKINLEY, M. J. et al. Interaction of circulating hormones with the brain: the roles of the subfornical organ and the organum vasculosum of the lamina terminalis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, p. S61-S67, 1998. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000076687100012 >.

149. MCKINLEY, M. J. et al. Comparison of c-Fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. **Brain Research Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 131-137, 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QQ31500004 >.
150. MCKINLEY, M. J. et al. Physiological and pathophysiological influences on thirst. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 5, p. 795-803, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000222693000010 >.
151. MCKINLEY, M. J. et al. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 289-301, 1999. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000082252400001 >.
152. MCKINLEY, M. J. et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. **Adv Anat Embryol Cell Biol.** v. 172, p. 1-122, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000185380700001 >.
153. MCKINLEY, M. J. et al. Osmoregulatory fluid intake but not hypovolemic thirst is intact in mice lacking angiotensin. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1533-R1543, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000255501000016 >.
154. MCKINLEY, M. J.; HARDS, D. K.; OLDFIELD, B. J. Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. **Brain Research**, v. 653, n. 1-2, p. 305-314, 1994. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994PA03600042 >.
155. MELCHIORRI, P. et al. Structure-activity-relationships of the delta-opioid-selective agonists, deltorphins. **European Journal of Pharmacology**, v. 195, n. 2, p. 201-207, 1991. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991FG22900003 >.
156. MENDELSON, F. A. O. et al. Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 81, n. 5, p. 1575-1579, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984SJ69300063 >.
157. MENG, F. et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa-opioid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 21, p. 9954-9958, 1993. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1993MF29600044 >.
158. MIMÉE, A.; SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Circumventricular organs: targets for integration of circulating fluid and energy balance signals? **Physiology & Behavior**, v. 121, p. 96-102, 2013. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000327573400014 >.
159. MINER, P. et al. General, kappa, delta and mu opioid receptor antagonists mediate feeding elicited by the GABA-B agonist baclofen in the ventral tegmental area and nucleus accumbens shell in rats: reciprocal and regional

- interactions. **Brain Research**, v. 1443, p. 34-51, 2012. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000302425800004 >.
160. MISELIS, R. R. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. **Brain Research**, v. 230, n. 1-2, p. 1-23, 1981. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1981MW31800001 >.
161. _____. The subfornical organs neural connections and their role in water balance. **Peptides**, v. 3, n. 3, p. 501-502, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PA41100037 >.
162. MISELIS, R. R.; SHAPIRO, R. E.; HAND, P. J. Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. **Science**, v. 205, n. 4410, p. 1022-1025, 1979. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1979HJ27600028 >.
163. MOE, K. E. The ontogeny of salt preference in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 19, n. 3, p. 185-196, 1986. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986C101800003 >.
164. MOGIL, J. S.; PASTERNAK, G. W. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 381-415, 2001. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000171019000002 >.
165. MOOK, D. G. Oral and postingestional determinants of intake of various solutions in rats with esophageal fistulas. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 56, n. 4, p. 645-659, 1963. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19634520B00015 >.
166. MORIMOTO, S.; CASSELL, M. D.; SIGMUND, C. D. Neuron-specific expression of human angiotensinogen in brain causes increased salt appetite. **Physiological Genomics**, v. 9, n. 2, p. 113-120, 2002. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000175533000007 >.
167. MORITA, H. et al. Sequence of forebrain activation induced by intraventricular injection of hypertonic NaCl detected by Mn²⁺ contrasted T1-weighted MRI. **Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical**, v. 113, n. 1-2, p. 43-54, 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000223521300006 >.
168. MOSKOWITZ, A. S.; GOODMAN, R. R. Light microscopic autoradiographic localization of mu-opioid and delta-opioid binding-sites in the mouse central nervous-system. **Journal of Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 1331-1342, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984ST87900018 >.
169. MUELLER, W.; HALLERMANN, S.; SWANDULLA, D. Opioidergic modulation of voltage-activated K⁺ currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat. **Journal of Neurophysiology (Bethesda)**, v. 81, n. 4,

- p. 1617-1625, 1999. Disponível em: <Go to ISI>://BIOABS:BACD199900163891 >.
170. NA, E. S.; MORRIS, M. J.; JOHNSON, A. K. Opioid mechanisms that mediate the palatability of and appetite for salt in sodium replete and deficient states. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 2, p. 164-170, 2012. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000303181900013 >.
 171. NA, E. S. et al. The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. **Brain Research**, v. 1171, p. 104-110, 2007.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000250289100011 >.
 172. NASCIMENTO, A. I. R. et al. Blockade of central delta-opioid receptors inhibits salt appetite in sodium-depleted rats. **Peptides**, v. 55, p. 110-119, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000335503900016 >.
 173. NASCIMENTO, A. I. R. et al. Central kappa opioid receptors modulate salt appetite in rats. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 4, p. 506-514, 2012.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000305100300014 >.
 174. NAZARALI, A. J.; GUTKIND, J. S.; SAAVEDRA, J. M. Regulation of angiotensin-II binding-sites in the subfornical organ and other rat brain nuclei after water-deprivation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 7, n. 4, p. 447-455, 1987. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987M955000011 >.
 175. NEHME, B. et al. The expression pattern of the Na⁺ sensor, Na(X) in the hydromineral homeostatic network: a comparative study between the rat and mouse. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 6, p. 26, 2012. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000306606700001 >.
 176. NERBASS, F. B. et al. Demographic associations of high estimated sodium intake and frequency of consumption of high-sodium foods in people with chronic kidney disease stage 3 in england. **Journal of Renal Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 236-242, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000338422500006 >.
 177. NITABACH, M. N.; SCHULKIN, J.; EPSTEIN, A. N. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 35, n. 2, p. 127-134, 1989Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989AZ31200005 >.
 178. NODA, M. Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 3, p. 513-522, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000245674500006 >.
 179. NODA, M.; HIYAMA, T. Y. Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. **Chemical Senses**, v. 30, p. I44-I45, 2005.

180. NONAKA, A. et al. Synaptic Plasticity Associated with a Memory Engram in the Basolateral Amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 28, p. 9305-9309, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000339156000014 >.
181. OGIHARA, C. A. et al. Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 6, p. 561-566, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000266135800002 >.
182. OLDFIELD, B. J.; HARDS, D. K.; MCKINLEY, M. J. Neurons in the median preoptic nucleus of the rat with collateral branches to the subfornical organ and supraoptic nucleus. **Brain Research**, v. 586, n. 1, p. 86-90, 1992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JH13100013 >.
183. OSTROWSKI, N. L. et al. Morphine antagonists and consummatory behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 14, n. 4, p. 549-559, 1981. ISSN 0091-3057.
184. PAN, L. et al. Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm. **Neuroscience**, v. 133, n. 1, p. 209-220, 2005. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000229421400018 >.
185. PASTERNAK, G. W. Molecular insights into mu opioid pharmacology from the clinic to the bench. **Clinical Journal of Pain**, v. 26, n. 1, p. S3-S9, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000273117800002 >.
186. PASTERNAK, G. W.; CARROLLBUATTI, M.; SPIEGEL, K. The binding and analgesic properties of a sigma opiate, SKF-10,047. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 219, n. 1, p. 192-198, 1981. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1981MN49800029 >.
187. PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain: in stereotaxic coordinates**. 4rd ed. California: Academic Press, 1998.
188. PENCEA, V. et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6706-6717, 2001. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000170690900029 >.
189. PEREIRA-DERDERIAN, D. T. B. et al. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 5, p. R1298-R1309, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000277051700017 >.

190. PERT, C. B.; SNYDER, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous-tissue. **Science**, v. 179, n. 4077, p. 1011-1014, 1973a. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1973O891100029 >.
191. _____. Properties of opiate-receptor binding in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2243-2247, 1973b. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1973Q468600013 >.
192. PESSOA, L. Emotion and cognition and the amygdala: From "what is it?" to "what's to be done?" **Neuropsychologia**, v. 49, n. 4, p. 681-694, 2011. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000289761600013 >.
193. PLUNKETT, L. M. et al. Localization of angiotensin II receptors along the anteroventral third ventricle area of the rat-brain. **Brain Research**, v. 405, n. 2, p. 205-212, 1987. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987G444800001 >.
194. PORTOGHESE, P. S. et al. Binaltorphimine-related bivalent ligands and their kappa-opioid receptor antagonist selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 836-841, 1988. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988M716200026 >.
195. PORTOGHESE, P. S.; SULTANA, M.; TAKEMORI, A. E. Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 185-186, 1988. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988L911600023 >.
196. _____. Design of peptidomimetic delta-opioid receptor antagonists using the message-address concept. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1714-1720, 1990a. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1990DF28900028 >.
197. _____. Naltrindole 5'-isothiocyanate: a nonequilibrium, highly selective delta-opioid receptor antagonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1547-1548, 1990b. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1990DF28900004 >.
198. PULMAN, K. J. et al. The subfornical organ: A central target for circulating feeding signals. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 2022-2030, 2006.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000235341400018 >.
199. QUIRION, R. et al. Atrial natriuretic factor (ANF) binding-sites in brain and related structures. **Peptides**, v. 5, n. 6, p. 1167-1172, 1984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1984ABV9400019 >.
200. ROITMAN, M. F.; BERNSTEIN, I. L. Amiloride-sensitive sodium signals and salt appetite: multiple gustatory pathways. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 6, p. R1732-R1738, 1999. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000080695000024 >.

201. ROSENBAUM, J. S. et al. Discrimination of three types of opioid binding-sites in rat brain *in vivo*. **Molecular Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 242-248, 1984.
202. ROWLAND, N. E.; GOLDSTEIN, B. E.; ROBERTSON, K. L. Role of angiotensin in body fluid homeostasis of mice: fluid intake, plasma hormones, and brain Fos. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 6, p. R1586-R1594, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000182700000032 >.
203. RUEGG, H.; YU, W. Z.; BODNAR, R. J. Opioid-receptor subtype agonist-induced enhancements of sucrose intake are dependent upon sucrose concentration. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 1, p. 121-128, 1997.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XL19600017 >.
204. SAH, P. et al. The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 803-834, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000183941300004 >.
205. SAKAI, R. R. et al. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendocrinology**, v. 64, n. 6, p. 425-429, 1996. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1996VY85500004 >.
206. SAPER, C. B.; LEVISOHN, D. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. **Brain Research**, v. 288, n. 1-2, p. 21-31, 1983. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1983RW35700003 >.
207. SCHULKIN, J.; MARINI, J.; EPSTEIN, A. N. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 179-185, 1989. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989T178400023 >.
208. SCHULZ, R.; WUSTER, M.; HERZ, A. Pharmacological characterization of the epsilon-opiate receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 216, n. 3, p. 604-606, 1981. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1981LH78400028 >.
209. SHARIF-NAEINI, R. et al. Contribution of TRPV channels to osmosensory transduction, thirst, and vasopressin release. **Kidney International**, v. 73, n. 7, p. 811-815, 2008. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000254085100007 >.
210. SHIMIZU, H. et al. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. **Neuroscience Research**, v. 58, p. S79-S79, 2007 Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000249272800458 >.

211. SHOOK, J. E. et al. Opioid receptor selectivity of beta-endorphin *in vitro* and *in vivo*: mu-receptors, delta-receptors and epsilon-receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, n. 3, p. 1018-1025, 1988. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988Q186700032 >.
212. SIMONIN, F. et al. Kappa-opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central-nervous-system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 15, p. 7006-7010, 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995RJ89200071 >.
213. SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG. A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. **Science**, v. 181, n. 4105, p. 1172-1175, 1973. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1973Q630400019 >.
214. _____. Subfornical organ lesions reduce intravenous angiotensin-induced drinking. **Brain Research**, v. 88, n. 1, p. 154-161, 1975.. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1975W226400024 >.
215. _____. Subfornical organ: dipsogenic site of action of angiotensin-II. **Science**, v. 201, n. 4353, p. 379-380, 1978. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1978FG64900039 >.
216. Skidgel RA, Erdös EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. **Peptides**, v. 25, p. 521-525, 2004.
217. SMITH, C. A. et al. Presystemic influences on thirst, salt appetite, and vasopressin secretion in the hypovolemic rat. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 5, p. R2089-R2099, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000247725200039 >.
218. SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Circulating signals as critical regulators of autonomic state-central roles for the subfornical organ. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 2, p. R405-R415, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000280569800003 >.
219. SNYDER, S. H. Brain peptides as neurotransmitters. **Science**, v. 209, n. 4460, p. 976-983, 1980. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1980KD94000009 >.
220. SOUKARA, S. et al. Methylated analogues of methyl(R)-4-(3,4-dichlorophenylacetyl)-3-(pyrrolidin-1-ylmethyl)piperazine-1-carboxylate (GR-89,696) as highly potent kappa-receptor agonists: stereoselective synthesis, opioid-receptor affinity, receptor selectivity, and functional studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 17, p. 2814-2826, 2001. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000170505600016 >.

221. STARR, L. J.; ROWLAND, N. E. Characteristics of salt appetite in chronically sodium-depleted rats using a progressive ratio schedule of procurement. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 4-5, p. 433-442, 2006. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000239857100018 >.
222. STRICKER, E. M.; GRIGSON, P. S.; NORNGREN, R. Variable effects of parabrachial nucleus lesions on salt appetite in rats depending upon experimental paradigm and saline concentration. **Behavioral Neuroscience**, v. 127, n. 2, p. 275-284, 2013. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000317128600014 >.
223. SU, T. P. Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H] SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 223, n. 2, p. 284-290, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PQ06900003 >.
224. SWANSON, L. W.; LIND, R. W. Neural projections subserving the initiation of a specific motivated behavior in the rat: new projections from the subfornical organ. **Brain Research**, v. 379, n. 2, p. 399-403, 1986. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986D459100028 >.
225. TAKEMORI, A. E. et al. Nor-binaltorphimine, a highly selective kappa-opioid antagonist in analgesic and receptor-binding assays. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, n. 1, p. 255-258, 1988.
226. TANAKA, J.; HORI, K.; NOMURA, M. Dipsogenic response induced by angiotensinergic pathways from the lateral hypothalamic area to the subfornical organ in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 118, n. 2, p. 111-116, 2001. ISSN 0166-4328. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166456400001 >.
227. THORNTON, S. N.; NICOLAIDIS, S. Long-term mineralocorticoid-induced changes in rat neuron properties plus interaction of aldosterone and Ang-II. **American Journal of Physiology**, v. 266, n. 2, p. R564-R571, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994NA80300091 >.
228. THORNTON, S. N.; OMOUESSI, S. T.; FALCONETTI, C. Mineralocorticoid modulation of central angiotensin-induced neuronal activity, water intake and sodium appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 699-705, 2007. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000246576900014 >.
229. THRASHER, T. N.; KEIL, L. C. Regulation of drinking and vasopressin secretion: role of organum vasculosum laminae terminalis. **American Journal of Physiology**, v. 253, n. 1, p. R108-R120, 1987. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987J254100042 >.
230. THUNHORST, R. L. et al. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **American Journal of Physiology-Regulatory**

- Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 6, p. R1807-R1814, 1998. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000073907700036 >.
231. TRESKOT, A. M. et al. Opioid Pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, n. 2, p. S133-S153, 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000208132900007 >.
232. TRUITT, W. A. et al. Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. **Neuroscience**, v. 160, n. 2, p. 284-294, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000265426700004 >.
233. UFNAL, M.; SKRZYPECKI, J. Blood borne hormones in a cross-talk between peripheral and brain mechanisms regulating blood pressure, the role of circumventricular organs. **Neuropeptides**, v. 48, n. 2, p. 65-73, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000335426500002 >.
234. VACCARINO, A. L.; KASTIN, A. J. Endogenous opiates: 2000. **Peptides**, v. 22, n. 12, p. 2257-2328, 2001. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000173304800034 >.
235. VANHOUTEN, M. et al. Autoradiographic localization of specific binding sites for blood-borne angiotensin II in the rat brain. **Brain Research**, v. 186, n. 2, p. 480-485, 1980. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1980JJ09000022 >.
236. VENDRAMINI, R. C. et al. Damage to the central amygdala produces differential encephalic c-fos expression in the water deprivation-partial rehydration protocol. **Brain Research**, v. 1304, p. 80-89, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000272654400008 >.
237. VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 471-503, 2003. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000187001000002 >.
238. VUONG, C. et al. The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 1, p. 98-132, 2010. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000274335000005 >.
239. WALWYN, W. et al. Delta receptors are required for full inhibitory coupling of mu receptors to voltage-dependent Ca²⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 134-143, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000267902900014 >.
240. WATANABE, E. et al. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7743-7751, 2000. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000089753300034 >.

241. WATANABE, E. et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Na(x) is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 3, p. R568-R576, 2006.
242. WATANABE, E. et al. A comparison of voluntary salt-intake behavior in Nax-gene deficient and wild-type mice with reference to peripheral taste inputs. **Brain Research**, v. 967, n. 1-2, p. 247-256, 2003.
243. WATSON, S. J. et al. Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. **Science**, v. 218, n. 4577, p. 1134-1136, 1982. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PS36600030 >.
244. WHITE, D. A. et al. Acute delta and kappa-opioid agonist pretreatment potentiates opioid antagonist induced suppression of water consumption. **Brain Research Bulletin**, v. 76, n. 6, p. 597-604, 2008. ISSN 0361-9230.
245. WILKIN, L. D. et al. The supraoptic nucleus: afferents from areas involved in control of body fluid homeostasis. **Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 573-584, 1989. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989T723200006 >.
246. WILSON, W. L. et al. Roles of brain angiotensins II and III in thirst and sodium appetite. **Brain Research**, v. 1060, n. 1-2, p. 108-117, 2005. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000233068100012 >.
247. YAN, J. B. et al. Natriorexigenic effect of damgo is decreased by blocking AT1 receptors in the central nucleus of the amygdala. **Neuroscience**, v. 262, p. 9-20, 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000331647900002 >.
248. YU, W. Z.; BODNAR, R. J. Interactions between angiotensin II and delta opioid receptor subtype agonists upon water intake in rats. **Peptides**, v. 18, n. 2, p. 241-245, 1997. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997WX95400010 >.
249. ZARDETTO-SMITH, A. M.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Research**, v. 645, n. 1-2, p. 123-134, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994NK54000015 >.
250. ZHANG, D. M.; EPSTEIN, A. N.; SCHULKIN, J. Medial region of the amygdala - involvement in adrenal steroid-induced salt appetite. **Brain Research**, v. 600, n. 1, p. 20-26, 1993. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1993KG54000003 >.
251. ZHANG, M.; KELLEY, A. E. Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 4, p. 415-423, 2002.

252. ZHU, J. M. et al. Cloning of a human kappa-opioid receptor from the brain. **Life Sciences**, v. 56, n. 9, p. PL201-PL207, 1995. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995QD40900010 >

APÊNDICE



Blockade of central delta-opioid receptors inhibits salt appetite in sodium-depleted rats



A.I.R. Nascimento^{a,c}, H.S. Ferreira^b, D.R. Cerqueira^c, J.B. Fregoneze^{c,*}

^a Department of Biological Sciences, State University of Southwest Bahia, 45200-000 Jequié, Bahia, Brazil

^b Life Sciences Department, Bahia State University, 41195-001 Salvador, Bahia, Brazil

^c Department of Physiology, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, 40110-100 Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2013

Received in revised form 20 February 2014

Accepted 20 February 2014

Available online 3 March 2014

Keywords:

Salt intake

Delta-opioid receptors

Angiotensin II

Sodium-depletion

ABSTRACT

Various studies have investigated the role of central opioid peptides in feeding behavior; however, only a few have addressed the participation of opioids in the control of salt appetite. The present study investigated the effect of intracerebroventricular injections of the δ -opioid antagonist, naltrindole (5, 10 and 20 nmol/rat) and the agonist, deltorphin II (2.5, 5, 10 and 20 nmol/rat) on salt intake. Two protocols for inducing salt intake were used: sodium-depletion and the central injection of angiotensin II. In addition, the effect of a central δ -opioid receptor blockade on locomotor activity, on palatable solution intake (0.1% saccharin) and on blood pressure was also studied. The blockade of central δ -opioid receptors inhibits salt intake in sodium-depleted rats, while the pharmacological stimulation of these receptors increases salt intake in sodium-replete animals. Furthermore, the blockade of central δ -opioid receptors inhibits salt intake induced by central angiotensinergic stimulation. These data suggest that during sodium-depletion activation of the δ -opioid receptors regulates salt appetite to correct the sodium imbalance and it is possible that an interaction between opioidergic and angiotensinergic brain system participates in this control. Under normonatremic conditions, δ -opioid receptors may be necessary to modulate sodium intake, a response that could be mediated by angiotensin II. The decrease in salt intake following central δ -opioid receptors blockade does not appear to be due to a general inhibition of locomotor activity, changes in palatability or in blood pressure.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The endogenous opioid system is widely distributed throughout the brain and has been shown to be involved in multiple functions including antinociception, mood, feeding and drinking behavior, cardiovascular control and endocrine regulation [8]. Opioid peptides are classified into four well-defined pharmacological families: endorphins, enkephalins, dynorphins and nociceptin/orphanin FQ that act through G-protein-coupled receptors referred to as μ , δ , κ and nociceptin/orphanin FQ receptor [8,68,69]. Of these opioid receptors, δ -opioid receptors are particularly interesting as an alternative to μ -opioid drugs for the clinical treatment of chronic pain [5,10,73]. In the near future, drugs targeted at δ -opioid

receptors may also be used as therapeutic tools in addictive and impulsive disorders, as well as in anxiety and depression [58].

Different studies have demonstrated the participation of the brain opioid system in the regulation of feeding behavior through a mechanism that may involve modulation of the reward-related responses and the palatability of different substances [9,42,44,66]. Indeed, morphine and opioid agonists induce a preference for fat and sweet food/solutions [9,26]. Few studies have addressed the role of opioid peptides in salt intake. The antagonist opioid, naloxone, administered both systemically and into the central nervous system, reduces the intake of hypertonic, hypotonic and isotonic saline solutions, which are preferred over water by fluid-deprived rats [15,25,27,28]. On the contrary, intracerebroventricular injections of selective δ -, μ - and κ -opioid agonists increase saline intake in non-deprived rats [27,28]. Previous data from our laboratory have shown that κ -opioid receptors may regulate salt appetite, since intracerebroventricular injections of nor-binaltorphimine (Nor-BNI), a κ -opioid receptor antagonist, inhibit salt intake in sodium-depleted rats [55]. In addition, δ -opioid receptors also appear to be involved in the control of ingestive behavior related

* Corresponding author at: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biorregulação, Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, 40110-100 Salvador, Bahia, Brazil. Tel.: +55 07188816353; fax: +55 07132357518.

E-mail address: josmara@ufba.br (J.B. Fregoneze).

to palatable substances. Deltorphin II, a δ -opioid receptor agonist, injected intracerebroventricularly, has been shown to increase sucrose solution intake [60], while the antagonist, naltrindole, had no effect on sucrose solution intake [3]. In a study using the two-bottle choice test approach (water and saline solution 0.6% and 1.7%) in fluid-deprived rats, central administration of μ - and κ -antagonists, but not δ -antagonists, decreases water intake. In addition, all the antagonists used in that study were able to alter saline solution intake [7]. On the other hand, salt intake in sodium-depleted rats is decreased by subcutaneous injection of naltrindole, a δ -opioid antagonist [45]. However, in that study, a single dose of naltrindole was used and this was the only approach used to study salt appetite. In order to clarify the role of δ -opioid receptors in the control of salt appetite, the present study was designed to investigate the effect of intracerebroventricular injections of different doses of a δ -opioid agonist and antagonist using two different approaches. These approaches have been largely used in the literature to study salt intake: (1) sodium deficiency produced by a single administration of the diuretic furosemide; and (2) intracerebroventricular injection of angiotensin II in rats with normal sodium balance. In addition, the effect of central δ -opioid receptor blockade on locomotor activity, on palatable solution intake (0.1% saccharin) and on blood pressure was also investigated. The hypothesis is that central δ -opioid receptors participate in modulating salt intake during homeostatic challenges and may be important for the correction of sodium imbalance.

2. Methods

2.1. Animals

The present study used adult male Wistar rats weighing 250–280 g. The animals were kept under controlled light (lights on from 5 AM to 7 PM) and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) conditions with free access to tap water and laboratory chow (Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, Brazil). Groups of rats used in one experimental set were not reused in any other part of the study. All experiments were conducted between 7 AM and 11 AM. The experimental protocols were performed in accordance with the regulations for the care of laboratory animals and were approved by the Institution's Animal Ethics Committee (CEUA-ICS-UFBA # 024/2012).

2.2. Surgical procedures

The animals were anesthetized with ketamine/xylazine (80/7 mg/kg i.p.) to allow the guide cannula (22-gauge) to be inserted into the lateral ventricle (LV) in accordance with the following coordinates: anteroposterior = 0.9 mm behind the bregma; lateral = 1.5 mm; vertical = 4.0 mm below the skull. The guide cannula was fixed to the skull with metal screws and dental cement and an obturator was provided to avoid obstruction. After surgery, the animals were housed in individual cages and had free access to laboratory chow, distilled water and 1.5% saline solution. The animals were handled every day to minimize the stress of the experimental procedure. The position of the guide cannula in the LV and the intracerebroventricular injection site were confirmed at the end of the experiment with the use of Evans Blue dye injected through the cannula. The brains were removed, placed in formalin, and later frozen and cut into 40 μm sections. The slices were stained with cresyl violet and analyzed using light microscopy. Only data from the animals in which the tip of the cannula was restricted to the cerebroventricular space and the Evans Blue dye could not be seen in the brain tissue surrounding the ventricle were included in the study.

2.3. Drugs and microinjections

The drugs used were naltrindole (NTI), an opioid antagonist selective to δ -opioid receptors [57]; deltorphin II (Delt-II), an opioid agonist with high selectivity and affinity to δ -opioid receptors [20,38]; and angiotensin II (AII). Both NTI and Delt-II were acquired from Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA, while AII was purchased from Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA. The doses of the drugs used in this study were compatible with previous reports: 5, 10 and 20 nmol/rat of naltrindole [7], while the doses of deltorphin II were 2.5, 5, 10 and 20 nmol/rat [72] and 10 ng/rat of AII [21]. Central injections were given using a Hamilton microsyringe connected to a 30-gauge injector through polyethylene tubing (PE10). A total volume of 2 μl was slowly injected (60 s). Furosemide, a loop diuretic, was purchased from Sanofi-Aventis Ltd., São Paulo, Brazil.

2.4. Sodium depletion (Experiments 1, 2 and 3)

Sodium depletion was achieved by means of a subcutaneous injection of furosemide (20 mg/kg). After the injections, the rats had free access to distilled water, while the standard rat chow was replaced by a low sodium diet (0.001% Na^+ and 0.33% K^+). In *Experiment 1*, the participation of central δ -opioid receptors in the regulation of salt appetite was tested in different groups of sodium-depleted animals receiving LV injections of NTI at different doses (5, 10 and 20 nmol) or saline. In *Experiment 2*, sodium-depleted animals received an LV injection of 20 nmol of NTI plus Delt-II at the doses of 2.5, 5, 10 and 20 nmol, or saline, to confirm the specificity of NTI. In both experimental sets, sodium-depleted control animals received LV injections of isotonic saline solution. In *Experiment 3*, the aim was to test the effect of pharmacological stimulation of the central δ -opioid receptors on salt appetite. Sodium depleted rats and normonatremic animals (not submitted to sodium-depletion) received an LV injection of 20 nmol of Delt-II or saline. In all three experimental sets, bottles containing hypertonic saline solution (1.5%) and distilled water were reintroduced into the cages 15 min after the central injections. Fluid intake measurement began 5 min later and continued for the next 120 min. To confirm the efficacy of sodium depletion, an additional control group was included. In this group, the animals received subcutaneous injections of isotonic saline solution instead of furosemide and LV injections of isotonic saline solution. As expected, salt intake was significantly higher in the sodium depleted (furosemide treated) rats compared to the normonatremic (saline treated) rats, as shown in [Table 1](#).

2.5. Central angiotensinergic stimulation (Experiment 4)

In this experimental group, the objective was to study the role of δ -opioid receptors in the salt appetite induced by the pharmacological stimulation of central angiotensinergic pathways. Different groups of normonatremic rats received LV injections of NTI at different doses (5, 10 and 20 nmol) 15 min before receiving AII (10 ng/rat). Bottles containing 1.5% saline solution and distilled water were replenished and made available immediately after the LV injections of AII. As in the previous experimental sets, the measurement of fluid intake began 5 min after reintroduction of the bottles into the cages and continued for the next 120 min.

2.6. Open field test (Experiment 5A)

The aim of this experimental set was to exclude the possibility that the δ -opioid receptor antagonist could have induced a locomotor alteration that would explain the inhibition of salt intake observed in experiments 1 and 3. Different groups of sodium-depleted rats receiving LV injections of NTI (20 nmol) or saline solution were submitted to an open field test. In this test, the

Table 1
Effect of sodium depletion induced by furosemide treatment and low sodium diet on salt and water intake.

Fluid intake	Water intake (ml/100 g b.w.)		Salt intake (ml/100 g b.w.)	
	NN (n = 12)	SD (n = 11)	NN (n = 12)	SD (n = 11)
Time (min)				
5	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.80 ± 0.20 [*]
10	0.10 ± 0.01	0.26 ± 0.24	0.06 ± 0.01	1.97 ± 0.45 [*]
15	0.10 ± 0.01	0.34 ± 0.32	0.06 ± 0.01	3.19 ± 0.45 [*]
30	0.10 ± 0.01	0.39 ± 0.32	0.06 ± 0.01	4.99 ± 0.33 [*]
45	0.10 ± 0.01	0.41 ± 0.34	0.06 ± 0.01	5.60 ± 0.45 [*]
60	0.20 ± 0.14	0.41 ± 0.34	0.06 ± 0.01	6.53 ± 0.43 [*]
90	0.33 ± 0.18	0.81 ± 0.45	0.06 ± 0.01	6.95 ± 0.27 [*]
120	0.78 ± 0.45	2.08 ± 0.73 [*]	0.06 ± 0.01	7.25 ± 0.29
Fluid intake	Water intake (ml/100 g b.w.)		Salt intake (ml/100 g b.w.)	
Mixed model ANOVA	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p
Interaction (time × treatment)	F(7,154)=4.117	=0.0004	F(7,154)=50.14	<0.0001
Time	F(7,154)=7.375	<0.0001	F(7,154)=57.07	<0.0001
Treatment	F(1,22)=4.135	=0.0542	F(1,22)=238.2	<0.0001

Data presents as mean ± SEM. The data were analyzed by a mixed-model analysis of variance (ANOVA) with one repeated measures factor (eight levels of time) and one group factor (treatment: NN × SD) not repeated. SD = sodium depleted; NN = normonatremic.

^{*} Significant difference when the fluid intake by SD rats is compared to NN rats (Bonferroni's post-test).

animals were placed in a circular acrylic box (60 cm in diameter and 60 cm high) with an open top 30 min after an injection of NTI or saline solution into the LV. The floor was divided into eight areas of equal size with a circle at the center (42.43 cm). Hand-operated counters and stopwatches were used to score locomotion over a 10-min period by measuring the number of areas into which the rats entered with all four paws. The behavioral experiments took place in a sound-attenuated, temperature-controlled (24 ± 1 °C) room between 7 AM and 11 AM. A white-noise generator provided constant background noise and the apparatus was cleaned with 70% ethanol and dried before each session to minimize olfactory cues.

2.7. Dessert test (Experiment 5B)

The dessert test, a well-established model of hedonic behavior in rats, was performed to exclude the possibility of a non-specific, general inhibition of the central nervous system induced by the δ -opioid receptor antagonist observed in experiments 1 and 3 [19,33]. In this experiment, after LV cannulation, the animals were kept in the usual individual cages during the training period with free access only to tap water and were transferred to a different cage (the "test cage") for 2 h each day for seven consecutive days. In the test cage, the animals had access to two bottles: one containing water and the other containing a 0.1% saccharin solution. After this training period, the animals were divided into two groups and deprived of fluid for 24 h. Afterwards, the animals received LV injections of NTI (20 nmol) or saline (controls) 15 min before being transferred to the test cage. Intake of the water and the 0.1% saccharin solution was recorded over a 120-min period.

2.8. Blood pressure recording (Experiment 6)

In this experimental group, the objective was to exclude the possibility that the inhibitory effect of the δ -opioid receptor antagonist on salt appetite could be due to changes in blood pressure. One day before the experimental sessions, a catheter (PE50) filled with heparin solution (1000 U/ml) was inserted into the left carotid artery under ketamine/xylazine (80/7 mg/kg i.p.) anesthesia, and exteriorized at the nape of the animal's neck to permit blood pressure recording. At the experimental session, the carotid catheter was connected to a pressure transducer whose signal was amplified

and digitally recorded by an analog-to-digital interface (AqDados, version 5, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, Brazil) and recorded (1 kHz) on a microcomputer for posterior analysis. Distinct groups of sodium-depleted animals received an LV injection of NTI (20 nmol) or saline solution (controls) 20 min after baseline blood pressure was recorded. In each of these groups, blood pressure continued to be recorded for the next 120 min after NTI or saline solution was injected. The experimental protocol used in this case was identical to that used to study salt intake in the previous groups. Mean arterial pressure (MAP) was calculated from systolic and diastolic pressure measurements using the AcqKnowledge software program, version 3.5.7, developed by Biopac Systems, Inc., California, USA. The MAP values at the end of the stabilization period were used as references to calculate the delta values that are presented here.

2.9. Statistical analysis

The data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (GPAD, version 6.03, San Diego, USA). The amount of water and sodium chloride solution consumed was analyzed separately using a mixed-model analysis of variance (ANOVA) with time as the within-subjects repeated measure (eight levels of time) and drug treatment as the between-subjects variables (not repeated). The Bonferroni post hoc test was used to compare the effects of the drugs during each measurement period. The data from the open field and dessert tests were analyzed using Student's *t*-test. The delta values of MAP were analyzed using two-way repeated-measures ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Differences between the groups were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1 – effect of central δ -opioid receptor blockade on salt appetite in sodium-depleted rats

Cumulative salt intake in sodium-depleted rats after LV injections of NTI at the doses of 5 ($n = 10$), 10 ($n = 10$) and 20 nmol ($n = 10$) is shown in Fig. 1 (Panel A). As expected, salt intake was

Table 2
Statistic summary of mixed model ANOVA.

Experiments	Interaction (time × drug)		Time		Drug	
	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p
Experiment 1						
Salt intake	F(21,259) = 7.323	<0.0001	F(7,259) = 116.0	<0.0001	F(3,37) = 18.73	<0.0001
Water intake	F(21,259) = 1.141	=0.3057	F(7,259) = 12.12	<0.0001	F(3,37) = 1.509	=0.2282
Experiment 2						
Salt intake	F(35,413) = 5.863	<0.0001	F(7,413) = 137.0	<0.0001	F(5,59) = 7.983	<0.0001
Water intake	F(35,413) = 0.578	=0.9754	F(7,413) = 15.06	<0.0001	F(5,59) = 0.099	=0.9918
Experiment 3						
SD: salt intake	F(7,126) = 0.822	=0.5707	F(7,126) = 109.9	<0.0001	F(1,18) = 0.448	=0.5115
SD: water intake	F(7,126) = 0.653	=0.7110	F(7,126) = 8.768	<0.0001	F(1,18) = 0.635	=0.4357
NN: salt intake	F(7,126) = 8.281	<0.0001	F(7,126) = 10.83	<0.0001	F(1,18) = 14.58	=0.0013
NN: water intake	F(7,126) = 4.044	=0.0005	F(7,126) = 6.209	<0.0001	F(1,18) = 4.027	=0.0601
Experiment 4						
Salt intake	F(21,203) = 3.146	<0.0001	F(7,203) = 89.87	<0.0001	F(3,29) = 21.19	<0.0001
Water intake	F(21,203) = 1.214	<0.0001	F(7,203) = 123.2	<0.0001	F(3,29) = 2.252	=0.1034

The amount of water and sodium chloride solution consumed was analyzed separately using a mixed-model analysis of variance (ANOVA) with one repeated measures factor (eight levels of time) and one group factor (drugs) not repeated. The post hoc test used to compare the effect of the drugs at each measurement time period was Bonferroni and is shown in Fig. 1–3. SD = sodium depleted; NN = normonatremic.

high in the sodium-depleted rats receiving LV injections of isotonic saline ($n = 11$). The LV injection of NTI induced a dose-dependent inhibition of salt intake in sodium-depleted rats. NTI injections at the doses of 10 and 20 nmol promoted an inhibitory effect that began after the initial 15 min of the measurement period and lasted until the end of the experiment. At the lowest dose (5 nmol), the inhibitory effect was significant only at 120 min of the measurement period. Furthermore, in the sodium-depleted rats receiving LV injections of 5 nmol of NTI, salt intake was significantly different from that of the animals treated with NTI at the doses of 10 and 20 nmol after the first 30 min of the measurement period. Fig. 1 (Panel B) shows the effect of LV injections of NTI at the doses of 5, 10 and 20 nmol on water intake in sodium-depleted rats. As expected, water intake was negligible in sodium-depleted rats and remained unaltered by any of the treatments. The results of the mixed model ANOVA applied to the data on salt and water intake in this experimental set are shown in Table 2.

3.2. Experiment 2 – effect of the δ -opioid receptor agonist, deltorphin II, on the inhibitory action of naltrindole on salt appetite in sodium-depleted animals

The effect of different doses of Delt-II (2.5, 5, 10 and 20 nmol) on the NTI-induced inhibition of salt intake (20 nmol, $n = 12$) in sodium-depleted rats is shown in Fig. 2 (Panel A). As in the previous experiment, at the dose of 20 nmol NTI exerted a significant inhibitory effect on salt intake throughout the entire measurement period compared to sodium-depleted rats receiving LV isotonic saline injections. At the lowest dose, 2.5 nmol ($n = 12$), Delt-II failed to significantly alter the inhibitory effect of NTI on salt intake. However, at the doses of 5 ($n = 13$) and 10 nmol ($n = 6$), the inhibition of salt appetite induced by NTI began to be attenuated at 45 min of the measurement period, and at the dose of 20 nmol ($n = 12$) this effect was already seen at 30 min of the measurement period. Fig. 2 (Panel B) shows the effect of LV injections of the δ -opioid receptor antagonist (NTI 20 nmol) plus the agonist (Delt-II 2.5, 5, 10 and 20 nmol) on water intake in sodium-depleted rats. As expected, water intake was very low in sodium-depleted rats and remained unaltered by any of the treatments. The results of the mixed model ANOVA applied to the data on salt and water intake in this experimental set are shown in Table 2.

3.3. Experiment 3 – effect of pharmacological stimulation of the central δ -opioid receptors on salt appetite

The effect of LV injections of Delt-II at the dose of 20 nmol or saline on salt intake in sodium-depleted animals and in normonatremic rats (not submitted to sodium-depletion) is shown in Fig. 3. In sodium-depleted animals, Delt-II had no effect on the high salt intake when compared to saline-treated, sodium-depleted rats (Panel A). Furthermore, water intake remained unchanged in sodium-depleted rats treated with Delt-II (Panel B). On the other hand, in normonatremic rats, Delt-II (20 nmol) significantly increased salt intake compared to the controls, saline-treated normonatremic rats, after the first 60 min of the measurement period (Panel C). In addition, LV injections of Delt-II (20 nmol) increased the water intake in normonatremic rats after 90 min of the measurement period (Panel D). The results of the mixed model ANOVA applied to the data on salt and water intake in this experimental set are shown in Table 2.

3.4. Experiment 4 – effect of δ -opioid receptor antagonist, naltrindole, on salt and water intake induced by central angiotensinergic stimulation

The effect of LV injections of NTI at the doses of 5 (NTI-5 + AII; $n = 10$), 10 (NTI-10 + AII; $n = 7$) and 20 nmol (NTI-20 + AII; $n = 8$) on cumulative salt intake induced by 10 ng of AII is shown in Fig. 4, Panel A. As expected, salt intake was significantly higher in the saline + AII group. LV injections of NTI at the doses of 10 and 20 nmol (NTI-10 + AII and NTI-20 + AII) inhibited the salt intake induced by AII after the initial 15 min of the measurement period and lasted until the end of the experiment. The salt intake observed in the NTI-5 + AII group was similar to that of the saline + AII group. Fig. 4, Panel B, shows the effect of LV injections of NTI at the doses of 5, 10 and 20 nmol on cumulative water intake induced by 10 ng of AII. As expected, water intake was high in the saline + AII group. In the groups treated with LV injections of NTI at any of the doses used, water intake was similar to that of the saline + AII group. The results of the mixed model ANOVA applied to the data on salt and water intake in this experimental set are shown in Table 2.

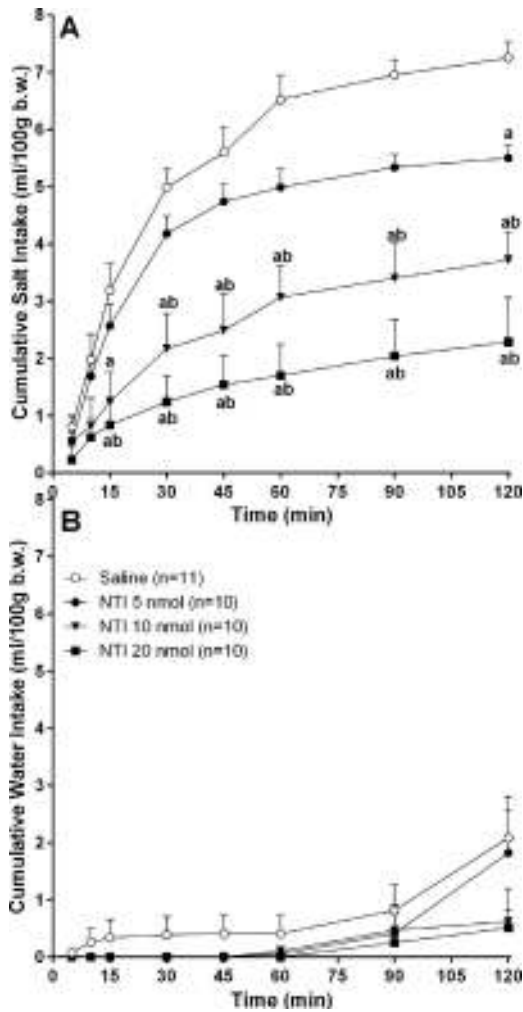


Fig. 1. Cumulative salt (Panels A) and water intake (Panel B) following lateral ventricle injections of saline or naltrindole (NTI) at different doses (5, 10 and 20 nmol) in sodium-depleted rats. Data are presented as means \pm SEM. The letter "a" indicates a statistically significant difference (mixed-model ANOVA followed by Bonferroni's test; $p < 0.05$) when compared to animals receiving saline; the letter "b" indicates a statistically significant difference when compared to sodium-depleted rats receiving 5 nmol of NTI; the letter "c" indicates a statistically significant difference when compared to sodium-depleted rats receiving 10 nmol of NTI. Each group has been obtained from naïve animals.

3.5. Experiment 5 – effect of the δ -opioid receptor antagonist on locomotor activity and hedonic behavior in rats

Fig. 5 shows the results of the *Open Field Test* and *Dessert Test*. In the open field test, central blockade of δ -opioid receptors failed to alter locomotor activity in sodium-depleted rats. Locomotor behavior was similar in sodium-depleted animals receiving LV injections of NTI (20 nmol; $n = 11$) or saline solution ($n = 11$). In the dessert test, the hedonic behavior represented by a preference for a palatable solution was confirmed by the higher saccharin (0.1%) intake compared to water intake in the saline-treated control animals. LV injections of NTI (20 nmol; $n = 7$) failed to alter this hedonic preference.

3.6. Experiment 6 – effect of the δ -opioid receptor antagonist on blood pressure in sodium-depleted rats

Fig. 6 shows the effects of NTI (20 nmol, $n = 8$) on blood pressure in rats submitted to sodium depletion using the same experimental protocol used to study salt intake. Baseline blood

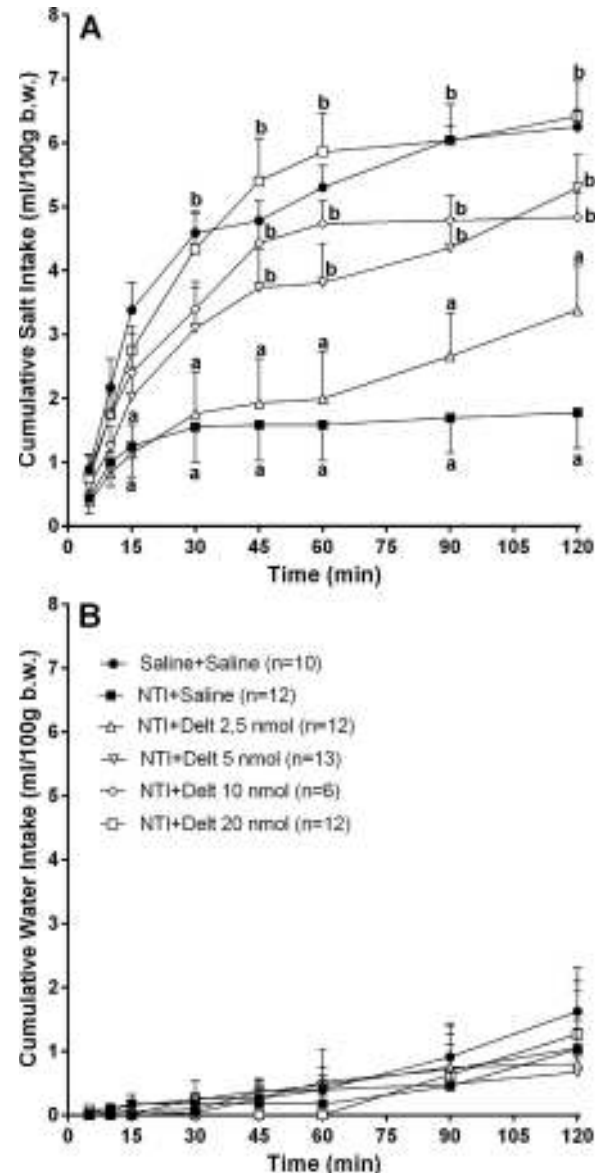


Fig. 2. Cumulative salt (Panels A) and water intake (Panel B) in sodium-depleted animals pretreated with lateral ventricle injections of naltrindole (NTI 20 nmol) before receiving central administration of deltorphin II (Delt 2.5, 5, 10 and 20 nmol). Data are presented as means \pm SEM. The following groups are presented: saline + saline, NTI + saline, NTI + Delt-II 2.5 nmol, NTI + Delt-II 5 nmol, NTI + Delt-II 10 nmol and NTI + Delt-II 20 nmol. The letter "a" indicates a statistically significant difference (mixed-model ANOVA followed by Bonferroni's test; $p < 0.05$) when the distinct groups of animals are compared to controls (saline + saline); the letter "b" indicates a statistically significant difference when compared to the group NTI + saline. Each group has been obtained from naïve animals.

pressure was 94.4 ± 1.6 mmHg in the group treated with NTI and 100.4 ± 3.7 mmHg in the saline-treated control group. Central administration of NTI failed to modify blood pressure in sodium-depleted animals compared to sodium-depleted controls (saline-treated, $n = 5$) throughout the entire experimental period. Two-way ANOVA analysis shows that LV injections of NTI induced no significant treatment ($F_{1,132} = 0.15$; $p = 0.7065$), time ($F_{12,132} = 1.25$; $p = 0.2557$) or interaction ($F_{12,132} = 0.73$; $p = 0.7192$) changes in blood pressure compared to the control group.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the role of central δ -opioid receptors on sodium appetite induced by sodium

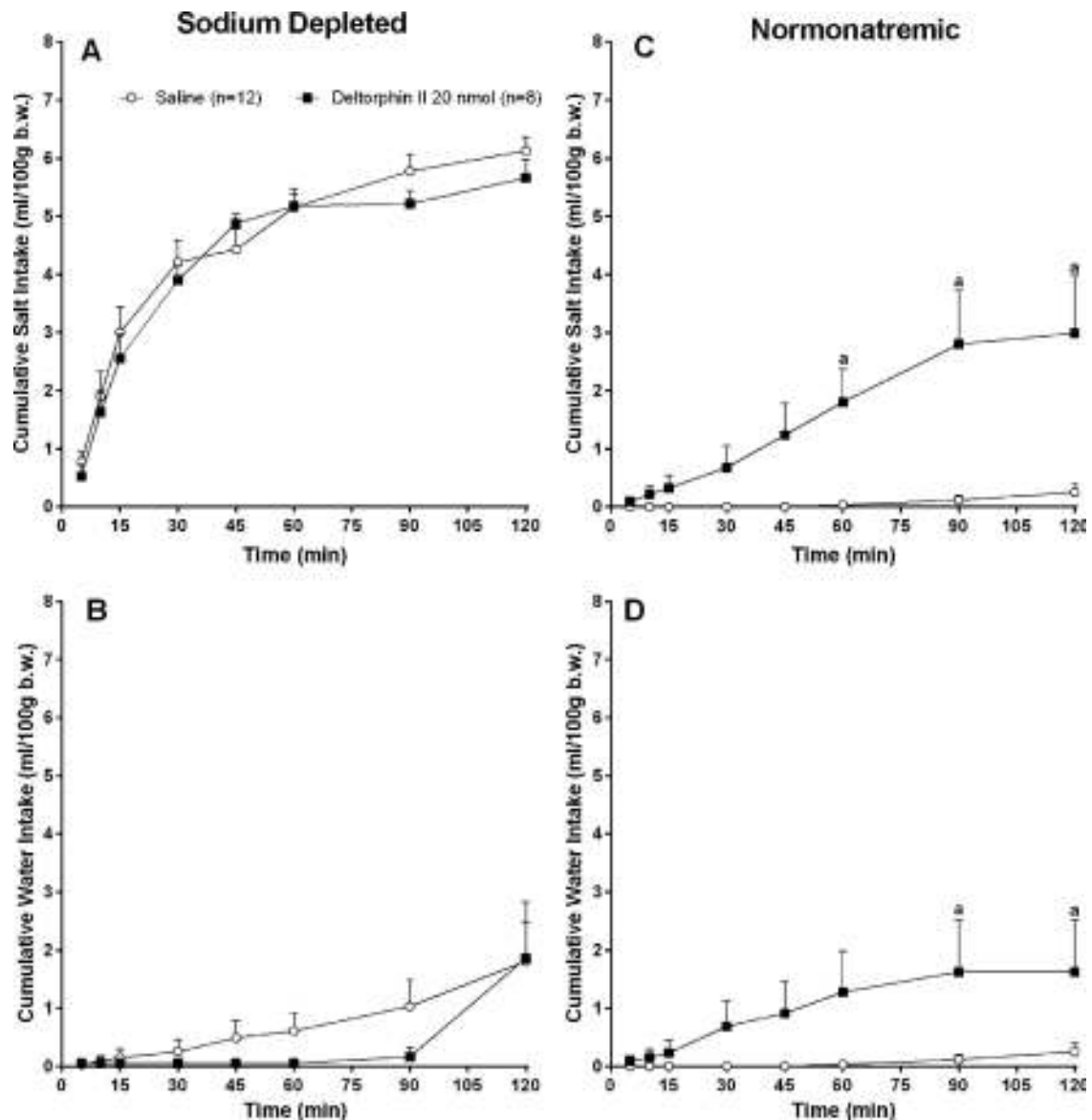


Fig. 3. Cumulative fluid intake following lateral ventricle injections of saline or deltorphin II (20 nmol) in sodium-depleted rats (Panels A: salt intake and Panel B: water intake) and in normonatremic rats, not submitted to sodium-depletion (Panels C: salt intake and Panel D: water intake). Data are presented as means \pm SEM. The letter "a" indicates a statistically significant difference (mixed-model ANOVA followed by Bonferroni's test; $p < 0.05$) when compared to animals receiving saline. Each group has been obtained from naïve animals.

depletion and by central angiotensinergic stimulation. Preference for hypertonic (1.5%) saline over distilled water was evaluated in both sodium-depleted and sodium-replete rats. The main findings show that blockade of central δ -opioid receptors inhibits salt intake in sodium-depleted rats, while the pharmacological stimulation of these receptors increases salt intake in sodium-replete animals. Furthermore, the blockade of central δ -opioid receptors inhibited the salt intake induced by central angiotensinergic stimulation. It was also found that the blockade of δ -opioid receptors did not change the locomotor activity of the animals, their blood pressure or their preference for saccharin in the dessert test.

Some conditions that induce thirst also trigger sodium appetite [1,17,21,34]. A complex interplay between stimulatory drives such as mineralocorticoid and angiotensin II [23,62] and negative inputs such as the oxytocinergic [6,64] and serotonergic inputs [11,12,48,49,52] is important in the control of salt appetite. In a previous study, our group showed that central kappa-opioid receptor blockade inhibited salt intake in sodium-depleted rats, but failed to alter salt intake in normonatremic animals [55]. These data suggest

that k-opioid receptors may be activated during sodium depletion, increasing salt intake. The present study shows that central δ -opioid receptors may also participate in controlling salt intake. In addition, the present data indicate that the interaction between angiotensinergic and opioid systems in the brain is important for the control of sodium appetite in rats.

The opioidergic pathways and opioid receptors are widely distributed throughout the brain [16,42,51,71]. The endorphin family is produced mainly in the arcuate nucleus of the hypothalamus, pituitary and nucleus of the solitary tract. The neuronal system producing enkephalin and dynorphin is more broadly distributed in the brain and it has been reported that in some areas both opioid peptides are present in the same neuron. The endorphin peptides bind mainly to μ -opioid receptors, while enkephalin binds to δ -opioid receptors and dynorphin peptides bind to k-opioid receptors [16,71].

In the present study, blockade of central δ -opioid receptors by LV injection of the antagonist naltrindole induced a dose-dependent inhibition of salt intake in sodium-depleted rats. This

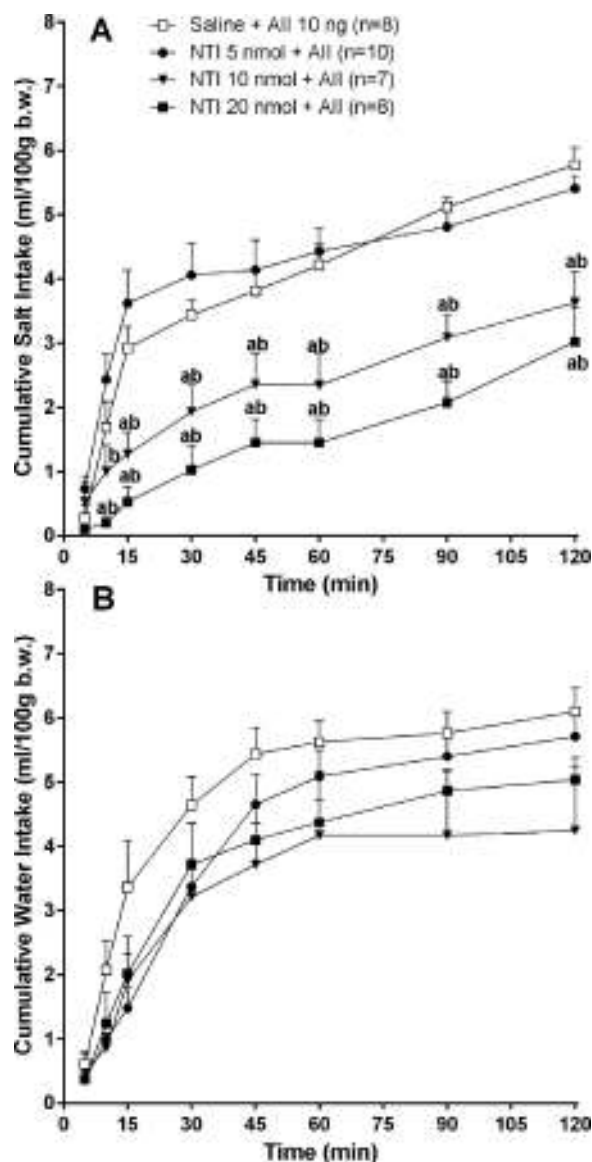


Fig. 4. Cumulative salt (Panel A) and water intake (Panel B) in animals pretreated with lateral ventricle injections of saline or naltrindole (NTI) at different doses (5, 10 and 20 nmol), prior to receiving central administration of angiotensin II (AII) (10 ng). The following groups are presented: saline + AII 10 ng, NTI 5 nmol + AII, NTI 10 nmol + AII, and NTI 20 nmol + AII. Data are presented as means \pm SEM. The letter "a" indicates a statistically significant difference (mixed-model ANOVA followed by Bonferroni's test; $p < 0.05$) when compared to the group saline + AII; the letter "b" indicates a statistically significant difference when the groups NTI 5 nmol + AII. Each group has been obtained from naïve animals.

inhibition was reverted by pre-treatment with deltorphin II, a δ -opioid receptor agonist, at different doses. Both the agonist and the antagonist used in the present study have been shown to be selective for δ -opioid receptors [20,38,57]. Few studies in the literature have evaluated the role of δ -opioid receptors on salt intake regulation. Intracerebroventricular injection of naltrindole has been shown to have no effect on hypotonic (0.6%) or hypertonic (1.7%) saline intake in the two-bottle (water/saline) preference test, although the dose of naltrindole used in the reported experiments was higher (42 nmol/rat) than the dose used in the present study (5–20 nmol/rat) [7]. Furthermore, in that study, Bodnar's group used 24-h fluid deprivation instead of sodium-depletion to induce salt intake. Sodium-depletion has been shown to be a stronger stimulus for salt appetite than 24-h fluid deprivation [47,53]. In studies using a sodium-depletion procedure, both systemic and

intracerebral injections of naltrindole have been reported to blunt salt appetite [45,46]. However, in those studies, only one dose of naltrindole was used, whereas in the present study the use of different doses revealed a dose-dependent inhibition of salt appetite in sodium-depleted rats. These data suggest that during sodium-depletion an increase may occur in endogenous opioid peptides that, by acting on δ -opioid receptors, regulate salt appetite to correct the sodium imbalance. Indeed, an increase has been reported in the levels of enkephalin mRNA at the shell of the nucleus accumbens in sodium-depleted rats with access to hypertonic saline [45]. Those authors suggested that central enkephalin participates in the reward mechanism controlling salt appetite and the data from the present study corroborate this hypothesis.

One of the mechanisms that may be involved in the regulation of salt appetite in animals submitted to sodium-depletion is the renin-angiotensin system (RAS) [21,34]. Central injections of angiotensin II promote robust water and sodium intake in normohydrated and normonatremic animals, which can be inhibited by losartan, an AT1 angiotensin receptor antagonist. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE), both in the periphery and in the central nervous system, has been shown to reduce or completely inhibit salt appetite induced by sodium-depletion [34]. The aldosterone and AII produced in the peripheral system and the brain RAS may have a synergic action stimulating salt intake to a greater degree than the action of either hormone alone [24].

The circumventricular organs such as the subfornical organ (SFO), organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) and area postrema (AP) are important in sensory sites for humoral signals in blood or interstitial fluid [35,56,70]. Indeed, sodium-depletion induced by furosemide injections increases Fos expression in the SFO, OVLT, median preoptic area, central amygdala (CeA), accumbens nucleus (NAc), bed nucleus of stria terminalis (BST), paraventricular, supraoptic, suprachiasmatic and ventromedial hypothalamic nuclei, nucleus of the solitary tract and lateral parabrachial nucleus [18,30,54,59,65,67]. Additionally, co-localization of AT1 receptors and Fos protein in the neuronal population of SFO and OVLT has been shown during sodium-depletion [29]. The increase in neuronal activation induced by sodium-depletion in some brain areas, including the NAc, CeA and BST, is also associated with an increase in the mRNA for enkephalin [30]. The stimulation of these structures during sodium-depletion may initiate activation of a brain network controlling sodium appetite, and the brain enkephalinergic system may play an important role in this control.

There is some anatomic evidence of an interaction between angiotensinergic and enkephalinergic systems in the brain. In a double immunostaining study using light and electronic microscopic analysis, reciprocal synaptic connections were detected between angiotensin II-containing neurons and enkephalinergic neurons in the area postrema [31]. Furthermore, it has been shown that ACE may participate in the metabolic inactivation of the neuropeptides terminating the enkephalin action [37,50,63]. It is interesting to note that in sodium-depleted rats there is some degree of overlap of the brain areas in which there is up-regulation of AT1 receptors mRNA [14,29] and brain areas in which there is an increase in enkephalinergic mRNA [30]. This provides the necessary anatomical background to support the present findings.

The present study showed that the blockade of δ -opioid receptors inhibits salt intake in sodium-depleted rats. Since the brain RAS may mediate salt appetite in sodium-depleted rats, we also decided to investigate the effect of a δ -opioid receptor antagonist on the salt intake directly induced by a central injection of AII. It was found that LV injections of naltrindole inhibit the salt intake induced by central angiotensinergic stimulation in a dose-dependent manner. On the other hand, the water intake induced by angiotensin II remained unchanged by central injections of naltrindole. This finding shows

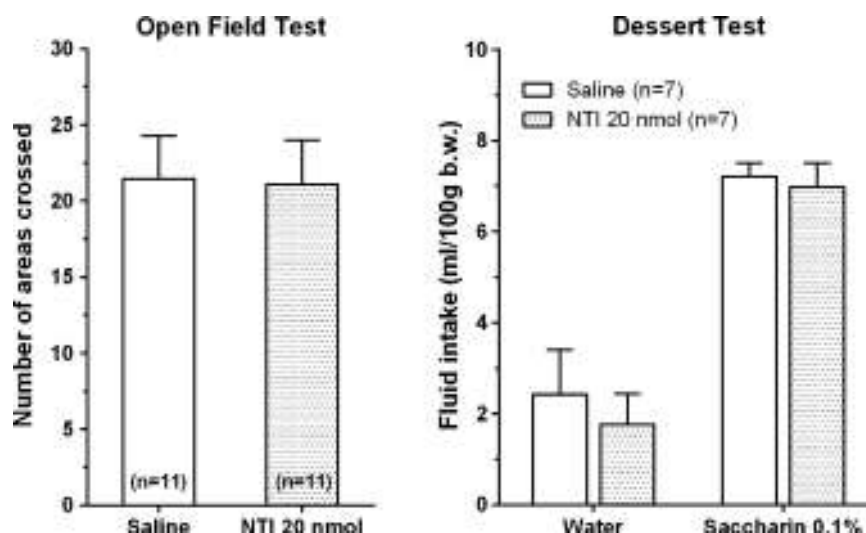


Fig. 5. The number of areas entered during 15 min in the Open Field Test carried out in rats receiving lateral ventricle injections of naltrindole (NTI 20 nmol) or saline. Data are expressed as means \pm SEM. There was no statically significant difference (*t*-test; $p < 0.05$) between the group of animals receiving NTI and the saline-treated animals. In the Dessert Test the cumulative saccharin 0.1% and water intake (ml/100 g body weight) was recorded during 2 h after lateral ventricle injections of NTI (20 nmol) or saline. The treatment received by each group and the number of animals used is indicated in the graph. Data are expressed as means \pm SEM. There was no statically significant difference (*t*-test; $p < 0.05$) when the group of animals receiving NTI was compared to saline-treated group.

that in a two-bottle choice test, blockade of the δ -opioid receptors specifically inhibits salt preference when the animals are able to choose between water and hypertonic saline, confirming the effect of δ -opioid receptors on salt preference.

The effect of δ -opioid receptors on water intake induced by angiotensin II may depend on the experimental protocol used, since central injection of 40 nmol of naltrindole inhibits water intake induced by angiotensin when water is the only fluid available [60]. On the contrary, stimulation of δ -opioid receptors by deltorphin II increases water intake in normohydrated animals, again, when water is the only fluid available. Furthermore, central injection of deltorphin II increases the water intake induced by a very low dose of angiotensin II (0.02 ng/10 μ l), but does not change the water intake induced by angiotensin II at a higher dose (2 ng/10 μ l) [72].

Pharmacological stimulation of the central δ -opioid receptors in normonatremic rats, a “salt need-free” condition, induces animals

to drink a salt solution that is usually aversive. This fact suggests that central δ -opioid receptors exert a facilitator effect on salt intake behavior. On the other hand, during a “salt hunger” condition (sodium-depletion) an increase may take place in the activation of central δ -opioid receptors that may change perception of the quality of the salt solution from aversive to palatable, driving animals to consume a large amount of salt until the sodium deficit is replenished. This response reflects sodium appetite and not a hedonic ingestive behavior associated with a tasty salty solution. In a “salt hunger” condition, pharmacological stimulation of δ -opioid receptors failed to promote a further increase in salt intake. In both “salt need-free” and “salt hunger” conditions, the animals drank a very small volume of water and the blockade or the stimulation of central δ -opioid receptors had no effect on water intake.

The role of the central opioidergic system in the control of feeding behavior has been shown by several studies, while only a few studies have investigated the participation of central opioid peptides in the regulation of water intake and sodium appetite [8,9]. Both systemic and intracerebral injections of morphine and the selective opioid receptor agonists increase food intake. In addition, opioid peptides appear to induce a preference for sweet and fatty solutions [8,9]. Indeed intracerebral administration of morphine and opioid peptide receptor agonists increase fat and sugar intake [9,26]. Ingestive behavior may be regulated by reward mechanisms involving the hedonic aspects of food and/or fluid intake and the homeostatic nature of the macro and micronutrients [2,4,26]. Substantial findings indicate that central opioid system controls feeding behavior through a mechanism which involves the reward and the palatability aspects of food intake [2,26,32,36,42]. In the present study, the “dessert test”, a test used to evaluate the hedonic aspect of ingestive behavior [19,33], shows that intake of a palatable saccharin solution is unaffected by LV injections of naltrindole. These data suggest that the changes in salt intake promoted by central δ -opioid receptors in both normonatremic (salt need-free condition) and sodium-depleted (salt-hunger condition) rats are unrelated to a general change in the palatability mechanisms regulating ingestive behavior.

Central injections of opioid receptor antagonists have been shown to decrease ambulatory and stereotyped activity [43]. These effects could influence ingestive behavior. However, in the present study, no change occurred in locomotor activity in the “open field”

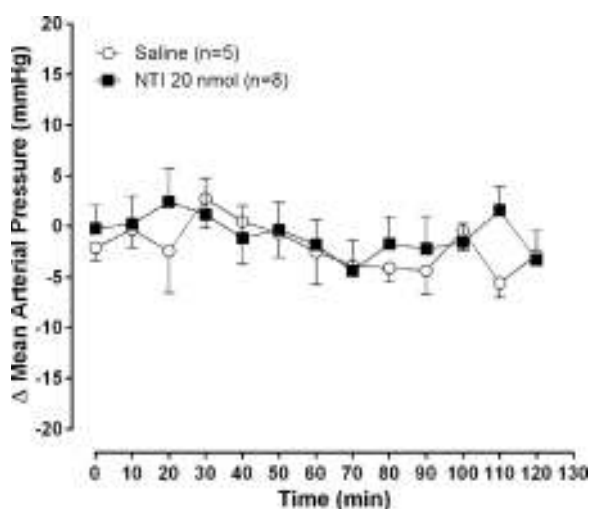


Fig. 6. Changes in mean blood pressure in sodium-depleted rats after injections of naltrindole (NTI 20 nmol or saline into the lateral ventricle. The injections were given at 0 min and the bottles containing water and saline solution (1.5%) were immediately accessible. Data are presented as means \pm SEM. There was no statistically significant difference between the groups (two-way ANOVA; $p < 0.05$).

test in sodium-depleted rats receiving central injections of naltrindole.

Central opioid peptides may participate in the cardiovascular regulation [8,66], and both hypotensive and hypertensive responses have been observed after pharmacological manipulation of central opioid pathways [39–41]. Changes in blood pressure may affect salt intake; however, a hypertension-induced decrease in salt intake can be excluded as the cause of the inhibitory ingestive behaviors observed in the present study, since intracerebroventricular injections of naltrindole in sodium-depleted rats did not alter blood pressure. Similar results were observed after both systemic [61] and central injections of naltrindole [13,22].

The data obtained in the present study confirmed our hypothesis that central δ -opioid receptors participate in the modulation of salt intake during homeostatic challenges. It is possible that during sodium-depletion, activation of the δ -opioid receptors regulates salt appetite in order to correct the sodium imbalance, while under normonatremic conditions, δ -opioid receptors may be necessary to maintain the normal sodium intake. Since in the present study it was observed that blockade of δ -opioid receptors inhibits salt intake induced by angiotensin II, it is possible to conclude that an interaction between opioidergic and angiotensinergic brain system participates in the control of salt appetite. The decrease in salt intake following central δ -opioid receptors blockade does not appear to be due to a general inhibition of locomotor activity, changes in palatability or in blood pressure. Given that the circumventricular structures have the ability to detect variations in plasma angiotensin II levels, they may be important as a link between changes in peripheral hydroelectrolyte status and the brain opioidergic system in the control of body fluid homeostasis. However, other studies are needed to clarify the brain areas participating in the control of salt appetite modulated by δ -opioid receptors.

Acknowledgments

We are grateful to Mr. José de Souza for his technical assistance. The present study was supported by grants provided by The Brazilian Council of Research, CNPq (302653/2009-0).

References

- [1] Antunes-Rodrigues J, Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004;84:169–208.
- [2] Baldo BA, Pratt WE, Will MJ, Hanlon EC, Bakshi VP, Cadore M. Principles of motivation revealed by the diverse functions of neuropharmacological and neuroanatomical substrates underlying feeding behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2013;37:1985–98.
- [3] Beczkowska IW, Bowen WD, Bodnar RJ. Central opioid receptor subtype antagonists differentially alter sucrose and deprivation-induced water intake in rats. *Brain Res* 1992;589(2):291–301.
- [4] Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav* 2009;97(5):537–50.
- [5] Bie B, Pan ZZ. Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Mol Pain* 2007;3:37.
- [6] Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;90:10380–4.
- [7] Bodnar RJ, Glass MJ, Koch JE. Analysis of central opioid receptor subtype antagonism of hypotonic and hypertonic saline intake in water-deprived rats. *Brain Res Bull* 1995;36:293–300.
- [8] Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2011. *Peptides* 2012;38:463–522.
- [9] Bodnar RJ. Endogenous opioids and feeding behavior: a 30-year historical perspective. *Peptides* 2004;25:697–725.
- [10] Cahill CM, Holdridge SV, Morinville A. Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28(1):23–31.
- [11] Castro L, Athanazio R, Barbeta M, Ramos AC, Ângelo AL, Campos I. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res* 2003;981:151–9.
- [12] Castro L, Varjão B, Maldonado I, Campos I, Duque B, Fregoneze JB. Central 5-HT₃ receptors and water intake in rats. *Physiol Behav* 2002;77:349–59.
- [13] Cavun S, Resch GE, Evec AD, Rapacon-Baker MM, Millington WR. Blockade of delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray region inhibits the fall in arterial pressure evoked by hemorrhage. *Pharmacol Exp Ther* 2001;297:612–9.
- [14] Charron G, Laforest S, Gagnon C, Drolet G, Mougnot D. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. *FASEB J* 2002;16:610–2.
- [15] Cooper SJ, Gilbert DB. Naloxone suppresses fluid consumption in tests of choice between sodium chloride solutions and water intake in male and female water-deprived rats. *Psychopharmacology* 1984;84:362–7.
- [16] Cuello AC. Central distribution of opioid peptides. *Br Med Bull* 1983;39:11–6.
- [17] Daniels D, Fluharty SJ. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. *Physiol Behav* 2004;81(2):319–37.
- [18] De Luca Jr LA, Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R552–9.
- [19] Ernits T, Corbit JD. Taste as a dipsogenic stimulus. *J Comp Physiol Psychol* 1973;83:27–31.
- [20] Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Corsi R, Severini C, et al. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for δ opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5188–92.
- [21] Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998;78:583–686.
- [22] Fregoneze JB, Oliveira EF, Ribeiro VF, Ferreira HS, De Castro e Silva E. Multiple opioid receptors mediate the hypotensive response induced by central 5-HT₃ receptor stimulation. *Neuropeptides* 2011;45:219–27.
- [23] Galaverna O, Polidori C, Sakai RR, Liénard F, Chow SW, Fluharty SJ. Blockade of central angiotensin II type I and type II receptors suppresses adrenalectomy-induced NaCl intake in rats. *Regul Pept* 1996;66:47–50.
- [24] Geerling JC, Loewy AD. Central regulation of sodium appetite. *Exp Physiol* 2008;93(2):177–209.
- [25] Gilbert DB, Cooper SJ. Naloxone antagonizes the hyperdipsic effect of sulphiride in a salt-preference test in male and female rats. *Neuropharmacology* 1986;25:743–7.
- [26] Gosnell BA, Levine AS. Reward systems and food intake: role of opioids. *Int J Obes* 2009;33:S54–8.
- [27] Gosnell BA, Majchrzak MJ, Krahn DD. Effects of preferential delta and kappa opioid receptor agonists on the intake of hypotonic saline. *Physiol Behav* 1990;47:601–3.
- [28] Gosnell BA, Majchrzak MJ. Effects of a selective mu opioid receptor agonist and naloxone on the intake of sodium chloride solutions. *Psychopharmacology* 1990;100:66–71.
- [29] Grob M, Trotter JF, Mougnot D. Heterogeneous co-localization of AT1A receptor and Fos protein in forebrain neuronal populations responding to acute hydromineral deficit. *Brain Res* 2004;16(996):81–8.
- [30] Grondin ME, Gobeil-Simard A, Drolet G, Mougnot D. Na⁺ appetite induced by depleting extracellular fluid volume activates the enkephalin/mu-opioid receptor system in the rat forebrain. *Neuroscience* 2011;192:398–412.
- [31] Guan JL, Wang QP, Lu S, Shioda S. Reciprocal synaptic relationships between angiotensin II-containing-neurons and enkephalinergic neurons in the rat area postrema. *Synapse* 2001;41(2):112–7.
- [32] Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE. Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger. *Psychopharmacology* 2004;172:241–7.
- [33] Johnson AK, Schwob JE. Cephalic angiotensin receptors mediating drinking to systemic angiotensin II. *Pharmacol Biochem Behav* 1975;3:1077–84.
- [34] Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:292–353.
- [35] Johnson AK. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39:1388–400.
- [36] Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 2005;86:773–95.
- [37] Konkoy CS, Davis TP. Ectoenzymes as sites of peptide regulation. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:288–94.
- [38] Kreil G, Barra D, Simmaco M, Erspamer V, Falconieri-Erspamer G, Negri L, et al. Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high affinity and selectivity for δ opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1989;162:123–8.
- [39] Ku YH. Role of limbic peptidergic circuits in regulation of arterial pressure, relevant to development of essential hypertension. *Neuropeptides* 2006;40:299–308.
- [40] Lang RE, Brückner UB, Kempf B, Rascher W, Sturm V, Unger T, et al. Opioid peptides and blood pressure regulation. *Clin Exp Hypertens A* 1982;4:249–69.
- [41] Laubie M, Schmitt H, Vincent M, Remond G. Central cardiovascular effects of morphinomimetic peptides in dogs. *Eur J Pharmacol* 1977;46:67–71.
- [42] Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 2009;89:1379–412.
- [43] Leventhal L, Cole JL, Bodnar RJ. Reductions in locomotor activity following central opioid receptor subtype antagonists in rats. *Physiol Behav* 1996;60:833–6.
- [44] Levine AS. The animal model in food intake regulation: examples from the opioid literature. *Physiol Behavior* 2006;89:92–6.
- [45] Lucas LR, Grillo CA, McEwen BS. Involvement of mesolimbic structures in short-term sodium depletion: in situ hybridization and ligand-binding analyses. *Neuroendocrinology* 2003;77:406–15.

- [46] Lucas LR, Grillo CA, McEwen BS. Salt appetite in sodium-depleted or sodium-replete conditions: possible role of opioid receptors. *Neuroendocrinology* 2007;85:139–47.
- [47] Lundy Jr RF, Blair M, Horvath N, Norgren R. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. *Physiol Behav* 2003;78:449–58.
- [48] Luz C, Souza A, Reis R, Fregoneze JB, De Castro e Silva E. Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res* 2006;1099:121–32.
- [49] Luz CP, Souza A, Reis R, Mineiro P, Ferreira HS, Fregoneze JB, et al. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res* 2007;1139:178–94.
- [50] Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP, Schwartz JC. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 1978;276:523–6.
- [51] Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 1987;7:2445–64.
- [52] Menani JV, De Luca Jr LA, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite by sodium depletion. *Am J Physiol* 1998;274:555–60.
- [53] Morris MJ, Na ES, Johnson AK. Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake. *Physiol Behav* 2008;94:709–21.
- [54] Na ES, Morris MJ, Johnson RF, Beltz TG, Johnson AK. The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. *Brain Res* 2007;1171:104–10.
- [55] Nascimento AI, Ferreira HS, Saraiva RM, Almeida TS, Fregoneze JB. Central kappa opioid receptors modulate salt appetite in rats. *Physiol Behav* 2012;106:506–14.
- [56] Noda M, Hiyama TY. Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. *Chem Senses* 2005;30(Suppl. 1):i44–5.
- [57] Portoghese PS, Sultana M, Takemori AE. Naltrindole, a high selective and potent non-peptide δ opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1988;146:185–6.
- [58] Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:581–90.
- [59] Rowland NE. Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: insights from use of immediate early gene mapping. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23:49–63.
- [60] Ruegg H, Yu WZ, Bodnar RJ. Opioid-receptor subtype agonist-induced enhancements of sucrose intake are dependent upon sucrose concentration. *Physiol Behav* 1997;62:121–8.
- [61] Sezen SF, Kenigs VA, Kapusta DR. Renal excretory responses produced by the delta opioid agonist, BW373U86, in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:238–45.
- [62] Shelat SG, King JL, Flanagan-Cato LM, Fluharty SJ. Mineralocorticoids and glucocorticoids cooperatively increase salt intake and angiotensin II receptor binding in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1999;69:339–51.
- [63] Skidgel RA, Erdös EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides* 2004;25:521–5.
- [64] Stricker EM, Verbalis JG. Central inhibition of sodium appetite by oxytocin in rats. *Regul Pept* 1996;66:83–5.
- [65] Thunhorst RL, Xu Z, Cicha MZ, Zardetto-Smith AM, Johnson AK. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. *Am J Physiol* 1998;274(6 Pt 2):R1807–14.
- [66] Vaccarino AL, Kastin AJ. Endogenous opiates: 2000. *Peptides* 2001;22:2257–328.
- [67] Vivas L, Pastuskovas CV, Tonelli L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res* 1995;679:34–41.
- [68] vonZastrow M. Opioid receptor regulation. *Neuromol Med* 2004;5:51–8.
- [69] Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Ann Rev Biochem* 2004;73:953–90.
- [70] Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminar processes in the sensory circumventricular organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R568–76.
- [71] Watson SJ, Khachaturian H, Akil H, Coy DH, Goldstein A. Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalin systems in brain. *Science* 1982;218:1134–6.
- [72] Yu W-Z, Bodnar RJ. Interactions between angiotensin II and delta opioid receptor subtype agonists upon water intake in rats. *Peptides* 1997;2:241–5.
- [73] Zhang X, Bao L, Guan JS. Role of delivery and trafficking of delta-opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:324–9.