



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H₁ E H₂ NÚCLEO DA
AMÍGDALA CENTRAL (CeA) SOBRE O CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO**

DANIELE OSÓRIO MEIRA BRITO

**Salvador – Bahia
2017**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H₁ E H₂ NÚCLEO
DA AMIGDALA CENTRAL (CeA) SOBRE O CONTROLE DO APETITE POR
SÓDIO**

DANIELE OSÓRIO MEIRA BRITO

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Josmara Bartolomei Fregoneze

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, para obtenção do grau Mestre.

**Salvador – Bahia
2017**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Brito, Daniele Osório Meira
B862p Papel dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ núcleo da amígdala central (CeA)
sobre o controle do apetite por sódio / Daniele Osório Meira Brito - 2017.
70 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a Dr^a Josmara Bartolomei Fregoneze, Laboratório
de Patologia e Intervenção.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia,
Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Núcleo central da amígdala. 2. Sódio. 3. Apetite. 4. Agentes
Histaminérgicos. I. Título.

CDU 616.33-008.4

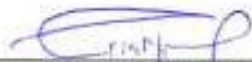
**"PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H1 E H2 NÚCLEO DA AMIGDALA
CENTRAL (CeA) SOBRE O CONTROLE DO APETITE POR SÓDIO"**

DANIELE OSÓRIO MEIRA BRITO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 01 de dezembro de 2017

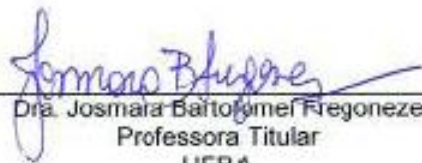
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Cristiane Flora Villareal
Professora Associada
UFBA



Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira
Pesquisador
IGM / Fiocruz



Dra. Josmaira Baltazar Fregoneze
Professora Titular
UFBA

A realização deste trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

Dedico este trabalho àqueles que sempre
sonharam juntamente comigo: *a minha família!*

“O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada.”

Cora Carolina

AGRADECIMENTOS

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tens feito?” (Salmos 116:12).

Agradeço àquele que me permitiu tudo isso, é a Ele que dirijo minha maior gratidão. Deus! Vem d’Ele tudo o que sou o que tenho e o que espero.

À professora Josmara Bartolomei Fregoneze pela dedicação e orientação. Obrigada por cada palavra de incentivo, e por contribuir de forma tão singular com a minha formação e crescimento científico.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Neurociências pelo companheirismo. Em especial a Lucinez, Andrei e Átila, pela ajuda, compreensão e palavra amiga.

Aos estudantes de iniciação científica do Laboratório de Neurociências, especialmente Emerson e Camila, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao bioterista, Sr. José de Souza, por toda atenção e cuidado.

As professoras Carla Patrícia e Ana Angélica Leal, por me impulsionaram a prosseguir na área acadêmica.

Ao CPqGM e seus funcionários, em especial a Coordenação de Ensino da Pós Graduação em Patologia Humana e a Biblioteca.

Ao meu esposo Gálber, meus pais Norma e Diógenes e meu irmão David, pelo apoio irrestrito e incondicional. Obrigada por batalharem comigo e por serem a minha fonte de inspiração!

Aos demais familiares e amigos, obrigada por acreditarem nessa conquista.

Muito Obrigada!

BRITO, Daniele Osório Meira. Papel dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ núcleo da amígdala central (CeA) sobre o controle do apetite por sódio. 70 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Existem várias áreas cerebrais envolvidas no controle do apetite por sódio, dentre elas podemos citar a amígdala. No complexo amigdalóide, encontramos diversos receptores de neurotransmissores e/ou neuromoduladores que controlam o apetite por sódio, incluindo as vias histaminérgicas. Porém, mesmo sabendo que esse complexo é uma das principais regiões cerebrais no controle do apetite específico por sódio, e que os receptores histaminérgicos, em especial o os receptores do H₁ e H₂, estão presentes nos subnúcleos da amígdala, incluindo o núcleo central da amígdala (CeA), não se conhece papel destes receptores no controle do apetite por sódio nesta área, reforçando, dessa forma, a necessidade da realização de mais estudos sobre as vias histaminérgicas. **OBJETIVO:** Investigar o envolvimento dos receptores histaminérgicos dos tipos H₁ e H₂, no CeA sobre a apetite por sal em ratos sódio-depletados. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados nesse estudo, ratos Wistar machos adultos, pesando entre 250g e 270g, submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de canula guia no núcleo central da amígdala (CeA). 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 injeções bilaterais dos antagonistas dos receptores histaminérgicos dos tipos H₁ e H₂ no quinto dia pós-cirúrgico, nas concentrações de 50, 100 e 200 nmol/2 µL. Bebedouros de água destilada e de salina foram introduzidos nas caixas 15 minutos após a injeção central e tiveram seus volumes monitorados por 120 minutos. Para verificar a especificidade de ação dos antagonistas histaminérgicos, os animais foram submetidos aos testes de sobremesa e campo aberto. Ao final das sessões experimentais, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e os seus encéfalos foram removidos para o processamento histológico. A análise estatística utilizada foi ANOVA *two-way* modelo misto para medidas repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni, ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni e teste "t" de Student não pareado, realizada através do programa GraphPad Prism 6.0. **RESULTADOS:** As microinjeções de mepiramina, antagonista dos receptores histaminérgicos do tipo H₁, e cimetidina, antagonista dos receptores do tipo H₂ no CeA inibe de maneira significativa o apetite por sódio e não está associada a qualquer impedimento locomotor ou a alteração inespecífica da palatabilidade, dado que a locomoção e a ingestão de sacarina 0,1% dos animais não foram alteradas. Entretanto, vale salientar que no CeA, os antagonistas dos receptores do tipo H₁ promovem uma inibição na ingestão de salina hipertônica mais acentuada, enquanto que os antagonistas dos receptores do tipo H₂ induzem uma inibição menos intensa. Além disso, os resultados obtidos também demonstram que os animais depletados de sódio deste estudo, tanto os que receberam as microinjeções de mepiramina ou cimetidina, assim como os seus respectivos controles não ingeriram água destilada durante as sessões experimentais. **CONCLUSÃO:** Os resultados apresentados nesse estudo confirmam a nossa hipótese de que durante a depleção de sódio, as vias histaminérgicas, através dos seus receptores dos tipos H₁ e H₂ podem ser ativadas e, dessa forma, modular o apetite por sódio corrigindo o equilíbrio homeostático.

Palavras-chave: Núcleo central da amígdala; Sódio; Apetite; Agentes Histaminérgicos.

BRITO, Daniele Osório Meira. Role of histaminergic receptors H1 and H2 nucleus of the central amygdala (CeA) on the control of sodium appetite. 70 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: There are several brain areas involved in the control of sodium appetite, among them we can mention the amygdala. In the amygdaloid complex we can find several receptors of neurotransmitters and / or neuromodulators that control the appetite for sodium, including the histaminergic pathways. However, even though this complex is one of the major brain regions in the control of the specific appetite for sodium, and that the histaminergic receptors, especially the H₁ and H₂ receptors, are present in the subnuclei of the amygdala, including the central nucleus of the (CeA), it is not known the role of these receptors in the control of sodium appetite in this area, thus reinforcing the need for further studies on the histaminergic pathways. **AIM:** To investigate the involvement of histaminergic receptors types H₁ and H₂, in CeA on salt appetite in sodium-depleted rats. **MATERIALS AND METHODS:** Adult male Wistar rats, weighing between 250g and 270g, underwent stereotactic surgery to guide cannula implantation in the central nucleus of the amygdala (CeA). In the sodium depletion protocol, the animals were submitted to subcutaneous injection of furosemide combined with a hyposodic diet four days after surgery. In this study model, the animals received bilateral injections of histaminergic H₁ and H₂ receptor antagonists on the fifth postoperative day at concentrations of 50, 100 and 200 nmol / 2 µl. Distilled water and saline drinking troughs were introduced into the boxes 15 minutes after the central injection and had their volumes monitored for 120 minutes. To verify the specificity of action of the histaminergic antagonists, the animals were submitted to the desert and open field tests. At the end of the experimental sessions, the animals were submitted to transcardiac perfusion and their brains were removed for histological processing. The statistical analysis used was a two-way mixed-mode ANOVA for repeated measures followed by the Bonferroni post-test, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons post-test and unpaired Student's t-test, performed through the program GraphPad Prism 6.0. **RESULTS:** Microinjections of mepyramine, a histaminergic H₁-receptor antagonist, and cimetidine, a H₂-receptor antagonist in CeA significantly inhibit sodium appetite and is not associated with any locomotor impairment or nonspecific palatability alteration, since locomotion and 0.1% saccharin intake of the animals were not altered. However, it is noteworthy that in CeA, H₁-type receptor antagonists promote an inhibition in the intake of more marked hypertonic saline, whereas H₂-type receptor antagonists induce less intense inhibition. In addition, the results obtained also demonstrate that the sodium-depleted animals of this study, both those receiving microinjections of mepyramine or cimetidine, as well as their respective controls did not ingest distilled water during the experimental sessions. **CONCLUSION:** The results presented in this study confirm our hypothesis that during sodium depletion, the histaminergic pathways through their H₁ and H₂ type receptors can be activated and, in this way, modulate the sodium appetite by correcting the homeostatic balance.

Keywords: Central nucleus of the amygdala; Sodium; Appetite; Histaminergic Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Natureza das informações de entradas hormonais e neuronais no cérebro derivadas da periferia visceral e as vias neurais centrais que medeiam à integração de sinais sensoriais para a geração do apetite por sal.....19
Figura 02	Núcleos do complexo amigdalóide do rato. Seções coronais desenhadas da região Rostral21
Figura 03	O sistema histaminérgico no cérebro humano: origem e projeções.....23
Figura 04	Formação e degradação da histamina.....24
Figura 05	Fotomicrografia do corte do cérebro de rato indicando o local da microinjeção no CeA.....37
Figura 06	Comparação da Ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% (A) e de água (B) em animais sódio depletados após microinjeções de H ₁ no CeA nas concentrações de 200, 100 e 50nmol/0,2μL ou salina isotônica 0.9%.....40
Figura 07	Comparação da Ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% (A) e de água (B) em animais sódio depletados após microinjeções de H ₂ no CeA nas concentrações de 200, 100 e 50nmol/0,2μL ou salina isotônica 0.9%.....43
Figura 08	Comparação da Ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% entre os grupos que receberam microinjeções de H ₁ e o grupo de animais que receberam microinjeções de H ₂ no CeA nas concentrações de 200, 100nmol/0,2μL ou salina isotônica 0.9%.....45
Figura 09	Figura 09: Teste de Sobremesa realizado em animais privados de água por 24 horas e tratados com H ₁ (A) e H ₂ (B) na concentração de 200nmol/0,2μL no CeA sobre a ingestão total de sacarina 0,1% e de água filtrada.....47
Figura 10	Teste de Campo Aberto realizado em animais depletados de sódio e tratados com H ₁ /H ₂ na concentração de 200nmol/0,2μL no CeA.....49
Figura 11	Diagrama esquemático indicando as possíveis vias responsáveis pela ativação do sistema histaminérgico no CeA em resposta a depleção de sódio.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDO	Aldosterona
AII	Angiotensina II
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AP	Área postrema
BTS	Núcleo da estria terminal
CeA	Núcleo central da amígdala
CCK	Colecistoquinina
CGRP	Gene da calcitonina
CTAP	(D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH ₂) Antagonista μ -opióide
CeA	Núcleo central da amígdala
DAG	1,2 diaclicerol
DAMGO	([D-Ala(2), N-Me-Phe(4), Gly(5)-ol] - encefalina) Agonista μ -opióide
DBH	Dopamina β -hidroxilase
DOCA	Desoxicorticosterona
FMPH	2- (3- trifluorometilfenilo) histamina (Agonista do receptor histaminérgico do tipo 1)
GPL	Globo pálido
HDC	Histidina descarboxilase
HNMT	Histamina N-metiltransferase
H ₁	Receptor histaminérgico do tipo 1
H ₂	Receptor histaminérgico do tipo 2
i.c.v	Intracerebroventricular
IP3	1,4,5 trifosfato de inositol
JG	Justaglomerular
LEC	Compartimento líquido extracelular
LIC	Compartimento líquido intracelular
LPBN	Núcleo parabraquial
MAO-B	Monoamina oxidase
m-CPBG	m- clorofenilbiguanida de cloridrato (1- (3-clorofenil) biguanida (Agonista serotoninérgico do receptor 5-HT ₃)
m-CPP	meta-clorofenilpiperazina (Agonista serotoninérgico do receptor 5-HT _{2C})
MeA	Núcleo medial da amígdala
MPO	Núcleo pré-óptico
NA _x	Canais sensíveis a variações do sódio
NTS	Núcleo do trato solitário
OVL	Órgão vascular da lâmina terminal
PCA	Anastomose portacaval
PKA	Proteína cinase
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SDZ SER 082	Antagonista seletivo do receptor 5-HT _{2C}
SFO	Órgão subfornical
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema nervoso simpático
TM	Núcleo tuberomamilar

VMAT -2	Proteína vesicular transportadora de monoaminas tipo 2
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo
5- HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
5HT ₃	Receptor serotoninérgico do tipo 3
5HT ₄	Receptor serotoninérgico do tipo 4
5-HT _{2C}	Receptor serotoninérgico do tipo 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	HOMEOSTASIA HIDROSSALINA	15
2.2	CONTROLE CENTRAL DO APETITE POR SÓDIO	17
2.3.	O COMPLEXO AMIGDALOIDE E O NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA (CeA)	20
2.4.	HISTAMINA E AS VIAS HISTAMINÉRGICAS	22
3	HIPÓTESES	28
3.1	HIPÓTESE TESTE (H1).....	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	ANIMAIS	30
5.2	CÁLCULO AMOSTRAL	30
5.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	30
5.4	HABITUAÇÃO ÀS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	31
5.5	MICROINJEÇÕES.....	31
5.6	DROGAS.....	31
5.7	HISTOLOGIA	32
5.8	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
5.8.1	<i>DEPLEÇÃO DE SÓDIO</i>	32
5.8.2	<i>PROTOCOLO DO TESTE DE SOBREMESA</i>	33
5.8.3	<i>PROTOCOLO DO TESTE DO CAMPO ABERTO</i>	34
5.9	DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	35
7	RESULTADOS	37
8	DISCUSSÃO	50
9	CONCLUSÃO.....	57
10	PERSPECTIVAS FUTURAS	58
11	REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

Existem várias áreas cerebrais envolvidas no controle do apetite por sódio, dentre elas podemos citar a amígdala, a qual recebe e envia projeções para uma variedade de outras estruturas encefálicas relacionadas com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico tais como núcleos hipotalâmicos, núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, área postrema, órgão subfornical, área septal entre outras. Estas comunicações recíprocas da amígdala e núcleos encefálicos sugerem o papel dos núcleos amigdaloides na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico (PRICE, et al., 1987; JOHNSON; THUNHORST, 1997; JOHNSON, et al., 1999). No complexo amígdalóide, podemos encontrar diversos receptores de neurotransmissores e/ou neuromoduladores que controlam o apetite por sódio, incluindo as vias histaminérgicas. Em estudos anteriores do Laboratório, verificou-se que a administração intracerebroventricular (ICV) e no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) de antagonistas dos receptores histaminérgicos dos tipos H₁ e H₂ inibe a ingestão hídrica induzida por diferentes estímulos, assim como inibe o apetite por sódio em ratos depletados deste íon (MAGRANI, et al., 2004, 2005, 2006).

Dessa forma, dado que o sistema histaminérgico apresenta ampla distribuição encefálica e ocupa posição chave na regulação de diversas funções básicas que inclui ciclo sono/vigília, aprendizagem, consolidação da memória, humor, ritmos biológicos, comportamento alimentar, metabolismo energético, termorregulação, balanço hídrico, controle cardiovascular, respostas ao estresse, controle neuroendócrino (BANANEJ, et al., 2011; BRISTOW; BENNETT, 1988; HAAS; SERGEEVA; SEBACH, 2008; KÖHLER, et al., 2011; PHILIPPU; PRAST, 2001) e que drogas anti-histamínicas são utilizadas na clínica como antialérgicos e no tratamento de distúrbios do sistema digestivo, como úlceras gastroesofágicas, e ainda, visto que novos compostos histaminérgicos com ação no sistema nervoso central tem sido desenvolvidos com indicação terapêutica variada, sendo o foco principal o tratamento de distúrbios do sono e alimentar, alterações cognitivas e dependência de drogas, é de suma importância o melhor conhecimento do papel funcional das vias histaminérgicas centrais, tendo em vista a vasta aplicação terapêutica de compostos histaminérgicos. Assim sendo, no presente trabalho, decidimos investigar o envolvimento da amígdala central no controle do comportamento de apetite por sódio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HOMEOSTASIA HIDROSSALINA

A homeostasia é um conceito fundamental na fisiologia, o qual foi proposto por Walter Cannon (1871-1945) como o processo responsável pela manutenção da constância da matriz do líquido interno. Esse termo foi uma extensão da definição do ambiente interno de um organismo sugerido pelo fisiologista francês Claude Bernard (1813-1878), o qual acreditava: “na existência de certa constância do ambiente interno das criaturas vivas, e que essa constância se dava pela capacidade que os organismos apresentavam em estabilizar o ambiente celular, mesmo diante de forças entrópicas que ameaçavam perturbar a ordem biológica essencial para a vida” (BERNARD, 1878; BERNTSON; CACIOPPO, 2007; AGNATI, et al., 2017).

Essa osmoregulação homeostática é indispensável à sobrevivência dos seres vivos, dado que mudanças no volume celular causadas por hipertonicidade grave ou hipotonicidade podem levar a danos irreversíveis aos órgãos e causar trauma neurológico letal (ARIEFF, 1993). Desta feita, os mamíferos exibem uma variedade de mecanismos homeostáticos que funcionam em conjunto, a fim de manter a osmolalidade do líquido corporal em aproximadamente 300 mOsm / kg (ANDERSSON, 1977).

Os principais mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase hidrossalina ocorrem através da regulação da ingestão e excreção da água e do sal, assim como pelas suas distribuições adequadas nos compartimentos líquidos intracelulares (LIC) e dos compartimentos líquidos extracelulares (LEC) do corpo (JOHNSON, 2007).

Contudo, por mais que a água exerça uma função importante para manter a homeostase líquida, uma vez que as alterações na osmolalidade destes compartimentos fazem com que a água se movimente através das membranas celulares para equilibrar a osmolalidade do citoplasma bem como do LEC (STRANGE, 2004; JOHNSON, 2007), o sódio, por sua vez, exerce um papel fundamental na manutenção do volume e composição dos compartimentos líquidos corporais, tanto do LIC quanto do LEC sendo considerado, dessa maneira, o principal determinante da osmolalidade (DANIELS; FLUHARTY, 2004; MASAHARU, et al., 2013). É importante salientar que os íons de sódio não transitam facilmente pelas membranas celulares, constituindo-se, portanto, em elemento primordial na determinação da passagem da água entre o LIC e o LEC. Dessa forma, a concentração de sódio do LEC, na maioria das vezes, origina os gradientes osmóticos promovendo força osmótica que movem a água para

dentro e fora das células (JOHNSON, 2007). Assim, a quantidade de sódio no LEC precisa ser estritamente regulada, a fim de que o funcionamento ideal de numerosos processos fisiológicos, tais como a condutância iônica através das membranas celulares, excitabilidade neural, filtração glomerular, excreção renal de resíduos aquosos, e a estabilidade da pressão sanguínea, das trocas capilares e do débito cardíaco, ocorra de maneira satisfatória (DANIELS; FLUHARTY, 2004).

Vale ressaltar que os distúrbios da homeostase de sódio podem ocasionar consequências extremamente graves, haja vista que quantidades reduzidas deste íon podem levar ao colapso circulatório, assim como complicações neurológicas, que podem originar sintomas como dor de cabeça, letargia, confusão mental e, em uma condição hiponatremica mais grave, pode levar a convulsões, ao coma e a morte (HARRING; DEAL; KUO, 2014), enquanto que quantidades aumentadas deste eletrólito têm sido associadas à reatividade vascular exagerada e hipertensão (HALL, et al.,1986).

Em mamíferos, apesar dos mecanismos regulatórios tentarem manter a osmolalidade do LEC constante, os seus valores podem variar em torno de seu ponto de ajuste. Esses desvios da homeostase dos líquidos podem decorrer de mudanças nas taxas de ingestão e perda de água (por evaporação ou diurese) e de variações nas taxas de ingestão e excreção de Na^+ (natriurese). Quando isso ocorre, as diferenças entre a osmolalidade do LEC e o ponto de ajuste desejado induzem respostas homeostáticas proporcionais de acordo com o princípio do feedback negativo e positivo. Se, por exemplo, houver hiperosmolaridade do LEC, os osmorreceptores sensoriais geram ativamente sinais para reestabelecer o ponto de ajuste, para isso a ingestão de água seria estimulada e sua excreção urinária inibida, enquanto a ingestão de sódio seria inibida e a excreção urinária seria estimulada (BOURQUE, 2008).

Assim sendo, é possível perceber que o equilíbrio do líquido corporal é determinado por mecanismos comportamentais que incluem a ingestão de sódio e água e pela interação de sistemas efetores fisiológicos que incluem síntese e secreção de mediadores hormonais e atividade autonômica que ditam a taxa de perda de água e sódio principalmente pelos rins. No rim, o hormônio antidiurético (também denominado de vasopressina), atua sobre ductos coletores renais para aumentar a permeabilidade da água e a reabsorção de água. Já a aldosterona, um mineralocorticóide, atua sobre túbulos renais para promover a reabsorção de sódio. As ações destes hormônios são complementadas por inervação simpática nos túbulos renais que, quando ativada, aumentam a reabsorção de sódio e água. Entretanto, é importante salientar que, apesar da relevância que os mediadores hormonais e autonômicos possuem na homeostase hidrossalina, é somente por meio do envolvimento de mecanismos motivacionais

para a ingestão de água (sede) e de sódio (apetite de sódio ou sal) que a restauração de sódio e água excretada no meio ambiente pode ser obtida (JOHNSON, 2007).

2.2 CONTROLE CENTRAL DO APETITE POR SÓDIO

Como já foi mencionado anteriormente, o sódio é íon chave na manutenção da homeostase do líquido corporal, com isso, o seu déficit ou excesso originam reflexos e respostas comportamentais, as quais buscam restaurar o equilíbrio do líquido corporal, e a sua recomposição ao estado normal. Dessa maneira, o excesso de consumo de sódio leva a um aumento de sua excreção urinária, enquanto que um déficit de sódio leva à sua retenção renal e aumento da ingestão. Nesta condição, o padrão de respostas comportamentais observadas são conjuntamente conhecidas como apetite por sódio (NA, et al., 2007), o qual se caracteriza por ser um estado motivacional, atrelado à perda orgânica deste íon, tendo como particularidade a ingestão seletiva de sódio, bem como a aceitação de soluções hipertônicas (na maioria dos casos, NaCl de 0,3 ou 0,5 M) em concentrações que geralmente são aversivas (FITZSIMONS, 1998; ANTUNES-RODRIGUES, et al., 2004). O apetite por sódio é controlado pela ativação de mecanismos facilitatórios ou inibitórios, que determinam quantidade ingerida a fim de que seja mantida uma distribuição adequada nos líquidos corporais (JOHNSON, 2007). Este mecanismo de controle, por sua vez, requer integração no sistema nervoso central (SNC), o qual recebe vários sinais sensoriais e hormonais da periferia, permitindo, assim, que o cérebro processe as informações, “calcule decisões” e conduza as devidas correções através de mudanças autonômicas, endócrinas e comportamentais (JOHNSON, et al, 1999).

O apetite por sódio pode ser modulado por neurotransmissores e/ou neuromoduladores do SNC, a partir dos receptores existentes em diferentes áreas (MCKINLEY; JOHNSON, 2004). Algumas áreas encefálicas têm sido consideradas críticas nestes processos, dentre estas inclui-se: os órgãos circumventriculares (órgão subfornical (SFO), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), a área postrema (AP), o núcleo do trato solitário (NTS), a medula caudal e rostral ventromedial, o núcleo parabraquial (LPBN), o núcleo pré-óptico medial, o núcleo parvocelular paraventricular do hipotálamo, o núcleo paraventricular magnocelular, o núcleo supra-óptico, a amígdala (particularmente os núcleos central (CeA) e medial da amígdala (MeA), o núcleo da estria terminal e o hipotálamo lateral (JOHNSON, 2007).

As informações viscerais, a partir das alterações na pressão sanguínea, detectadas pelos barorreceptores carotídeos e aórticos, e as variações no volume sanguíneo, detectados pelos receptores cardiopulmonares presentes nas grandes veias e nos átrios chegam ao cérebro e ativam vias que se projetam principalmente do núcleo do trato solitário (NTS) para o núcleo parabrancial (PBN) de onde partem vários axônios para estruturas prosencefálicas que participam dos mecanismos regulatórios do apetite por sódio (ANTUNES-RODRIGUES, 2004, DANIELS; FLUHARTY, 2004; KRAUSE; SAKAI, 2007). A angiotensina (ANG) circulante, por sua vez, atua sob a forma de angiotensina II no órgão subfornical (SFO). Esses neurotransmissores conseguem agir nessas áreas, porque esses órgãos circunventriculares (CVOs) possuem, em particular, uma barreira encefálica diferenciada, constituída por um endotélio com capilares fenestrados (MCKINLEY, et al., 2003), os quais, por sua vez, permitem a passagem de substâncias de elevado peso molecular do plasma para o parênquima cerebral (ENGELHARDT, 2003) e expõem receptores para renina e angiotensina.

Além disso, as mudanças na osmolaridade extracelular, a partir das alterações da concentração de sódio são detectadas através dos receptores específicos para sódio e/ou osmorreceptores localizados na cavidade orofaríngea, no trato gastrointestinal, no fígado, próximo ao espaço portal, e nos rins. Essas alterações também são detectadas pelas estruturas periventriculares, como o órgão subfornical (SFO) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), as quais ativam projeções para o núcleo pré-óptico (MPO) com o intuito de que essas mudanças sejam contornadas (ANTUNES-RODRIGUES, 2004; JOHNSON, 2007; BOURQUE, 2008). Uma característica fundamental do SFO para a detecção das alterações das concentrações de sódio plasmático é a presença dos canais de sódio (Na_x) nas células endimárias eastrócitos (HIYAMA, et al., 2002; WATANABE, et al., 2006).

Vale ainda ressaltar as vias inibitórias dos mecanismos da sede e da ingestão de sódio, as quais são originadas na área postrema (AP) e núcleo do trato solitário (NTS) que ascende do núcleo parabrancial lateral (LPBN) para regiões prosencefálicas, que utilizam a serotonina (5-HT) como neurotransmissor. Esta via é importante, pois ela limita a ingestão excessiva de água e sódio, dessa forma impedindo a expansão do volume de sangue ou a hiperosmolaridade (JOHNSON, 2007). O complexo amígdaloide tem importante contribuição neste circuito especialmente no controle dos comportamentos associados ao apetite por sal (JOHNSON, 2007). A natureza das informações de entradas hormonais e neuronais, assim como a suas vias de integrações responsáveis pela geração do apetite por sódio são apresentados na figura 01 abaixo, a qual enfatiza, como já visto acima, que as informações das entradas inibitórias e excitatórias advindas da periferia derivadas dos barorreceptores

arteriais e cardiopulmonares e outros receptores viscerais são transportados por nervos aferentes e se projetam até o NTS e ascende para o LPBN, bem como as informações dos níveis de Angiotensina II e os níveis plasmáticos de sódio são detectados por sua vez pelo SFO, e essas informações hormonais são posteriormente passadas para estruturas ao longo do OVLT e MPO e as entradas vindas da justaglomerular (JG), sistema nervoso simpático (SNS) expandem-se para o núcleo da estria terminal (BTS) e a amígdala.

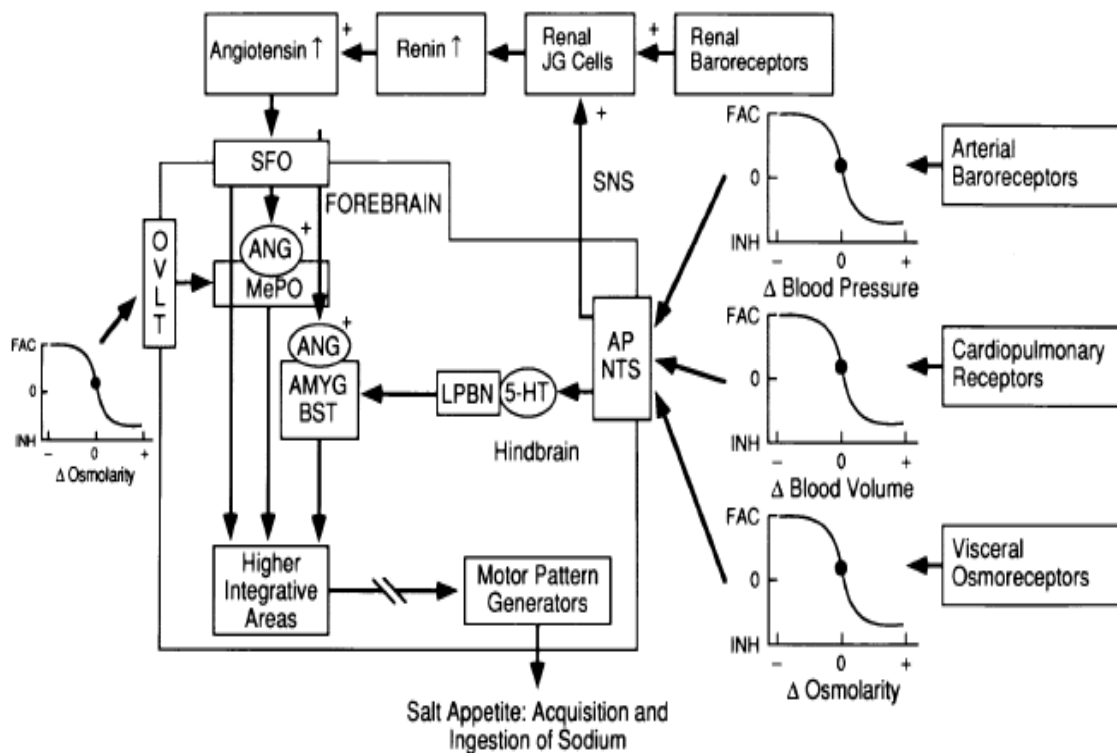


Figura 01: Natureza das informações de entradas hormonais e neuronais no cérebro derivadas da periferia visceral e as vias neurais centrais que medeiam à integração de sinais sensoriais para a geração do apetite por sal. Legendas: OVLT, Órgão vasculoso da lâmina terminal; SFO, Órgão subformical; ANG, Angiotensina; MePO, Núcleo pré-ótico; AMYG, Amígdala; BST, Núcleo da estria terminal; LPBN, Núcleo parabraquial lateral; 5-HT, Serotonina; AP, Área postrema; NTS, Núcleo do trato solitário (Johnson, 2007).

Uma série de estudos com lesões e estimulação elétrica de núcleos amigdalóides foi pioneira em mostrar o envolvimento do complexo amigdalóide no controle hidrossalino. Gentil et al., (1968) mostrou que lesões bilaterais do núcleo corticomedial da amígdala aumentam a ingestão de solução salina hipertônica e de água, enquanto que lesões envolvendo as áreas laterais e mediais diminuem. Indicando, desta forma, que os núcleos corticomediais parecem exercer um papel inibitório, enquanto que os núcleos laterais e mediais exercem

papel estimulatório no controle da ingestão de água e sal. Saad et al., (1994) revelou que lesões químicas de corpos celulares localizados na área corticomédial da amígdala aumentam a ingestão de água e sal. Isso indica que, além das fibras de passagens, corpos celulares desta região amigdalóide participam do controle da ingestão de água e sal.

2.3. O COMPLEXO AMIGDALOIDE E O NÚCLEO CENTRAL DA AMÍGDALA (CeA)

O complexo amigdalóide, comumente conhecido como amígdala, é uma estrutura subcortical composta por mais de 12 sub-núcleos interconectados e alinhados no lobo temporal, com diferentes padrões de conexões de entrada e saída com outras partes cerebrais (WHALEN; PHELPS, 2009; JANAK; TYE, 2015). Ele é formado por três regiões principais: a amígdala basolateral, que engloba os núcleos basal, lateral e basal acessório; a amígdala cortical, a qual se constitui do núcleo cortical e do trato olfatório lateral; e a amígdala centromedial, é formada dos núcleos medial e central, como pode ser observado na figura 02 abaixo. Além desses núcleos, existem outros que não se adequam em nenhuma dessas classificações, sendo eles: os núcleos intercalados; a área amigdalohipocampal; a área amigdalóide anterior; e a amígdala estendida (integração da amígdala centromedial com o núcleo do leito da estria terminal (BST)) (SAH, et al., 2003; McDONALD, 2003).

O núcleo medial da amígdala (CeA), por sua vez, fica situado na porção dorsomedial do complexo amigdalóide, limitado lateralmente pelo complexo basolateral, dorsalmente pelo globo pálido e medialmente pela estria terminal (SAH, et al., 2003). Esse núcleo apresenta quatro divisões: a subdivisão capsular, subdivisão lateral, subdivisão intermediária e subdivisão medial, essa arquitetura organizacional também pode ser notada na figura 02 (MCDONALD, 1982).

O CeA é a principal região de saída do complexo amigdalóide (FUDGE, et al., 2009) e, embora ele seja dividido em quatro regiões, o mesmo apresenta duas regiões principais: a subdivisão lateral e a subdivisão medial, as quais têm interconexões específicas (PRICE, et al., 1987, DEOLMOS, 1990, MARTIN, et al., 1991). A subdivisão lateral do núcleo envia projeções unidirecionais para a subdivisão medial do núcleo, e, portanto, a subdivisão lateral é considerada um modulador intrínseco da subdivisão medial (PASCOE; KAPP, 1985, JOLKKONEN; PITKANEN, 1998, CASSELL, et al., 1999, DUMONT, et al., 2002, HUBER, et al., 2005). Ademais, a subdivisão lateral também envia projeções restritas para o núcleo parabraquial lateral e ao núcleo do leito da estria terminal. A subdivisão medial, por sua vez, envia amplas projeções para fora da amígdala, abrangendo as regiões do tálamo da linha

medial, hipotálamo lateral e tronco cerebral (HOPKINS, 1975, PRICE; AMARAL, 1981, KITA; OOMURA, 1982, CASSELL, et al., 1986, GRAY; MAGNUSON, 1987, 1992, FUDGE; HABER, 2000).

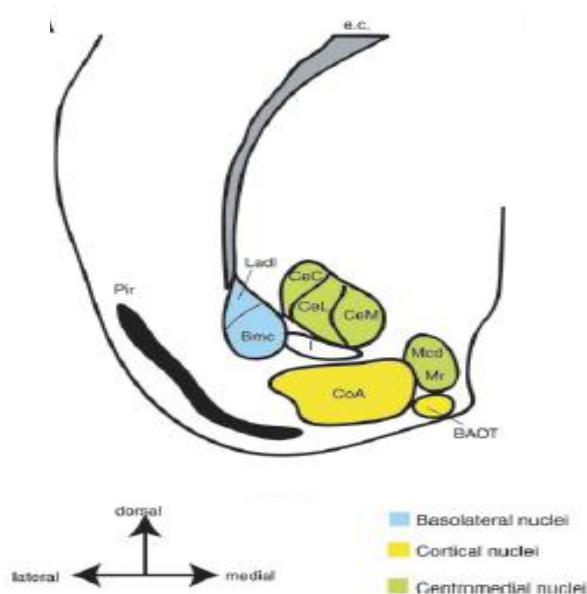


Figura 02: Núcleos do complexo amigdalóide do rato. Seções coronais desenhadas da região Rostral. Os diferentes núcleos são divididos em três grupos como descrito no texto. As áreas em azul correspondem ao grupo basolateral, áreas em amarelo correspondem ao grupo cortical e áreas em verde correspondem ao grupo centromedial. Legendas: E.c., cápsula externa; Ladl, subdivisão medial da amígdala lateral; Sr., subdivisão rostral da amígdala medial; Pir, córtex piriforme; S.t. stria terminalis (*Figura adaptada de SAH, et al., 2003*).

Esse complexo apresenta múltiplas e distintas conexões aferentes e eferentes, muitas delas bidirecionais. Entre as principais áreas de conexão da amígdala pode-se citar áreas corticais, talâmicas, hipotalâmicas e do tronco encefálico, sendo que os primeiros fornecem as informações das áreas sensoriais e dos sistemas de memória e os últimos as informações das regiões envolvidas nos controles homeostáticos (MCDONALD, 1998; PITKANEN, 2000).

A amígdala é uma região cerebral considerada como um ponto chave integrador das informações sensoriais e afetivas advindas das regiões corticais e talâmicas do cérebro (LEDOUX, 2000). Ela desempenha um papel decisivo na mediação de comportamentos relacionados ao medo (DAVIS, 2000; LEDOUX, 2000). Assim como em outros mecanismos neurais relacionados com as emoções e afetividade, cognição social, incluindo a aprendizagem, atenção e a tomada de decisões complexas (FITZGERALD, et al., 2006; OCHSNER, et al., 2002, BZDOK, et al., 2013; ADOLPHS, 2010; MORRIS, et al., 2002; HSU, et al., 2005; OUSDAL, et al., 2014). E, ainda, a amígdala é considerada extremamente

importante para a neurociência clínica e psiquiátrica, devido a sua inter-relação com disfunções do humor, como ansiedade e depressão (LEPPANEN, 2006), bem como uma variedade de transtornos psiquiátricos como síndrome do pânico (WIEST, et al., 2006; NARDI, 2009), distúrbios alimentares (LEMOLO, et al., 2015; BANG, et al., 2016), e estresse (FOWLER, et al., 2017).

Tem sido também demonstrado que diferentes núcleos amigdaloides participam da regulação central do equilíbrio hidroeletrólítico e de comportamentos motivados para procura e consumo de sódio. O desempenho dessas funções depende de suas conexões com áreas tais como: hipotálamo, núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, área postrema, órgão subfornical, área septal e outras (PRICE, et al., 1987; JOHNSON; THUNHORST, 1997; JOHNSON, et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que lesões eletrolíticas bilaterais no CeA suprimem a ingestão diária de NaCl em ratos sódio depletados, tratados com injeções de renina intracerebroventricular (icv), desoxicorticosterona (DOCA) ou yohimbina (antagonista de adrenoreceptores α_2) subcutâneo, sugerindo que mecanismos facilitadores importantes para a ingestão de sódio estão presentes no CeA (GALAVERNA, et al., 1992; ZARDETTO-SMITH, et al., 1994). Andrade-Franzé, et al. (2010) mostraram em seu estudo, que em ratos com lesões bilaterais no CeA, também canulados bilateralmente no núcleo parabraquial lateral, os quais receberam injeções bilaterais de muscimol (agonista do receptor GABAérgico), tiveram uma ingestão de água e NaCl diminuída, indicando que o bloqueio de neurônios de LPBN com muscimol depende da integridade do CeA, visto que os mecanismos facilitadores presentes no CeA são essenciais para a ingestão de água e sal que surge após o bloqueio dos mecanismos inibitórios do LPBN com muscimol. E, ainda, dados do nosso laboratório mostram que receptores serotoninérgicos 5HT₃ e 5HT₄ presentes tanto na CeA quanto na MeA participam do controle do apetite por sal (LUZ, et al., 2006, 2007).

2.4. HISTAMINA E AS VIAS HISTAMINÉRGICAS

No começo do século passado, foi reconhecida a participação da histamina periférica nas respostas alérgicas e inflamatórias. No entanto, apenas na década de 1950, foi sugerido pela primeira vez o papel da histamina como neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central (SNC) (HAAS; PANULA 2003, HAAS, et al., 2008, BLANDINA, et al., 2012).

A histamina (2-[4-imidazolil]etilamina) é uma amina biogênica encontrada em muitos tecidos vivos, sendo considerada um constituinte normal do corpo com múltiplos efeitos em vários órgãos de mamíferos e invertebrados (DALE, et al., 1919). Essa amina é produzida e liberada por diversas células humanas, incluindo os basófilos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células enterocromafínicas e neurônios histaminérgicos. Elas são estocadas em vesículas ou grânulos, e liberadas quando estimuladas (MAINTZ; NOVAK, 2007; JUTEL, et al., 2005).

A histamina neuronal é produzida por neurônios localizados exclusivamente no núcleo tuberomamilar (TM) situado no hipotálamo posterior (BRABANT, et al., 2010) e se distribui difusamente por todo o cérebro. As principais áreas terminais das projeções histaminérgicas, assim como a distribuição dos seus três receptores, são ligeiramente diferentes entre as diversas espécies, mas se difundem essencialmente em todas as áreas do CNS, como mostrado na figura 03 (INAGAKI, et al., 1988; PANULA, et al., 1989). Nos mamíferos, a amígdala, o córtex cerebral, a substância negra e o corpo estriado, hipocampo e tálamo recebem inervações histaminérgicas que podem ser de moderadas a densas. O tronco encefálico e a medula espinal também recebem projeções histaminérgicas TM (HASS; PANULA, 2003).

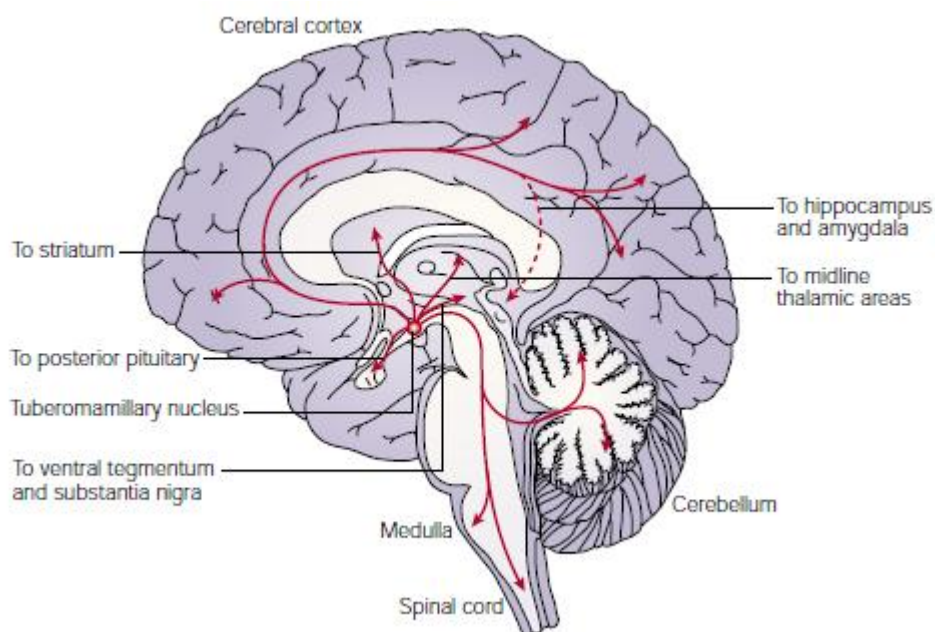


Figura 03: O sistema histaminérgico no cérebro humano: origem e projeções (HASS; PANULA, 2003).

A taxa de síntese de histamina, diferentemente das outras aminas biogênicas, é determinada pela biodisponibilidade do seu precursor: a L-histidina que acessa o sistema nervoso central através dos transportadores de L-aminoácidos (KOLLONITSCH, et al., 1978). Dessa forma, para as moléculas de histamina serem sintetizadas, o transportador de L-aminoácido traz a L-histidina para os neurônios, onde em seu citoplasma ela é descarboxilada pela enzima específica histidina descarboxilase (HDC), em histamina. A seguir, ela é levada para o interior da vesícula sináptica pela proteína vesicular transportadora de monoaminas tipo 2 (VMAT-2) . (SCHWARTZ, et al., 1991; EIDEN, et al., 2003). Essas vesículas situam-se, em especial, nas varicosidades axônais e, assim, após a chegada dos potenciais de ação, a histamina é liberada (KUHAR, et al., 1971; HAYASHI, et al., 1984; MERICKEL, et al., 1995; ERICKSON, et al., 1996; DIEWALD, et al., 1997; WEIHE, et al., 2000). Na fenda sináptica, a histamina pode ser metilada pela enzima histamina N-metiltransferase (HNMT), que está localizada pós-sinápticamente e em células gliais. O produto final dessa metilação é a tele-metil-histamina, um metabólito que não apresenta atividade biológica similar à histamina (SCHWARTZ, et al., 1991). A tele-metil-histamina no cérebro ainda sofre uma desaminação oxidativa através da monoamina oxidase (MAO-B) em ácido t-metil-imidazoleacético (LIM, et al., 1993; PRELL, et al., 1988; SCHWARTZ, et al., 1991). Na ausência de um sistema de absorção de alta afinidade para a histamina, essa metilação no espaço extracelular é o principal mecanismo de inativação da histamina. É importante ressaltar que a taxa de renovação para a histamina neuronal é bastante alta, e sua meia-vida, que em geral dura cerca de 30 minutos, pode mudar rapidamente dependendo da atividade neuronal (SCHWARTZ, et al., 1991). A figura 04 abaixo mostra o desenho esquemático da síntese e degradação da histamina.

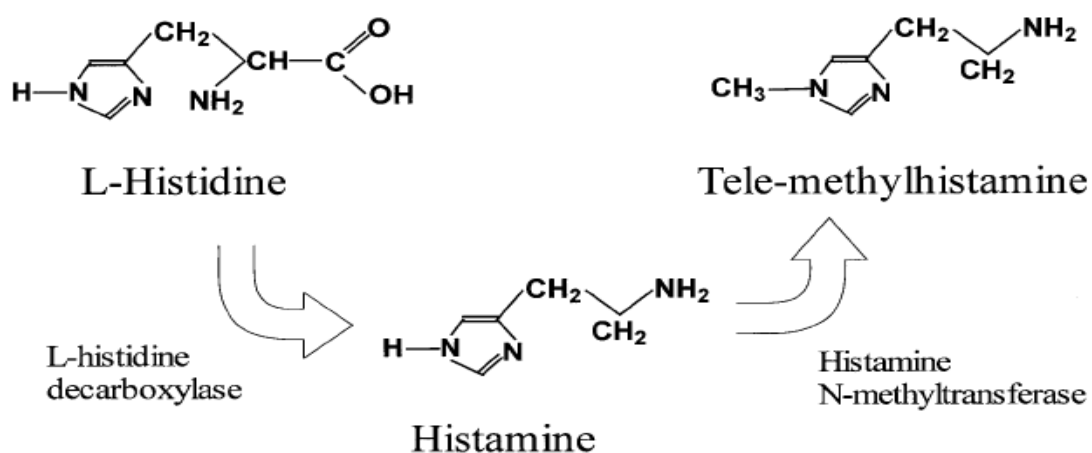


Figura 04: Formação e degradação da histamina (BROWN, et al., 2001).

A histamina exerce a sua função através da ativação dos receptores histaminérgicos classificados em: H₁, H₂, H₃ e H₄, os quais já estão bem descritos na literatura, entretanto, apenas três deles (H₁, H₂ e H₃) são amplamente expressos no cérebro (HAAS; PANULA, 2003; HAAS, et al., 2008). Esses receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G regulatória (HILL, et al., 1997; HAAS, et al., 2008). Eles apresentam sete alças transmembranares com domínios prototípicos que determinam: a especificidade a agonistas (LEURS, et al., 2002; LIM, et al., 2005; BAKKER, et al., 2007) acoplamento da proteína G (SMIT, et al., 1996; BAKKER, et al., 2001; GBAHOU, et al., 2003; BAKKER, et al., 2004), modificações covalentes (p.ex. fosforilação por proteína quinases), sensibilização e dessensibilização dos receptores (p.ex. internalização induzida por agonistas (KURAMASU, et al., 2006).

Os receptores histaminérgicos H₁ são os principais responsáveis pelos efeitos sedativos dos anti-histamínicos (BROWN, et al., 2001). Eles modulam uma variedade de funções fisiológicas, tais como ciclo sono-vigília, controle do apetite, aprendizado e memória, estresse, convulsão e emoção (BROWN, et al., 2001; WATANABE; YANAI, 2001; HAAS; PANULA, 2003). Esses receptores apresentam uma ampla distribuição no SNC, sendo comumente encontrados no córtex, hipocampus, amígdala, hipotálamo, tálamo, corpo estriado e no cerebelo (LINTUNEN, 1998).

A ativação desses receptores resulta na estimulação da atividade da enzima fosfolipase C, que induz a formação dos segundos mensageiros, diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃). Os trifosfatos de inositol, por sua vez, contribuem para o aumento dos níveis de cálcio intracelular, responsáveis pela atividade do trocador de Na⁺/Ca²⁺. A enzima fosfolipase C, ainda estimula a produção dos segundos mensageiros retrógrados: ácido araquidônico e óxido nítrico, sendo que este último se comporta como o neuromodulador da atividade pré-sináptica. Além disso, a proteína G ativada pelo receptor H₁ promove o bloqueio da abertura dos canais de K⁺ de dois poros, responsáveis pela hiperpolarização, o que conserva um neurônio em estado ativado por um período prolongado. Dessa forma, os efeitos da produção desses segundos mensageiros, a partir da ativação dos receptores H₁ culminam em uma despolarização celular acentuada (BROWN, et al., 2001; HASS; PANULA, 2003; SILVEIRA, 2007; HASS, et al., 2008; PANULA; NUUTINEM, 2013).

Os receptores histaminérgicos H₂, a nível periférico, são os principais responsáveis pela estimulação da secreção de ácido gástrico (HILL, et al., 1997). Com o desenvolvimento de diversos agonistas [4-(S)-metilhistamina, dimaprit, amamina e impromidina] e antagonistas (burimamida, cimetidina, ranitidina, tiotidina e famotidina) desses receptores

como alta seletividade, foram demonstradas outras ações biológicas reguladas por este receptor, tais como: relaxamento das vias aéreas (EYRE; CHAND, 1982) e músculo liso vascular (BEAVEN, 1982; OTTOSON, et al., 1988), regulação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos no músculo atrial e ventricular direito, respectivamente, inibição da capacidade de resposta quimiotáctica basófila (LICHTENSTEIN; GILLESPIE, 1975), e diferenciação de células leucêmicas promielocíticas em granulócitos maduros (SEIFERT, et al., 1992). Esses receptores também estão presentes no SNC e apresentam ampla distribuição incluindo: gânglios da base e em algumas áreas do sistema límbico, como a formação hipocampal e amígdala. Entretanto, apresentam baixa distribuição nos núcleos septais, hipotalâmicos e talâmicos (BROWN, et al., 2001).

A ativação desses receptores no SNC resulta na estimulação da adenilato ciclase e indução do aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). O AMPC uma vez aumentado, ativa a proteína cinase A (PKA) e esta, quando ativada, promove a transcrição de genes e a tradução de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) em proteínas, assim como promove o bloqueio da condutância de canais de K^+ ativados pelo influxo de Ca^{+2} , os quais são indispensáveis para causar a repolarização e levar ao prolongamento da hiperpolarização pós-potencial de ação nestes neurônios. Além disso, a proteína quinase A, quando ativada, possibilita que a despolarização neuronal subsequente ocorra de maneira mais facilitada, uma vez que a mesma bloqueia a condutância dos canais de K^+ ativados pelo influxo de Ca^{+2} , levando assim a ocorrência da excitação neuronal (BROWN, et al., 2001; HASS; PANULA, 2003; SILVEIRA, 2007; HASS, et al., 2008; PANULA; NUUTINEM, 2013).

Já os receptores histaminérgicos H_3 atuam como autoceptores controlando a síntese e a liberação de histamina neuronal (ARRANG, et al., 1983) e como heteroceptores modulando a neurotransmissão serotoninérgica (SCHLICKER, et al., 1988), noradrenérgica (SCHLICKER, et al 1989), colinérgica (CLAPHAM; KILPATRICK, 1992) e dopaminérgica (SCHLICKER, et al., 1993) e liberação de vasopressina (DOGTEROM, et al., 1976; KJAER, et al., 1994). Esses receptores foram identificados em dendritos e terminais de neurônios localizados no núcleo acumbente, núcleo estriado, substância negra, hipocampo, amígdala, córtex e cerebelo. A ativação dos receptores H_3 causa a inibição do adenilato ciclase, o que prejudica a produção do segundo mensageiro AMPC, tornando-a reduzida. Ademais, a ativação da proteína G inibitória também reduz a atividade dos canais de Ca^{+2} de alta voltagem, o que afeta a neurotransmissão (BROWN, et al., 2001; HASS; PANULA, 2003; SILVEIRA, 2007; HASS, et al., 2008; PANULA; NUUTINEM, 2013).

Os receptores histaminérgicos H₄ foram os receptores mais recentemente descobertos. Estes apresentam uma grande semelhança, tanto molecular quanto farmacológica, com os receptores H₃ (GBAHOU, et al., 2006). Ele é expresso principalmente em células dos tecidos periféricos, como o sangue, baço, pulmão, fígado e intestino (BREUNIG, et al., 2007; MORGAN, et al., 2007), no entanto, já foi detectada a presença dos receptores H₄ em diversas áreas do cérebro, tais como no cerebelo, corpo caloso, córtex pré-frontal e tálamo, tanto em humanos, quanto em ratos. Contudo, este receptor encontra-se em alta densidade na medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal (CONNELY; COLS, 2009). Vale salientar, todavia, que o seu papel funcional no CNS ainda não foi bem estabelecido (STRAKHOVA, et al., 2009).

Como salientado acima, os receptores histaminérgicos estão distribuídos por todo o complexo amigdalóide. Porém, mesmo sabendo-se que esse complexo é uma das principais regiões cerebrais no controle do apetite específico por sódio, e que esses receptores, em especial o H₁ e H₂, estão presentes nos subnúcleos da amígdala, incluindo o CeA, não se conhece o papel destes receptores no controle do apetite por sódio, reforçando, nesse sentido, a necessidade da realização de mais estudos sobre as vias histaminérgicas. Com isso, o presente trabalho investigou o papel das vias histaminérgicas centrais no controle do apetite por sódio, tendo como base a hipótese geral de que os receptores histaminérgicos H₁ e H₂ é ativado em condições de depleção de sódio, modulando o apetite por sódio.

3 HIPÓTESES

A depleção de sódio estimula a liberação de histamina no CeA que através da ativação dos receptores H₁ e H₂ modula o apetite por sódio.

3.1 HIPÓTESE TESTE (H1)

3.1.1 Se a ativação endógena dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ estimula a ingestão de sódio, então, o bloqueio desses receptores inibe a ingestão de sódio.

3.1.2 Se o bloqueio dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ inibe a ingestão de sódio devido à alteração da palatabilidade de forma inespecífica, então o bloqueio desses receptores também irá alterar a ingestão de outras soluções palatáveis como a sacarina.

3.1.3 Se o bloqueio dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂ inibe a ingestão de sódio devido a impedimento locomotor, então o bloqueio desses receptores também irá modificar a atividade locomotora geral em teste locomotor específico.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento dos receptores histaminérgicos H₁ e H₂, no núcleo central da amígdala (CeA) sobre a apetite por sal em ratos sódio-depletados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Investigar o papel dos receptores histaminérgicos H₁ presentes no CeA no apetite por sal induzido por depleção de sódio.

4.2.2. Investigar o papel dos receptores histaminérgicos H₂ presentes no CeA no apetite por sal induzido por depleção de sódio.

4.2.3. Verificar o efeito do bloqueio dos receptores histaminérgicos H₁ sobre a ingestão por soluções palatáveis de sacarina.

4.2.4. Verificar o efeito do bloqueio dos receptores histaminérgicos H₂ sobre a ingestão por soluções palatáveis de sacarina.

4.2.5. Verificar o efeito do bloqueio dos receptores histaminérgicos H₁ na atividade locomotora geral.

4.2.6. Verificar o efeito do bloqueio dos receptores histaminérgicos H₂ na atividade locomotora geral.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados, nesse estudo, ratos Wistar machos adultos, pesando entre 250g e 270g, fornecidos pelo Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, mantidos em uma sala com condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação com período de ciclo claro/escuro (7:00 às 18:00h), com água destilada, salina hipertônica (1,5%) e ração *ad libitum* (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, Brasil).

5.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O número de animais utilizados nos experimentos foi determinado por meio do programa BioEstat versão 5.0, considerando 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 com o poder do teste em 90% e alfa de 0,05. De acordo com este cálculo e se baseando nos trabalhos existentes na literatura sobre a mesma temática, consideramos um número mínimo de 12 animais por tratamento. Os protocolos experimentais apresentaram-se em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e os mesmos foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS-UFBA) e foram registrados com o número 055/2014. A porcentagem de erro estabelecida foi de 10%.

5.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Cinco dias antes das sessões experimentais, os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (11,5mg/kg) via intraperitoneal (i.p.) e, logo após, tricotomizados e colocados no aparelho estereotáxico para implante bilateral das cânulas guias no CeA. Para a execução da canulação estereotáxica, foram usadas cânulas guias confeccionadas com agulhas de aço inoxidável com diâmetro de 0.7mm e comprimento padronizado em 15mm e seguidas as seguintes coordenadas estereotáxicas, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998): anteroposterior +1,6mm, lateral – 4,2mm e, vertical –

7,0mm. As cânulas utilizadas na cirurgia central foram fixadas no crânio com acrílico dentário auto-polimerizante.

A seguir, para prevenir a obstrução, as cânulas foram ocluídas com mandris removíveis, confeccionados de fios de aço inoxidável e ao final da cirurgia foi administrado, nos animais, pentabiótico (benzilpenicilina benzatina 24.000UI; benzilpenicilina procaína 12.000UI; benzilpenicilina potássica 12.000UI; diidroestreptomicina base 10 mg estreptomicina base 10 mg - 0,2 ml/rato; I.M.) e antiinflamatório (flunixin meglumina 2,5mg/kg; S.C.), como medidas profiláticas contra infecção, inflamação e dor, e os animais, após o efeito da anestesia, foram acomodados em caixas plásticas individuais.

5.4 HABITUAÇÃO ÀS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

No período pós-operatório (cinco dias consecutivos à cirurgia), os animais foram observados quanto a sinais de dor e desconforto, e medidas paliativas foram tomadas quando necessário. Ainda foram manipulados diariamente, simulando as condições experimentais, no intuito de acostumar os animais ao momento da microinjeção central. Os mandris foram trocados diariamente, evitando também a obstrução das cânulas, assim como as caixas, os bebedouros de água destilada e salina hipertônica (1,5%).

5.5 MICROINJEÇÕES

As microinjeções bilaterais no CeA foram realizadas com auxílio de uma seringa Hamilton de 10 µl conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora 1.0 mm mais longa do que a cânula guia, com os animais acordados em livre movimento em suas caixas. As drogas foram diluídas em salina isotônica estéril e injetadas num volume de 0,2 µL.

As concentrações das drogas histaminérgicas foram escolhidas com base em dados da literatura e em dados prévios do laboratório (KRALY, et al., 1996, LECKLIN; TUOMISTO, 1995, MAGRANI, et al., 2004, 2005, 2006).

5.6 DROGAS

As drogas utilizadas foram as seguintes:

Veículo – cloreto de sódio isotônico (NaCl 0,9%).

Mepiramina – antagonista dos receptores histaminérgicos H₁ (SIGMA) - 200 nmol, 100 nmol e 50 nmol.

Cimetidina – antagonista dos receptores H₂ (SIGMA) - 200 nmol, 100nmol e 50 nmol.

Furosemida (Lasix) – Diurético de alça – 10 mg/kg.

5.7 HISTOLOGIA

Após os experimentos, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca, com salina 0,9% seguida de formol a 10%. Logo depois, os cérebros foram retirados e fixados com a solução de formol a 10% e refrigerados, 24h após a este procedimento, eles foram transferidos para a solução de formol glicosado (formol a 10% mais glicose a 30%) por pelo menos 48h.

Posteriormente, os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura em micrótomo de congelamento no criostato e dispostos em lâminas gelatinadas e colocados na estufa para secagem. Em seguida, os cortes obtidos foram corados com cresil violeta 2% para posterior análise histológica do posicionamento das cânulas. Somente os cortes cerebrais nos quais as duas microinjeções tenham acertado o CeA foram considerados positivos.

5.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.8.1 DEPLEÇÃO DE SÓDIO

Durante os 5 dias de recuperação pós-cirúrgica, os animais foram habituados às condições experimentais e tiveram oferta de água, solução salina (1,5%) e ração *ad libitum*. Vinte e quatro horas antes dos experimentos, os animais receberam uma injeção subcutânea (s.c) de furosemida (Lasix, 10mg/kg, 1ml/rato) e foram colocados em caixas forradas com papel absorvente, as quais foram trocadas constantemente no período de 4h. Durante esse espaço de tempo, a diurese provocada pela furosemida foi monitorada por observação e ao final os animais foram colocados em uma caixa com maravalha e mantidos com dieta livre de sódio (0,001% Na⁺ e 0,33% K⁺) e água destilada por 24h.

No dia subsequente, durante a sessão experimental, os animais pertencentes ao grupo experimental receberam microinjeções de Mepiramina (antagonista dos receptores H₁) ou

Cimetidina (antagonista dos receptores H_2) no CeA nas concentrações de 50, 100 ou 200nmol/0,2µl, e os animais pertencentes ao grupo controle receberam microinjeções de salina isotônica estéril (0,9%) no mesmo volume e nas mesmas condições dos grupos anteriores e 15 minutos após foram oferecidos aos animais os bebedouros graduados contendo água destilada e salina hipertônica (1,5%).

A ingestão do volume de água e de solução salina hipertônica (1,5%) foi monitorada a partir dos 5 minutos após o oferecimento dos bebedouros e perdurou por 120 minutos. Os experimentos foram realizados entre 7:00h e 12:00h e os animais não tiveram acesso à ração durante esse período.

Esse protocolo vem sendo utilizado por vários grupos de pesquisa nesta área, inclusive em estudos anteriores realizados no laboratório de neurociências, como o de Magrani, et al. (2004, 2005, 2006). O uso de diuréticos de alça, como a furosemida, tem sido amplamente empregado em situações experimentais, as quais têm por objetivo estimular o apetite por sódio, dado que esse fármaco promove a perda corporal de água e eletrólitos por inibição seletiva da reabsorção de sódio (Na^+) (IVES, 1998).

Isso é possível devido à sua atuação sobre o sistema de co-transportadores de Na^+ , Cl^- , K^+ , localizado na membrana celular luminal do ramo ascendente da alça de Henle, (HO; POWER, 2010) o que é responsável por causar uma redução no volume do líquido extracelular e nos níveis do sódio (JOHNSON, et al., 1997), resultando na excitação da angiotensina II (ANG II) e a aldosterona (ALDO), que atuam como principais estimuladores do apetite por sódio. Assim, a renina é ativada, e esta, por sua vez, leva à geração de angiotensina II, que serve como um sinal para que a aldosterona seja liberado do córtex adrenal (MORRIS, et al., 2008). Os níveis de angiotensina II e aldosterona são também aumentados durante a privação de sódio na dieta (CURTIS, et al., 2001) por isso a importância de, em protocolos como estes, a utilização da furosemida estar associada com uma dieta hipossódica.

5.8.2 PROTOCOLO DO TESTE DE SOBREMESA

Este protocolo constitui-se no oferecimento de solução sacarina 0,1% aos animais, a fim de averiguar se as microinjeções dos antagonistas histaminérgicos alterariam a preferência dos animais em ingerir uma solução palatável, assim como verificar se o comportamento ingestivo de solução salina hipertônica (1,5%) foi alterado pelos mesmos. O protocolo do

teste de sobremesa já está bem elucidado na literatura, inclusive em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Neurociências (LUZ, et al., 2007; NASCIMENTO, et al., 2012; 2014), no qual, após a cirurgia central, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro e temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$), com bebedouros de água filtrada e ração livre. Por 4 dias consecutivos passa por período de habituação.

Durante esse período, por 5 dias consecutivos, os animais passavam por um momento de habituação com duração de 2h, e, dessa forma, eles eram transferidos para uma caixa teste (caixa com o fundo forrado com um papel branco absorvente), cuja ração era retirada e os animais recebiam dois bebedouros, um deles contendo água filtrada e o outro solução de sacarina 0,1%. Ao final deste momento, o volume dos bebedouros era registrado e os animais recolocados em caixas com maravalha, ração e bebedouro com água filtrada. Entretanto, 24h antes das sessões experimentais, os animais foram privados de água.

No dia do experimento, os animais foram colocados na caixa teste, e aqueles pertencentes ao grupo experimental receberam a administração central dos antagonistas histaminérgicos H_1 ou H_2 na maior concentração (200nmol/0,2 μ l), e os pertencentes ao grupo controle salina isotônica estéril (0,9%). Após 15 minutos, as injeções, os bebedouros com água filtrada e solução sacarina 0,1% foram oferecidos, e o volume ingerido foi anotado a partir de 5 minutos até 120 minutos.

5.8.3 PROTOCOLO DO TESTE DO CAMPO ABERTO

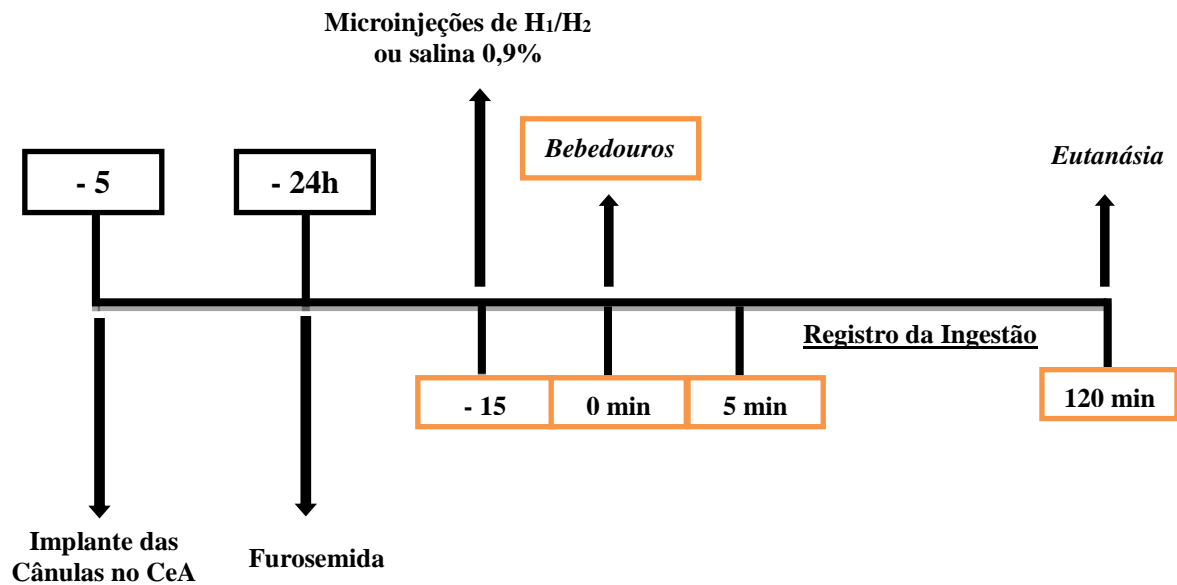
Este teste foi realizado com o intuito de observar o efeito da administração de microinjeções centrais dos antagonistas histaminérgicos H_1 ou H_2 no CeA sobre a atividade locomotora dos animais depletados de sódio. O protocolo deste teste baseia-se na utilização de uma caixa circular de 60 cm de diâmetro e 60 cm de altura com uma abertura superior e o fundo dividido em 8 áreas circulares de igual tamanho (42,43 cm).

Após a cirurgia central, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro e temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$), com bebedouros de água destilada, solução salina hipertônica (1,5%) e ração livre. No dia 4, 24h antes do dia do experimento, os animais sofreram depleção por furosemida combinada com dieta hipossódica. No dia 5, os animais do grupo experimental receberam microinjeções dos antagonistas histaminérgicos na concentração de 200nmol/0,2 μ l, e os animais do grupo controle microinjeções de salina isotônica estéril (0,9%). Após 15 minutos das microinjeções, os animais foram colocados no

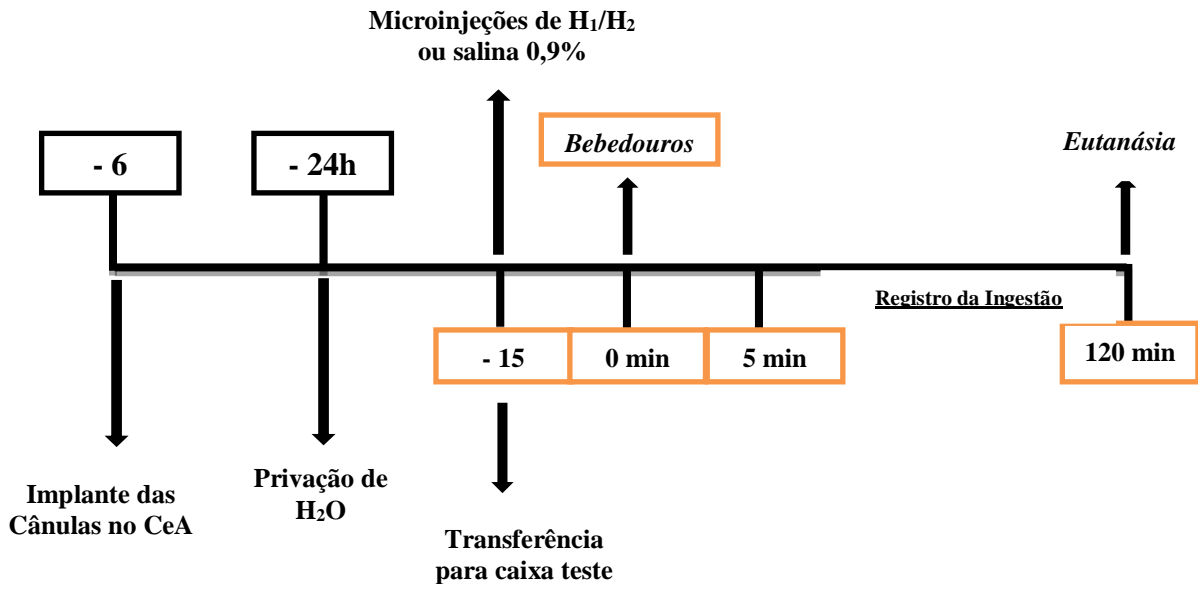
centro da caixa e tiveram o deslocamento quantificado na proporção em que colocavam as quatro patas dentro dos limites de cada área. Este teste teve a duração de 10 minutos.

5.9 DESENHOS EXPERIMENTAIS

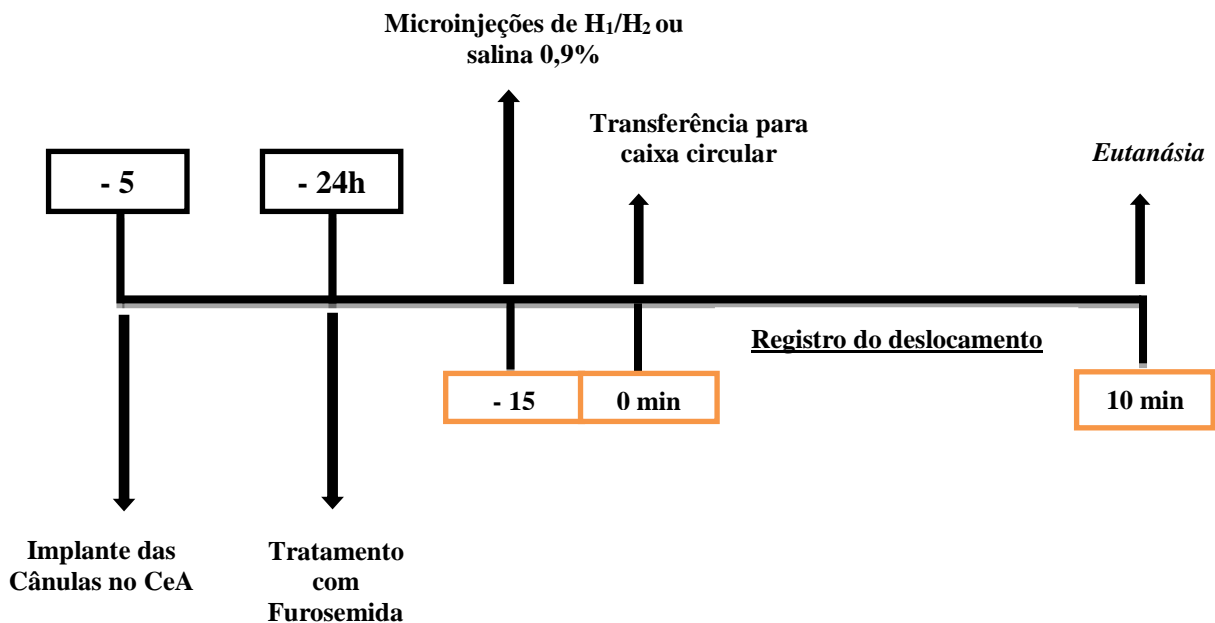
Protocolo Experimental 01 – Efeito das microinjeções dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) ou H₂ (Cimetidina) (50, 100 ou 200nmol/0,2µl) no CeA sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e de água destilada em ratos depletados de sódio.



Protocolo Experimental 02 – Teste de sobremesa: ingestão de solução palatável de sacarina (0,1%) e água filtrada em ratos privados de água por 24 horas após as microinjeções dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) ou H₂ (Cimetidina) na concentração de 200 nmol/0,2 µl no CeA.



Protocolo Experimental 03 – teste do campo aberto: efeito da microinjeção dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) ou H₂ (Cimetidina) na concentração de 200nmol/0,2 µl no CeA sobre a atividade locomotora dos animais após a depleção de sódio.



6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados obtidos foi realizado pelo “software” GraphPad-Prism versão 6.0. Para analisar o efeito de microinjeções de H₁ ou H₂ no CeA sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon e comparar cada tratamento no tempo correspondente com o grupo controle, utilizou-se ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os testes de sobremesa foram analisados por meio do ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. E, por fim, os testes de campo aberto foram avaliados através do teste “t” de Student não pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, e os dados foram apresentados como média e erro-padrão (média \pm SEM).

7 RESULTADOS

Localização das microinjeções de H₁/H₂ ou salina no CeA

Fotomicrografia típica do corte de cérebro situando as cânulas guias no CeA. Somente os cortes cerebrais nos quais as duas microinjeções tenham acertado o CeA foram considerados positivos.

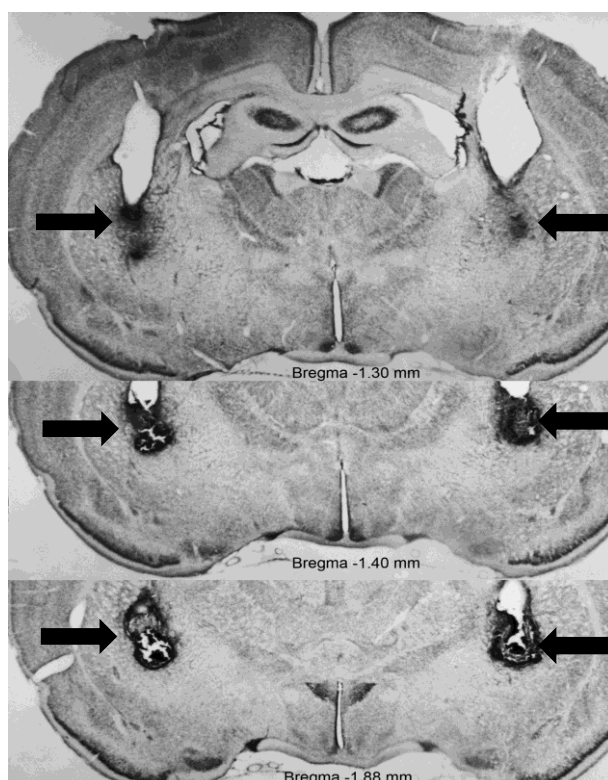


Figura 05: Fotomicrografia do corte do cérebro de rato indicando o local da microinjeção no CeA (setas pretas).

Efeito das microinjeções dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) no CeA sobre a ingestão de salina 1,5% e água em animais depletados de sódio.

A figura 06 apresenta os resultados de ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% (A) e ingestão cumulativa de água (B) em animais que receberam microinjeções do antagonista seletivo para os receptores histaminérgicos H₁, nas concentrações 200nmol/0,2 µL (n=8), 100nmol/0,2 µL (n=9) e 50 nmol/ 0,2 µL (n=8) e o grupo controle que recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL; n=8).

No painel A, observa-se que os animais controles depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% no CeA, exibiram um aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5%. Os animais tratados com Mepiramina apresentaram uma redução na ingestão de salina hipertônica a partir do tempo 10 minutos nas concentrações 200nmol/0,2 µL ($0,6 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal) e 100nmol/0,2 µL ($1,0 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal) quando comparados aos animais do grupo controle ($3,1 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal), mantendo-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($1,2 \pm 0,6$; $2,0 \pm 0,5$; $5,9 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). Além disso, observa-se diferença entre os grupos de tratados com 200nmol/0,2 µL e com 50nmol/0,2 µL de mepiramina a partir do tempo 30 minutos ($1,0 \pm 0,6$; $3,5 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal, respectivamente) até os 120 minutos ($1,2 \pm 0,6$; $4,4 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). Também entre os tempos 60 e 90 houve diferença estatística entre os grupos tratados com 100nmol/0,2 µL ($1,0 \pm 0,5$; $2,0 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal, respectivamente) e com 50nmol/0,2 µL ($4,2 \pm 0,6$; $4,4 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal, respectivamente) de mepiramina. A análise de variância ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto mostra diferença estatística significativa na interação tempos x tratamentos ($F(21, 203) = 5,24$; $p < 0,0001$), entre os tratamentos [$F(3, 29) = 16,53$; $p < 0,0001$], e nos tempos [$F(7, 203) = 50,27$; $p < 0,0001$].

De acordo com os dados observadas no gráfico do painel B, a ingestão de água ficou inalterada até ao final do experimento, tanto nos animais controle ($0,1 \pm 0,1$ ml/100g do peso corporal) quanto nos animais do grupo de tratamento que receberam microinjeções de H₁ no CeA nas concentrações 200 nmol/0,2 µL ($0,1 \pm 0,1$ ml/100g do peso corporal), 100 nmol/0,2 µL ($0,1 \pm 0,1$ ml/100g do peso corporal), e 50 nmol/0,2 µL ($0,1 \pm 0,1$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto mostra que não houve diferença estatística significativa na interação tempos x tratamentos [F

(21, 203) = 0,0; P > 0,9999], entre os tratamentos [F (3, 29) = 0,111; P= 0,9529], e nos tempos [F (7, 203) = 0,0; P > 0,9999].

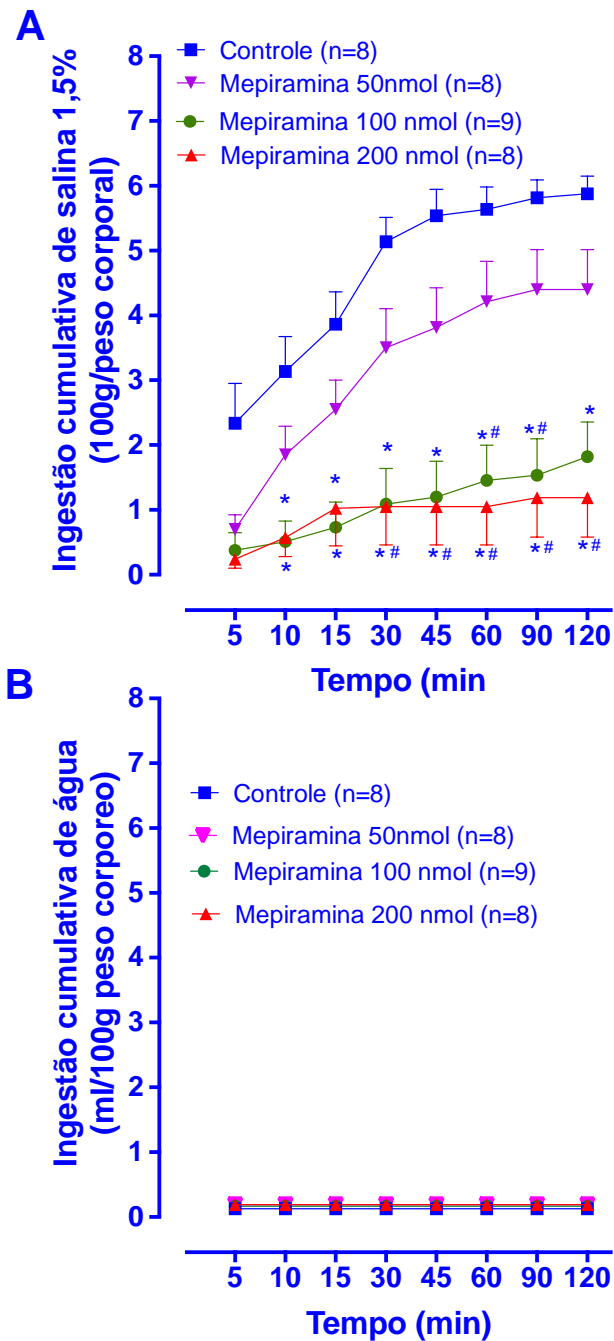


Figura 06: Comparação da Ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% (A) e de água (B) em animais sódio depletados após microinjeções de H_1 no CeA nas concentrações de 200, 100 e 50nmol/0,2 μ L ou salina isotônica 0.9%. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controles e o (#) entre e grupos de tratamento de concentração 50nmol/0,2 μ L. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $p < 0,05$).

Efeito das microinjeções dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₂ (Cimetidina) no CeA sobre a ingestão de salina 1,5% e água em animais depletados de sódio.

A figura 07 apresenta os resultados de ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% (A) e ingestão cumulativa de água (B) em animais que receberam microinjeções do antagonista seletivo para os receptores histaminérgicos H₂, nas concentrações 200nmol/0,2 µL (n=12), 100nmol/0,2 µL (n=12) e 50 nmol/ 0,2 µL (n=14) e o grupo controle que recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL; n=8).

O painel A evidencia que os animais controles depletados de sódio e tratados com salina isotônica 0,9% no CeA, exibiram um aumento significativo na ingestão de solução salina hipertônica 1,5%. Os animais tratados com Cimetidina na concentração de 200nmol/0,2 µL ($2,7 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal) apresentaram uma redução na ingestão de salina hipertônica a partir do tempo 30 minutos, quando comparados ao grupo de tratamento 50nmol/0,2µL ($4,4 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal), do grupo controle ($5,0 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal), sustentando-se assim até o fim da sessão experimental, aos 120 minutos ($3,6 \pm 0,4$; $5,6 \pm 0,2$; $6,0 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). Já os animais tratados com Cimetidina (H₂) na concentração de 100nmol/0,2 µL, também tiveram uma diminuição na ingestão de solução salina hipertônica 1,5%, a partir do tempo 30 minutos ($2,6 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal), quando comparado ao grupo de tratamento 50nmol/0,2µL ($4,4 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal) e ao grupo controle ($5,0 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal) apresentando-se com diferenças estatisticamente diferentes ao grupo de tratamento 50nmol/0,2µL até o tempo 60 minutos ($3,3 \pm 0,4$; $5,3 \pm 0,2$; ml/100g do peso corporal, respectivamente), e ao grupo controle até o tempo 90 minutos ($3,8 \pm 0,5$; $6,0 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de tratamento de concentração 100 nmol/0,2 µL ($3,8 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal) e 50 nmol/0,2 µL ($5,4 \pm 0,2$ ml/100g do peso corporal) no tempo 90 minutos. Assim como, no tempo 120, não houve diferença estatística significativa entre o grupo de tratamento de concentração 100 nmol/0,2 µL ($4,3 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal) e 50 nmol/0,2 µL ($5,6 \pm 0,2$ ml/100g do peso corporal) e o grupo controle ($6,0 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto mostra diferença estatística significativa na interação tempos x tratamentos [F (21, 294) =

7,577; $p < 0,0001$], entre os tratamentos [$F(3, 42) = 7,524$; $p = 0,0004$], e nos tempos [$F(7, 294) = 196,6$; $p < 0,0001$].

De acordo, com as informações contidas no gráfico do painel B, a ingestão de água conservou-se inalterada até ao final do experimento, tanto nos animais controle ($0,0 \pm 0,0$ ml/100g do peso corporal), quanto nos animais do grupo de tratamento de receberam microinjeções de H₂ no CeA nas concentrações 200 nmol/ 0,2 μ L ($0,0 \pm 0,0$ ml/100g do peso corporal), 100 nmol/ 0,2 μ L ($0,0 \pm 0,0$ ml/100g do peso corporal) e 50 nmol/0,2 μ L ($0,0 \pm 0,0$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto, que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos [$F(3, 42) = 0,21$; $P = 0,8873$], na interação tempos x tratamentos [$F(21, 294) = 0,0$; $P > 0,9999$], e nos tempos [$F(7, 294) = 0,0$; $P > 0,9999$].

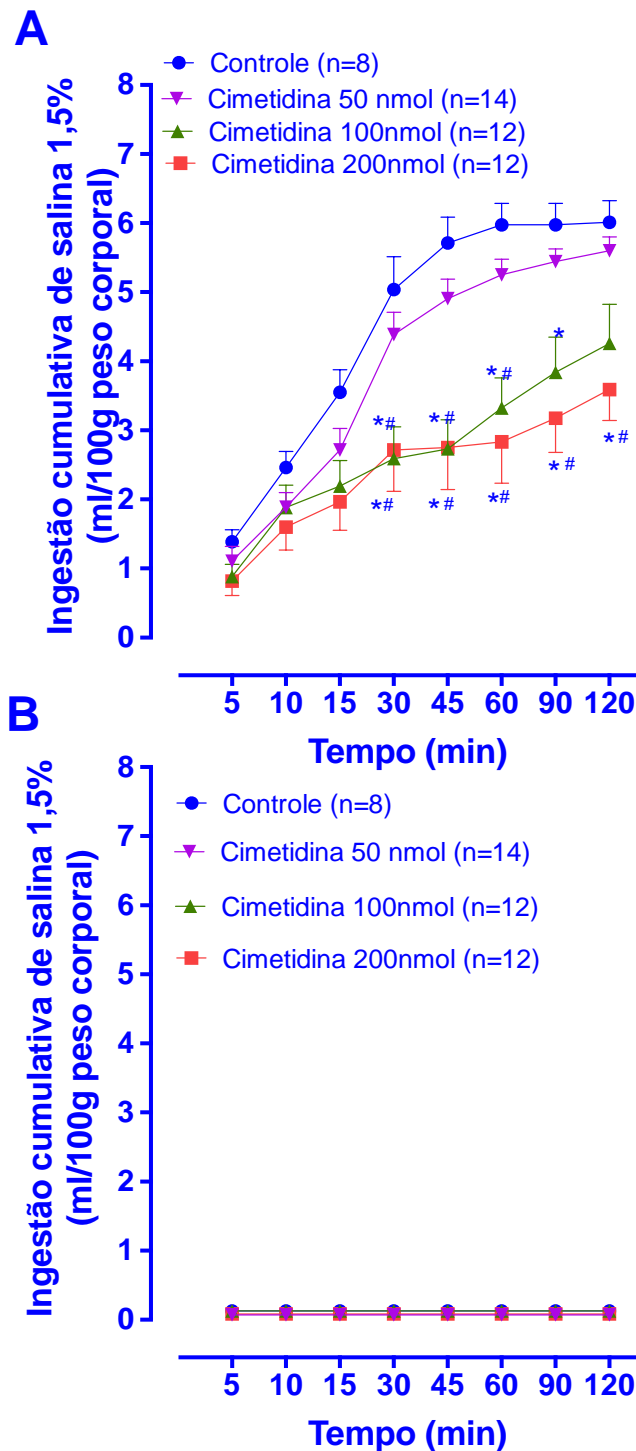


Figura 07: Comparação da Ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% (A) e de água (B) em animais sódio depletados após microinjeções de H_2 no CeA nas concentrações de 200, 100 e 50nmol/0,2 μ L ou salina isotônica 0.9%. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controles e o (#) entre e grupos de tratamento de concentração 50nmol/0,2 μ L. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $p < 0,05$).

Comparação do efeito das microinjeções dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) e H₂ (H₂) no CeA sobre a ingestão de salina 1,5% no tempo 120 min.

A figura 08 apresenta os resultados comparativos da ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5%, entre os animais que receberam microinjeções do antagonista seletivo para os receptores histaminérgicos H₁ e H₂, nas concentrações 200nmol/0,2 µL, 100nmol/0,2 µL e 50 nmol/ 0,2 µL e o grupo controle que recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL) no tempo de 120 minutos. De acordo com os resultados apresentados na figura abaixo, fica evidente que os animais que receberam as microinjeções de H₁ na concentração de 100nmol/0,2 µL apresentaram uma redução significativa na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% quando comparado com o grupo de animais que receberam as microinjeções de H₂ nessa mesma concentração e com o seu respectivo grupo controle. Pode ser observada, também, uma redução ainda mais intensa na ingestão de solução salina hipertônica 1,5% no grupo de animais que receberam as microinjeções de H₁ na concentração de 200nmol/0,2 µL, quando comparado com o grupo de animais que receberam as microinjeções de H₂ nessa mesma concentração e com seu respectivo grupo controle. A análise de variância ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto mostra que houve diferença estatística significativa na interação tempos x tratamentos [$F(3, 68) = 3,277$; $P = 0,0262$], entre os tratamentos [$F(1, 68) = 25,67$; $P < 0,0001$], e entre as concentrações [$F(3, 68) = 25,99$; $P < 0,0001$].

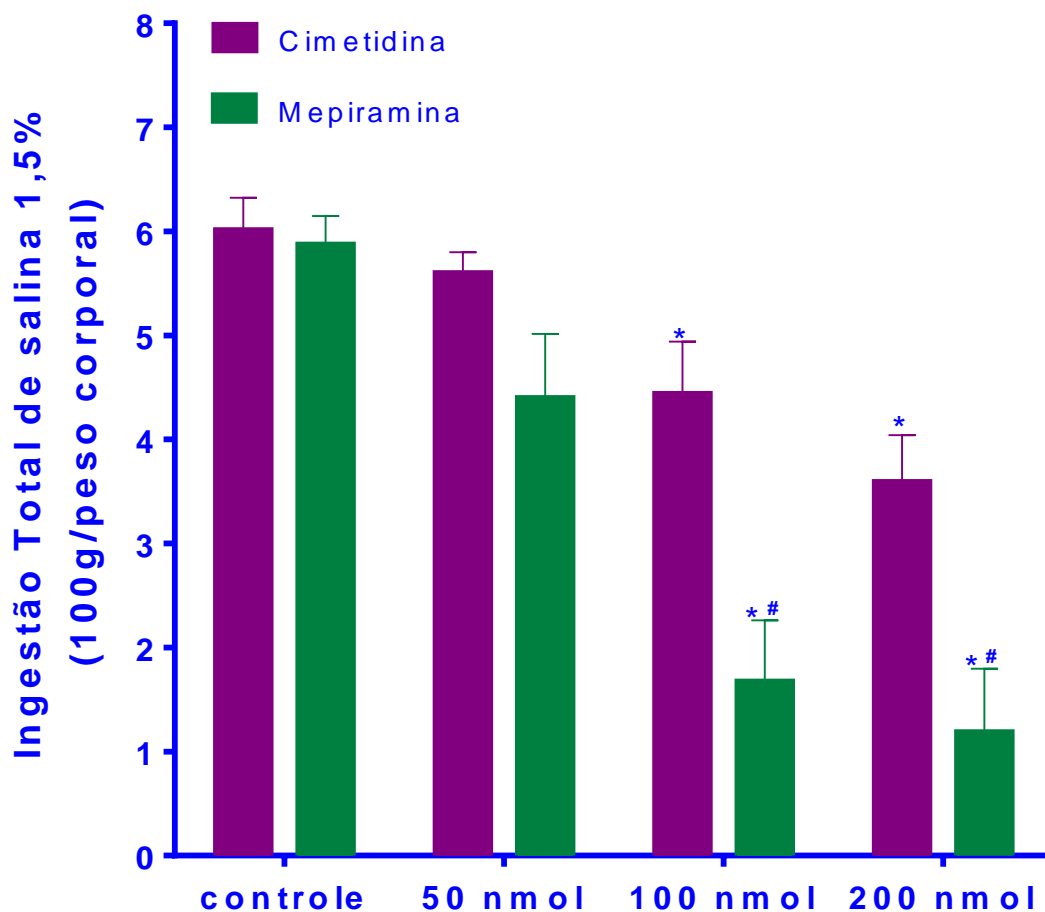


Figura 08: Comparação da Ingestão cumulativa de solução salina hipertônica 1,5% entre os grupos que receberam microinjeções de H_1 e o grupo de animais que receberam microinjeções de H_2 no CeA nas concentrações de 200, 100nmol/0,2 μ L ou salina isotônica 0.9%. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo controles e o (#) em relação aos grupos tratados com cimetidina na concentração de 100 nmol/0,2 μ L. Os dados são apresentados como média \pm EPM (ANOVA *two-way* para medidas repetidas modelo misto, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $p < 0,05$).

Teste de sobremesa em animais privados de água por 24 horas que receberam microinjeções dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) /H₂ (Cimetidina) ou salina 0,9% no CeA.

O teste de sobremesa é importante para averiguar se o efeito do antagonista seletivo para os receptores histaminérgicos H₁ e H₂ no CeA gera uma inibição não específica ou específica na ingestão de solução salina hipertônica 1,5%. A figura 08 expõe os resultados da ingestão de solução sacarina 0,1% e água filtrada em animais que receberam microinjeções de H₁ na concentração 200nmol/0,2 µL (n=7) e o grupo controle que recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL; n=7) (A), bem como a ingestão de solução sacarina 0,1% e água filtrada em animais que receberam microinjeções de H₂ na concentração 200nmol/0,2 µL (n=7) e o grupo controle que recebeu solução salina isotônica 0,9% (0,2 µL; n=7) (B).

O painel A mostra que tanto a ingestão de solução sacarina 0,1% entre o grupo de animais que receberam microinjeções de H₁ no CeA na concentração 200nmol/0,2 µL ($6,6 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal) e o grupo controle ($7,0 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal) foi muito parecido, quanto a ingestão de água destilada entre o grupo de animais que receberam microinjeções de H₁ no CeA na concentração 200nmol/0,2 µL ($1,1 \pm 0,4$ ml/100g do peso corporal) e o grupo controle ($1,2 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal), não havendo dessa forma diferença estatisticamente diferente. Entretanto, houve diferença entre a ingestão de sacarina e água tanto entre os grupos de tratamentos ($6,6 \pm 0,6$; $1,1 \pm 0,4$ ml/100g do peso corporal, respectivamente), quanto entre os grupos controles ($7,0 \pm 0,6$; $1,2 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). A análise dos dados foi realizada por meio da ANOVA *one-way* [$F(3, 22) = 45,39$; $P < 0,0001$].

De acordo com as informações contidas no gráfico do painel B, tanto a ingestão de solução sacarina 0,1% entre o grupo de animais que receberam microinjeções de H₂ no CeA na concentração 200nmol/0,2 µL ($6,6 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal) e o grupo controle ($6,5 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal) foi muito semelhante, quanto a ingestão de água destilada entre o grupo de animais que receberam microinjeções de H₂ no CeA na concentração 200nmol/0,2µL ($0,3 \pm 0,2$ ml/100g do peso corporal) e o grupo controle ($0,7 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal), não havendo dessa forma diferença estatisticamente significativa. Entretanto, houve diferença entre a ingestão de sacarina e água tanto entre os grupos de tratamentos ($6,6 \pm 0,5$; $0,3 \pm 0,2$ ml/100g do peso corporal, respectivamente), quanto entre os grupos controles ($6,5 \pm 0,3$; $0,7 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). A análise dos dados foi realizada por meio da ANOVA *one-way* [$F(3, 34) = 102,9$; $P < 0,0001$].

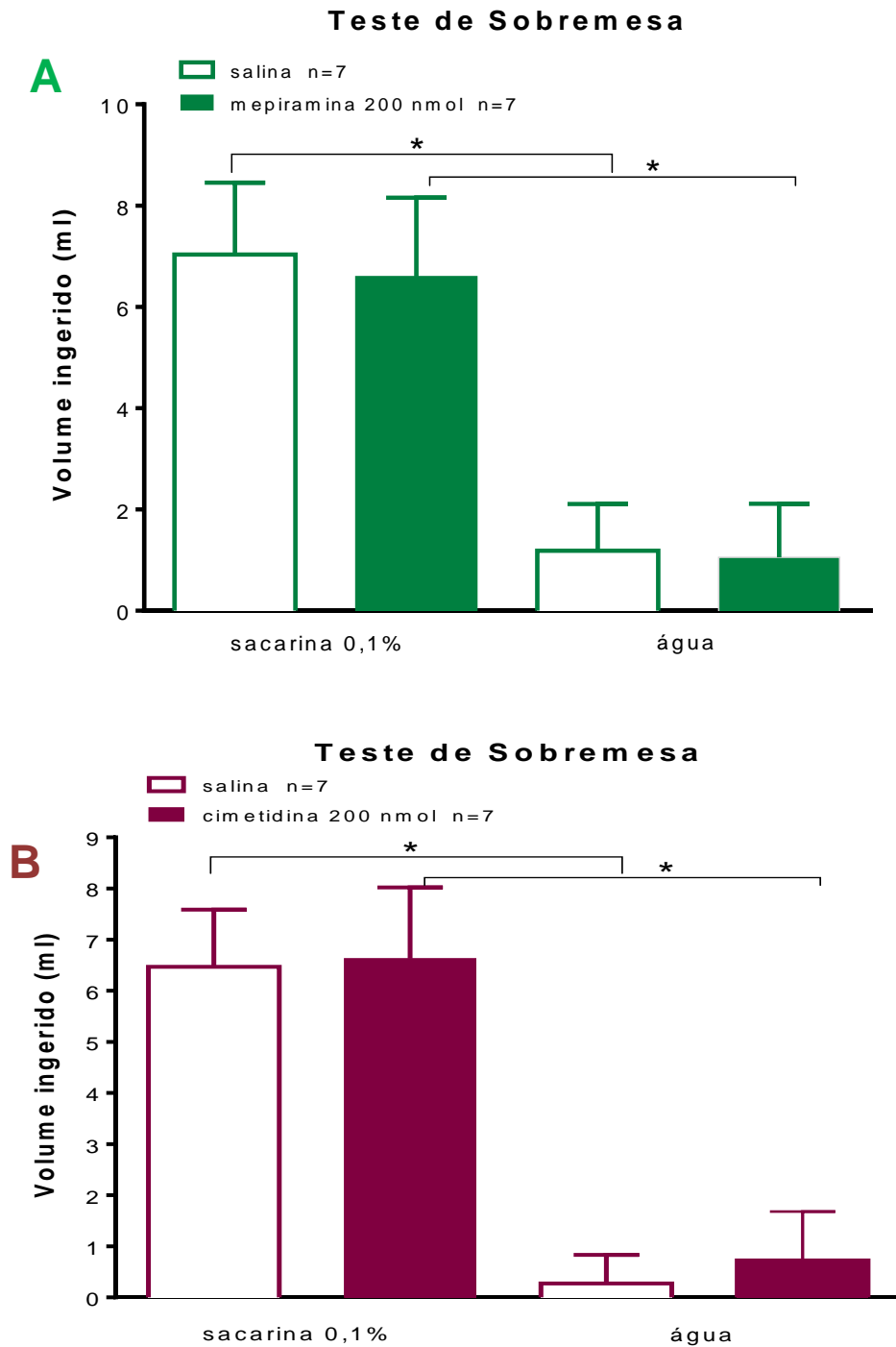


Figura 09: Teste de Sobremesa realizado em animais privados de água por 24 horas e tratados com H₁ (A) e H₂ (B) na concentração de 200nmol/0,2μL no CeA sobre a ingestão total de sacarina 0,1% e de água filtrada. Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; p<0,05).

Teste do campo aberto em animais depletados de sódio que receberam microinjeções dos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₁ (Mepiramina) /H₂ (Cimetidina) ou salina 0,9% no CeA.

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar se a administração do antagonista seletivo para os receptores histaminérgicos H₁ e H₂ geridos nos ratos afetariam de alguma maneira a atividade locomotora desses animais. A figura 09 (A) mostra que tanto os animais que receberam as microinjeções de mepiramina no CeA na concentração 200nmol/0,2 µL (n= 6), quanto o grupo controle que recebeu injeções de solução salina isotônica 0,9% (0,2µL; n= 7) não tiveram a sua locomoção afetada. A análise do teste “t” de Student não pareado indica para este teste [t=0,3589; df=11; 0,4878].

A locomoção também não foi afetada entre o grupo que recebeu as microinjeções de cimetidina no CeA na concentração 200nmol/0,2 µL (n= 5) e o grupo controle que recebeu injeções de solução salina isotônica 0,9% (0,2µL; n= 8) (B). A análise do teste “t” de Student não pareado indica para este teste [t=0,7144 df=11; 0,2869].

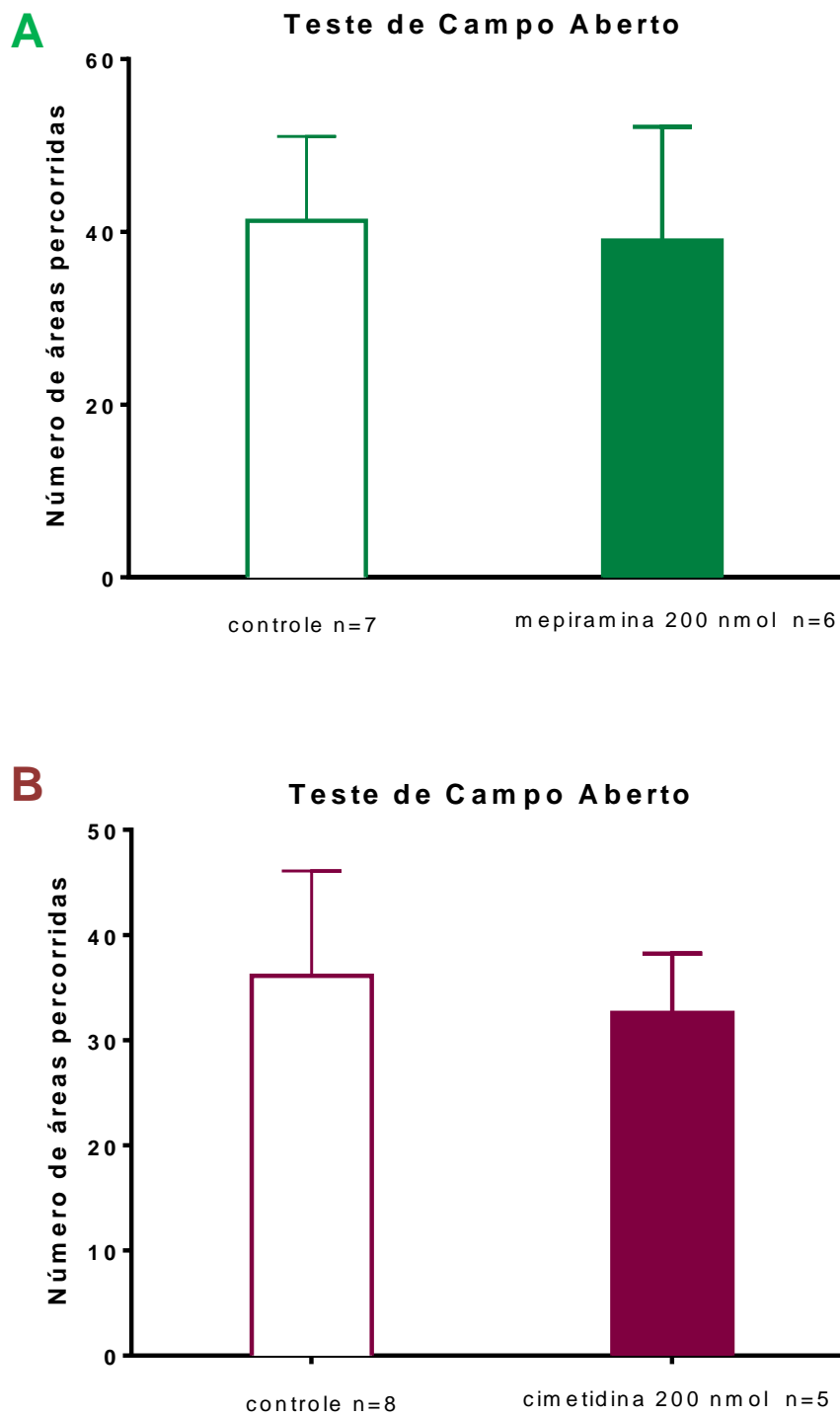


Figura 10: Teste de Campo Aberto realizado em animais depletados de sódio e tratados com H_1/H_2 na concentração de 200nmol/0,2 μ L no CeA. A análise estatística foi feita por meio do teste t de Student não pareado, $p < 0,05$.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se que as microinjeções de mepiramina, antagonista dos receptores histaminérgicos do tipo H₁, e cimetidina, antagonista dos receptores do tipo H₂ no CeA inibem, de maneira significativa, o apetite por sódio em ratos depletados deste íon, confirmando o papel modulatório desses receptores sobre a homeostasia hidrossalina nesta área. Estas respostas não são devidas a qualquer impedimento locomotor ou a alteração inespecífica da palatabilidade.

Outros estudos corroboram os resultados encontrados no presente trabalho, os quais mostraram a participação do CeA no controle do apetite por sódio. De acordo com Covin, et al., (1975), as pesquisas com lesões eletrolíticas atribuíram funções inibitórias e excitatórias a diferentes subáreas da amígdala no controle da ingestão de sódio, fornecendo evidências de um comando hierárquico entre o hipotálamo, amígdala e o septo. Sendo que o CeA tem assumido um papel chave neste controle, visto que ele é considerado o principal núcleo da amígdala que envia aferências para outras partes do encéfalo. Trabalhos semelhantes demonstraram que injeções de DAMGO (agonista μ -opioide) no CeA aumentaram a ingestão de 0,3 M de NaCl, em contrapartida, a administração de CTAP (antagonista μ -opioide), nessa mesma área, reverteu esse efeito (YAN, et al., 2013). Também, Hu, et al. (2015), provaram em seus estudos que as injeções bilaterais de muscimol (agonista do receptor GABAA) no CeA reduziram a ingestão de NaCl em ratos depletados e esse efeito foi revertido pela injeção de losartan, um antagonista do receptor de tipo 1 (AT1) da angiotensina.

Alguns trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Neurociências, os quais avaliaram a participação dos receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2C} situados no CeA sobre a regulação da ingestão de sal em ratos depletados de sódio, evidenciaram que a ativação farmacológica dos receptores 5-HT₃, induzida por m-CPBG localizados no CeA, ocasionou uma redução significativa na ingestão de sal em ratos depletados de sódio e que este efeito antinatriorético da m-CPBG foi revertido pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor de 5-HT₃, o ondansetron. Entretanto, quando somente injetado o ondansetron no CeA, verificou-se que não houve mudança na ingestão tanto nos ratos depletados de sódio quanto nos normonatremáticos. Por outro lado, a estimulação farmacológica dos receptores 5-HT_{2C} localizados na amígdala central, pelo agonista seletivo do receptor 5-HT_{2C}, o m-CPP, não conseguiu modificar a ingestão de sal em ratos depletados de sódio. Além disso, foi demonstrado, neste estudo, que a administração de um bloqueador seletivo do receptor 5-HT_{2C}, o SDZ SER 082, não alterou a ingestão de sal em ratos submetidos à depleção de sódio.

Assim sendo, esses resultados levaram à conclusão de que a ativação farmacológica de receptores 5-HT₃, localizados no CeA, inibe a ingestão de sal em ratos depletados de sódio, e que os receptores de 5-HT_{2C}, localizados no CeA, parecem estar dissociados dos mecanismos de controle de ingestão de sal (LUZ, et al, 2007). Dessa forma, os achados encontrados neste trabalho evidenciam a participação do CeA no controle do apetite por sódio com outros neurotransmissores, haja vista que os receptores serotoninérgicos centrais presentes nesta área foram capazes de inibir a ingestão de sódio, o que reforça a sua importância para esta condição e com os resultados encontrados no estudo em questão. Segundo Andrade-Franze, et al., (2015), o núcleo central da amígdala juntamente com núcleo parabraquial lateral são consideradas áreas centrais importantes no controle do apetite por sódio, devido aos mecanismos inibitórios e facilitatórios dessas áreas, respectivamente (ANDRADE-FRANZE, et al., 2017).

O LPBN é uma estrutura capaz de direcionar a diminuição dos comportamentos apetitivos, em resposta a entradas homeostáticas e viscerais, principalmente através das projeções enviadas para a amígdala central (ANDRADE-FRANZE, et al., 2017). Este núcleo parece estar relacionado também ao comportamento alimentar, sabe-se que o LPBN apresenta uma população de neurônios glutamatérgicos que expressam um peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais se projetam para o CeA que são ativados por uma gama de sinais relacionados à saciedade. Estes sinais chegam ao LPBN provenientes do NTS, que expressam a colecistoquinina (CCK) e a dopamina β-hidroxilase (DBH) que por sua vez é ativado por sinais viscerais de saciedade, como a distensão do estômago, que ascendem ao SNC via nervo vago (ROMAN, et al., 2016).

Atualmente, alguns estudos têm sugerido a existência de circuitos similares no LPBN responsáveis pelo controle específico do apetite por sal, o qual ocorre primordialmente, por meio de projeções para o CeA, e, dessa maneira, esta rede integra informações sobre a homeostasia do sal. O núcleo parabraquial lateral contém neurônios GABAérgicos que são sensíveis ao estado homeostático do sal que se projetam para o CeA, e esta, por sua vez, inibe o apetite salino. A exemplo disto, temos um estudo que demonstrou que a inibição do LPBN, a partir da utilização do muscimol, estimula o apetite salino e este efeito é bloqueado através da inibição simultânea do CeA com o muscimol (ANDRADE-FRANZE, et al., 2015).

No complexo amigdalóide (incluindo o CeA) existem diversos receptores de neurotransmissores e/ou neuromoduladores. Dentre eles estão presentes as densas projeções histaminérgicas provenientes do TM (PANULA, et al., 1989). Dados na literatura indicam que a quantidade de histamina presente nos neurônios está associada ao alto nível da atividade

da enzima L-histidina descarboxilase (KATOAKA; ROBERTINS, 1967). Dessarte, esta enzima apresenta-se como um marcador confiável para os sistemas neuronais histaminérgicos (BARBIN, et al., 1977). Diante desta informação, uma série de estudos voltados para essa investigação foi realizada e, de acordo com Ben-Ari, et al., (1977), no complexo amigdalóide, os níveis mais altos de atividade da L- histidina descarboxilase foram encontrados nas estruturas localizadas mais medialmente, nos núcleos centrais e mediais da amígdala.

Sabendo-se da existência dessa alta densidade de histamina no CeA, ao investigar o papel modulatório dos receptores H₁ e H₂ no CeA, os resultados obtidos indicam que os antagonistas dos receptores do tipo H₁ promovem uma inibição na ingestão de salina hipertônica mais acentuada, enquanto que os antagonistas dos receptores do tipo H₂ induzem uma inibição menos intensa. Verificamos que os animais depletados de sódio que recebendo injeção no CeA de mepiramina e de cimetidina na maior concentração (200nmol/0,2μl) apresentaram inibição mais significativa da resposta ingestiva ao sal. Os animais tratados com a concentração intermediária (100nmol/0,2μl) também exibiram uma redução nessa resposta, porém menos pronunciada. A resposta dos animais tratados com a menor concentração de mepiramina (50nmol/0,2μl) ao comportamento ingestivo foi ainda menos pronunciada que na concentração anterior. Quando se comparam as respostas inibitórias da cimetidina e da mepiramina nas concentrações de 100 e 200 nmol/0,2μl, verifica-se que este efeito foi mais significativo para a mepiramina do que para cimetidina. Dessa forma, esses dados sugerem que, no CeA, os receptores H₁ apresentam um papel mais preponderante do que os receptores H₂ no controle do apetite por sódio em ratos depletados deste íon. Essa diferença na resposta inibitória dos dois antagonistas poderia ser explicada pela diferença densidade dos receptores H₁ e H₂ nesta área, entretanto dados da literatura são insuficientes para corroborar esta hipótese.

Com relação aos resultados obtidos nesse protocolo experimental, é importante salientar que os animais depletados de sódio, tanto os que receberam as microinjeções de mepiramina, quanto os que receberam microinjeções de cimetidina, assim como os seus respectivos controles neste estudo, não ingeriram a água destilada durante as sessões experimentais. Contudo, estes resultados já eram esperados, dado que esses animais encontravam-se normovolêmicos. Outros trabalhos que utilizaram o mesmo protocolo experimental obtiveram o mesmo resultado que o presente trabalho (NASCIMENTO, et al., 2014). Estudo com protocolo específico para ingestão de água (privação 24h) devem ser realizados para investigar o papel de vias histaminérgicas no CeA no controle da ingestão de água.

Diante disso, é pertinente inferir que a carência de sódio no organismo desses animais, causada pela injeção de furosemida e dieta hiposódica, estimula vias histaminérgicas centrais ativando os receptores histaminérgicos H₁ e H₂ presentes no CeA que induzem a ingestão de solução salina hipertônica, a qual, em condições normais, seria aversiva. Possivelmente, essa ativação do sistema histaminérgico central no CeA é desencadeada pela ativação de estruturas que detectam as variações das concentrações plasmáticas de sódio, como o órgão subfornical, o qual envia projeções para os núcleos integadores, como o núcleo pré-óptico e destes para o CeA. Também as estruturas relacionadas com o aumento ou a diminuição dos comportamentos apetitivos, tais como o núcleo parabraquial lateral, são ativadas pelas informações das entradas inibitórias e excitatórias advindas da periferia, via nervos vagos aferentes, os quais projetam-se até o NTS e destes ao LPBN. As informações que chegam nesta área, por sua vez, ascende para o CeA (ANTUNES-RODRIGUES, 2004; JOHNSON, 2007; BOURQUE, 2008). Outros estudos ainda reforçam essa hipótese, visto que de acordo com estudos realizados por Geerling e Loewy (2008), é possível inferir que de fato a via NTS-LPBN-CeA pode ser um dos circuitos neuroanatômicos que explicam a modulação da ingestão de sódio pelo CeA. Ademais, Tandon, et al. (2012) observaram mudança na atividade neuronal em resposta ao estado natrêmico do animal. Os resultados dos seus estudos mostraram que a depleção de sódio leva a um aumento da resposta excitatória evocada em algumas áreas cerebrais, incluindo o LH, Nac e CeA.

É possível também que essa condição ative o sistema histaminérgico central, e este, por sua vez, modifique a percepção ao sabor salgado, entretanto mais estudos são necessários para confirmar esta possibilidade.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, utilizando administração dos antagonistas histaminérgicos H₁ e H₂ no terceiro ventrículo, em animais submetidos a privação de água (24 h), a depleção de sódio induzida por furosemida e a estimulação farmacológica angiotensinérgica central obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo. Contudo, com administração intracerebroventricular, a cimetidina não teve nenhum efeito. Além disso, observou-se que a ingestão sal e água gerada por estimulação angiotensinérgica central (10 ng) foi diminuída por injeções de mepiramina e cimetidina no terceiro ventrículo (MAGRANI, et al., 2005). Os resultados desse estudo e os do presente trabalho permitem concluir que, de fato, os receptores histaminérgicos centrais participam do controle da ingestão de sal induzida por diferentes estímulos fisiológicos e farmacológicos.

Morimoto, et al., (2001) demonstraram que o sistema histaminérgico central está envolvido no controle do consumo de alimentos. Em especial aqueles que se encontram na

amígdala, visto que esta área é um dos locais candidatos, já que recebem informações sensoriais da cavidade oral (AZUMA, et al., 1984). Dessa maneira, uma vez que as fibras histaminérgicas são encontradas em abundância na amígdala (INAGAKI, et al., 1988), postula-se que o sistema histaminérgico é afetado tanto pela sensação de textura alimentar quanto pela estimulação gustativa da cavidade oral (ISHIZUKA, et al., 2010).

Ishizuka, et al. (2010) mostraram em seus estudos o efeito da dureza dos alimentos sobre a liberação de histamina no núcleo central da amígdala por microdiálise *in vivo* usando ratos que se movem livremente. Os resultados deste trabalho demonstraram que, quando os ratos consumiram “pellets” de ração duros, a liberação de histamina pela amígdala aumentou significativamente, indicando que a atividade do sistema histaminérgico não é afetada pelo efeito pós-ingestivo, mas pela sensação somática oral de estimulação mecânica dos alimentos. Nesse estudo também foi revelado que é justamente o núcleo central da amígdala que participa do controle dos movimentos dos maxilares, visto que as fibras eferentes do núcleo central da amígdala atingem o núcleo do triplo motor, região responsável pelo controle do movimento da mandíbula, através da região reticular parvicelular (YASUI, et al., 2004) ou a região supratrigeminal (TAKEUCHI, et al., 1988).

Estudos realizados por Lecklin e Tuomisto (1998), que tinham por objetivo investigar quais antagonistas dos receptores histaminérgicos (H_1 , H_2 e H_3) estavam envolvidos na supressão de alimentos, após o tratamento com metoprina (10 mg / kg IP), mostraram que a administração sistêmica do antagonista do receptor H_3 , a tioperamida (5 mg / kg IP), complementou o efeito supressor alimentar da metoprina. Além disso, o antagonista do receptor H_1 , a mepiramina (20 mg / kg de IP), antagonizou essa supressão em ratos tratados com metoprina, enquanto que o antagonista do receptor H_2 , ranitidina (100 mg / kg IP) não teve efeito. Dessa maneira, esses resultados mostram que a elevação do conteúdo de histamina no cérebro, a qual inibe o catabolismo da histamina, suprime a ingestão alimentar, e este efeito da metoprina pode ser abolido pelo pré-tratamento com anti-histamínicos.

Lecklin, et al. (1998) também avaliou as ações de histamina e dos agonistas seletivos de receptores de histamina H_1 , H_2 e H_3 infundidos intracerebroventricularmente, sobre a ingestão de alimentos, água e fluxo de urina em ratos. Neste trabalho, os autores demonstraram que o agonista de H_1 , 2-(3- trifluorometilfenilo) histamina (FMPH) provocou a diminuição da ingestão de alimentos, enquanto que o agonista de H_2 , dimaprit, não causa nenhum efeito. Verificou-se também que a supressão alimentar induzida pela histamina e FMPH é atenuada pelo bloqueio do H_1 , mas não pelo bloqueio dos receptores H_2 . Estes resultados demonstram claramente que a ativação dos receptores H_1 do cérebro diminui a

ingestão de alimentos indicando que o sistema histaminérgico do cérebro está associado ao comportamento alimentar. Com relação à homeostase da água corporal, a histamina causou uma diurese duradoura, como também o dimaprit e a metoprina, enquanto o bloqueio dos receptores H_2 aboliu as respostas diuréticas à histamina e dimaprit. Por outro lado, o agonista H_3 , (R)- α - metilhistamina provocou a ingestão de água e este efeito pode ser prevenido pelo pré-tratamento com a tioperamina. Dessa maneira, estes resultados indicam que a ativação dos receptores H_3 provoca predominantemente a ingestão de água, enquanto que os receptores H_2 centrais medeiam o efeito diurético da histamina. Os dados do presente estudo contribuem para o entendimento do papel das vias histaminérgicas centrais no controle do equilíbrio hidrossalino uma vez que se demonstrou a participação dos receptores H_1 e H_2 histaminérgicos na CeA sobre o apetite por sódio.

Para investigar se os antagonistas dos receptores histaminérgicos, H_1 e H_2 , utilizados no presente estudo foram capazes de modificar a ingestão de solução salina hipertônica, através de uma inibição geral inespecífica do comportamento ingestivo, investigamos o efeito das injeções de mepiramina e cimetidina no CeA, sobre a ingestão de solução sacarina 0,1%. O “Teste de Sobremesa” mostra a preferência pela ingestão da sacarina em ratos sendo protocolo experimental bem estabelecido para estudo de comportamento hedônico nesses animais (NACHMAN, 1959). O Teste de Sobremesa no presente estudo mostra que a ingestão da solução de sacarina 0,1% não foi alterada pelas injeções de H_1 ou H_2 no CeA. Esses dados sugerem que mudanças na ingestão de sal causadas pelo bloqueio dos receptores histaminérgicos não estão relacionadas com mudanças gerais do comportamento apetitivo, desde que a resposta hedônica não foi alterada pela administração dos antagonistas histaminérgicos. Isso é uma evidência de que essa inibição do apetite por sódio pelos antagonistas histaminérgicos altera especificamente o controle da ingestão homeostática de sódio. Entretanto, com este protocolo experimental, não se pode descartar a ideia de que vias histaminérgicas centrais modulam o aspecto da palatabilidade ao sódio. Estudos futuros devem ser realizados para esclarecer esta hipótese.

Alguns estudos realizados por Lozeva, et al. (2000) examinaram os efeitos do bloqueio do receptor da histamina H_1 sobre os ritmos circadianos da alimentação e a atividade locomotora espontânea em ratos com anastomose portacaval (PCA) a longo prazo, para descobrir se a neurotransmissão histaminérgica alterada no cérebro de ratos após seis meses da realização cirúrgica de PCA, participava da geração e manutenção dos distúrbios dos ritmos circadianos da alimentação e atividade locomotora. Os resultados desse trabalho demonstraram que o bloqueio do receptor H_1 da histamina no SNC, a partir da utilização da

pirilamina (mepiramina), um antagonista seletivo do receptor H_1 que possui alta afinidade, administrada em uma infusão subcutânea contínua, leva a supressão da ingestão alimentar e exerce um efeito depressivo significativo na atividade locomotora, sugerindo dessa forma que os mecanismos histaminérgicos centrais desempenham um papel importante no controle rítmico circadiano da alimentação assim como na atividade locomotora espontânea através da ativação dos receptores histaminérgicos H_1 centrais.

Nessa perspectiva, para testar se a administração central de mepiramina ou cimetidina no CeA também induziria uma redução significativa na atividade locomotora, o que poderia explicar a inibição da ingestão de solução salina hipertônica observada neste estudo, expusemos os grupos de ratos que receberam as injeções de H_1 ou H_2 ao teste de campo aberto. Contudo, verificamos que não ocorreu mudança na atividade locomotora dos animais, examinada através do teste de campo aberto, em decorrência da injeção dos antagonistas dos receptores histaminérgicos no CeA.

9 CONCLUSÃO

A inibição da ingestão de salina hipertônica induzida pelo bloqueio dos receptores histaminérgicos observada no presente estudo parece ser resultado de controle no apetite por sódio especificamente e não devido a uma inibição geral do comportamento ingestivo, uma vez que a ingestão de solução sacarina não foi modificada. Assim, pode-se concluir que as vias histaminérgicas estão modulando aspecto homeostático da ingestão de sal e não o aspecto hedônico. Embora estudos mostrem que vias histaminérgicas centrais alteram a atividade locomotora, no presente estudo, o bloqueio dos receptores histaminérgicos na CeA não modificou a atividade locomotora dos animais. Assim, pode-se concluir que a inibição do apetite por sódio induzido pelo bloqueio dos receptores histaminérgicos na CeA não foi devido a impedimento locomotor.

Os resultados apresentados nesse estudo confirmam a nossa hipótese de que durante a depleção de sódio, as vias histaminérgicas, através dos seus receptores dos tipos H₁ e H₂, podem ser ativadas e, dessa forma, modular o apetite por sódio corrigindo o equilíbrio homeostático. O diagrama abaixo ilustra essa hipótese.

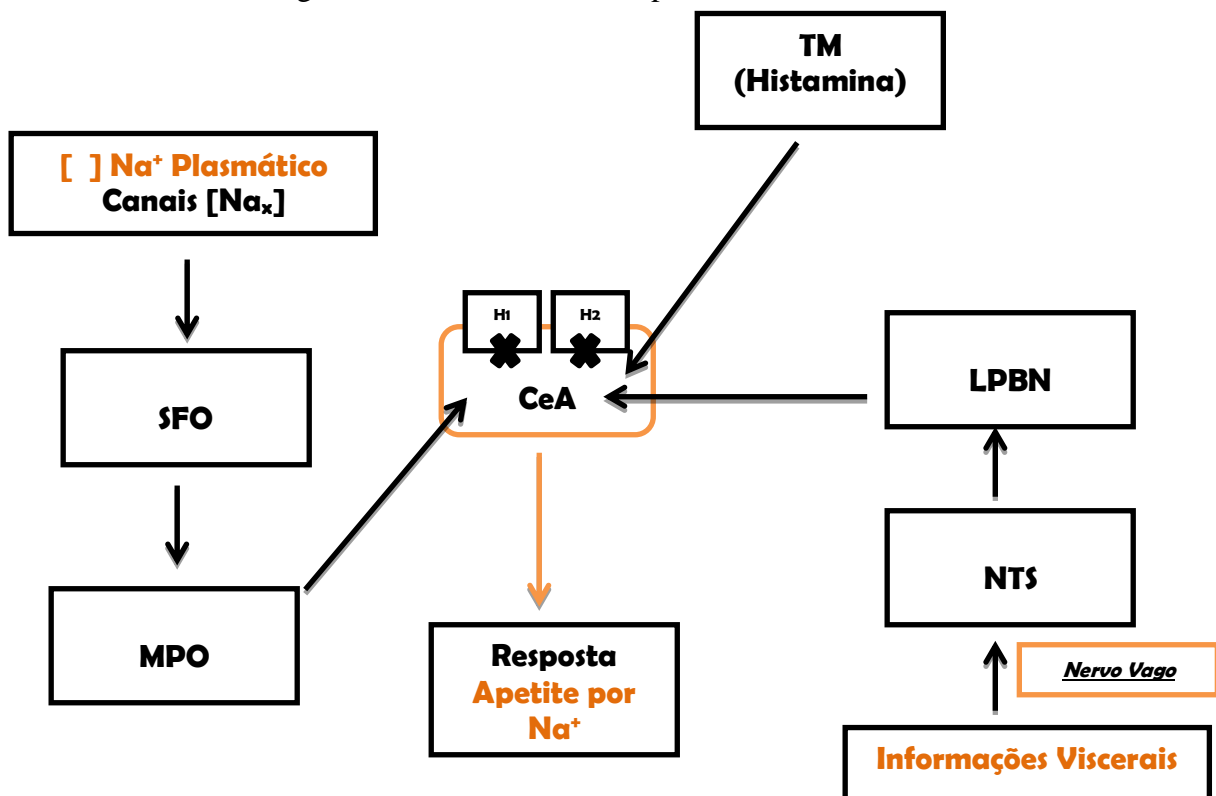


Figura 11: Diagrama esquemático indicando as possíveis vias responsáveis pela ativação do sistema histaminérgico no CeA em resposta a depleção de sódio. Legenda: SFO, Núcleo subfornical; MPO, Núcleo pré-ótico; TM, Tuberomamilar; LPBN, Núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Mais estudos envolvendo o sistema histaminérgico e as áreas envolvidas no equilíbrio hidrossalino precisam ser realizados, a fim de que o papel dos receptores histaminérgicos do tipo H₁ e H₂ centrais na modulação do apetite específico por sódio, seja melhor compreendido. Um desses estudos seria aquele envolvendo a técnica de imunohistoquímica para dupla marcação da proteína FOS e RNAm para receptores H₁ e H₂ e dupla marcação da proteína FOS e RNAm para histamina, dado que estes podem indicar ativação neuronal e, portanto, as áreas cerebrais que participam ou não do circuito que modula o apetite por sal pelas vias histaminérgicas em condições de depleção de sódio. Dessa maneira, ficaria melhor elucidada a rede neural pela qual as vias histaminérgicas do CeA geram a resposta ingestiva ao sal em situações que envolvem a carência deste íon.

Outro estudo que poderia ser realizado seria o da palatabilidade ao sabor, uma das respostas psicológicas que aumentam o apetite por sódio, através da mudança da percepção ao sabor salgado. Dessa forma, visto que o apetite por sódio é direcionado por circuitos neuronais que integram informações relacionadas ao estado homeostático do sal, a detecção de pistas e a saciedade visceral (SMITH; LAWRENCE, 2017). E que a amígdala é responsável por processar inúmeras experiências sensoriais simultaneamente, tais como estímulo, conteúdo emocional (palatabilidade ao sabor) e valor de recompensa, tendo em vista que ela apresenta conexões com córtex sensorial, córtex orbitofrontal e sistema dopaminérgico (BERRIDGE, 1996; CARDINAL, et al., 2002) E que, em especial, o núcleo central da amígdala (CeA) recebe informações associadas ao sabor devido às conexões recíprocas com o tronco cerebral gustativo (KARIMNAMAZI; TRAVERS, 1998; HUANG, et al., 2003; LI, et al., 2005). É interessante investigar se os receptores histaminérgicos H₁ e H₂ presentes no CeA estão envolvidos nos mecanismos da palatabilidade hedônica ao sabor salgado, e se os mesmos influenciam de alguma forma os componentes deste circuito, fornecendo assim uma caracterização adicional aos papéis destes receptores relacionados ao apetite por sódio.

A interação da histamina com outros neurotransmissores, por exemplo a dopamina, também é um fator importante a ser pesquisado, dado que a dopamina e seus respectivos receptores estão intimamente relacionados com a regulação da motivação para comportamentos alimentares. Estudos têm demonstrado que a dopamina apresenta um papel funcional fundamental na amígdala sobre a ingestão de alimentos e motivação do comportamento alimentar (ANDERBERG, et al., 2014). Assim sendo, poderíamos verificar

se os receptores de dopamina no CeA têm algum envolvimento sobre os efeitos da histamina no comportamento ingestivo ao sal. Para isso, realizaríamos um estudo com duplo tratamento, utilizando os agonistas dos receptores histaminérgicos em ratos não depletados de sódio, seguido dos antagonistas dos receptores dopaminérgicos, com o objetivo de observar se a presença da histamina estimula a transmissão dopaminérgica no CeA, e esta, por sua vez, quando bloqueada, altere a ingestão de sódio.

11 REFERÊNCIAS

ADOLPHS, R. What does the amygdala contribute to social cognition? **Rev. Acad. Sci**, v. 1191, p. 42–61, 2010.

AGNATI, L. F. et al. Homeostasis and the concept of ‘interstitial fluids hierarchy’: Relevance of cerebrospinal fluid sodium concentrations and brain temperature control (Review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 39: p. 487-497, 2017.

AIRAKSINEN, M.S.; PANULA, P. The histaminergic system in the guinea pig central nervous system: an immunocytochemical mapping study using an antiserum against histamine. **J. Comp. Neurol**, v. 273, p. 163–186, 1988.

AIRAKSINEN, M.S. et al. Histaminergic system in the tree shrew brain. **J. Comp. Neurol**, v. 286, p. 289–310, 1989.

ANDERBERG, R. H. et al. Dopamine signaling in the amygdala, increased by food ingestion and GLP-1, regulates feeding behavior. **Rev. Physiol. & Behav.**, v. 136, p. 135-144, 2014.

ANDERSSON, B. Regulation of body fluids. **Rev. Physiol**, v. 39, p. 185–200, 1977.

ANDRADE-FRANZÉ, G.M.F. et al. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Rev. Brain Res.**, v. 332, p. 57 – 64, 2010.

ANDRADE-FRANZE, G.M. et al. Importance of the central nucleus of the amygdala on sodium intake caused by deactivation of lateral parabrachial nucleus. **Rev. Brain Res.**, v. 1625, p. 238–245, 2015.

ANDRADE-FRANZÉ, G.M.F. et al. Lateral parabrachial nucleus and opioid mechanisms of the central nucleus of the amygdala in the control of sodium intake. **Rev. Behav. Brain Res.**, v. 316, p. 11–17, 2017.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Rev. Physiol.**, v. 84, p. 169–208, 2004.

ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J.C. Autoinhibition of histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. **Rev. Nat.**, v. 302, p. 832-837, 1983.

ARIEFF, A. I. Management of hyponatraemia. **Rev. BMJ**, v. 307, p. 305–308, 1993.

ASEDE, D. et al. Sensory inputs to intercalated cells provide fear-learning modulated inhibition to the basolateral amygdala. **Rev. Neuron**, v. 86, p. 541–54, 2015.

AZUMA, S.; YAMAMOTO, T.; KAWAMURA, Y. Studies on gustatory responses of amygdaloid neurons in rats. **Rev. Brain Res**, v. 56, p. 12–22, 1984.

- BANANEJ, M. et al. D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. **J. Psychopharmacol.**, v. 0, p. 1-11, 2011.
- BANG, L.; RØ, Ø.; ENDESTAD, Tor. Amygdala alterations during an emotional conflict task in women recovered from anorexia nervosa. **Rev. Psych. Res. Neuroim.**, v. 248, p.126–133, 2016.
- BARBIN, G. et al. Neuronal and nonneuronal histamine in rat brain: tentative localization of the nerve cell bodies. **Rev. Agents and Actions**, v. 7, p. 104-105, 1977.
- BAKKER, R. A. et al. In vitro pharmacology of clinically used central nervous system-active drugs as inverse h1 receptor agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 322, p. 172–179, 2007.
- BAKKER, R.A. et al. Constitutively active Gq/11-coupled receptors enable signaling by co-expressed G(i/o)-coupled receptors. **J. Biol Chem.**, v. 279, p. 5152– 5161, 2004.
- BAKKER, R.A. et al. Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. **Rev. Mol. Pharmacol.**, v. 60, p. 1133–1142, 2001.
- BEAVEN, M. A. Factors regulating availability of histamine at tissue receptors. In: GANELLIN, C. R.; PARSONS, M. E.; BRISTOL, U, K. **Pharmacology of Histamine Receptors**. Wright, 1982. p. 103–145.
- BEN-ARI, Y. et al. Histamine synthesizing afferents within the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Rev. Brain Res.**, v. 138, p. 285-294, 1977.
- BERRIDGE, K. C. Food reward: brain substrates of wanting and liking. **Rev. Neurosc. Biobehav.**, v. 20, p. 1– 25, 1996.
- BERNARD, C. **Lectures on phenomena of life common to animals and plants**. Paris: JB Balliere and Son, 1878.
- BERNTSON, G. G.; CACIOPPO, J. T. Integrative physiology: homeostasis, allostasis and the orchestration of systemic physiology. In: **Handbook of psychophysiology**. Cambridge University Press, ed. 3, p. 433-452, 2007.
- BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Rev. Nat. Rev. Neurosc.**, v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008.
- BOLAM, J. P. et al. Synaptic organisation of the basal ganglia. **J. Anat**, v. 196, p. 527–542, 2000.
- BRISTOW, L.J.; BENNETT, G.W. Biphasic Effects of Intra-accumbens Histamine Administration on Spontaneous Motor Activity in the Rat: a role for central histamine receptors. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 95, p. 1292-1302, 1988.

BRABANT, C. et al. Involvement of the brain histaminergic system in addiction and addiction-related behaviors: A comprehensive review with emphasis on the potential therapeutic use of histaminergic compounds in drug dependence. **Rev. Progr. in Neurobiol.**, v. 92, p. 421–441, 2010.

BREUNIG, E. et al. Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. **J. Physiol**, v. 583, p. 731–742, 2007.

BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HASS, H. L. Haas. The physiology of brain histamine. **Rev. Progr. in Neurobiol.**, v. 63, p. 637–672, 2001.

BZDOK, D. et al. An investigation of the structural, connectional, and functional subspecialization in the human amygdala. **Rev. Hum. Brain Mapp**, v. 34, p. 3247–3266, 2013.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 2312–2327, 1995.

CARDINAL, R.N. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and pré-frontal cortex. **Rev. Neurosci. Biobehav.**, v. 26, n. 3, p. 321–352, 2002.

CASSELL, M.D.; FREEDMAN, L.J.; SHI, C. The intrinsic organization of the central extended amygdala. **Ann. New York Acad. Sci.**, v. 877, p. 217–241, 1999.

CASSELL, M. D.; GRAY, T.S.; KISS, J. Z. Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study. **J. Comp. Neurol.**, v. 246, p. 478–499, 1986.

CHEN, K. et al. Excitatory effect of histamine on neuronal activity of rat globus pallidus by activation of H2 receptors in vitro. **Rev. Neurosc. Res.**, v. 53, p. 288–297, 2005.

CLAPHAM, J.; KILPATRICK, G.J. Histamine H3 receptor modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H3 receptor subtypes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 919–923, 1992.

CONNELY, W. M. et al. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. **Br. J. Pharmacol.**, v. 157, p. 55–63, 2009.

COVIAN, M. R. et al. Central control of salt balance. In: MOGENSEN, G. J.; CALARESU, F.R. (Eds.). **Neural Integration of Physiological Mechanisms and Behaviour**. University of Toronto Press, 1975. p. 267–282.

CURTIS, K.S.; KRAUSE, E.G.; CONTRERAS, R.J. Altered NaCl taste responses precede increased NaCl ingestion during Na+ deprivation. **Rev. Physiol. Behav.**, v. 72, p. 743–749, 2001.

DALE, H. H.; LAIDLAW, P. P. Histamine shock. **J. Physiol**, v. 52 p. 355–90, 1919.

DANIELS, D.; FLUHARTY, S. J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Rev. Physiol. & Behav.**, v. 81, p. 319-337, 2004.

DENTON, D. A. The hunger for salt. **An anthropological, physiological and medical analysis**. Springer, Berlin, 1983.

DEOLMOS, J. S. Amygdala. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Human Nervous System**. Rev. Academic Press, 1990. p. 583-710.

DIEWALD, L. et al. Histaminergic system in co-cultures of hippocampus and posterior hypothalamus: a morphological and electrophysiological study in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, v. 9, p. 2406–2413, 1997.

DOGTEROM, J. et al. Histamine is an extremely potent releaser of vasopressin in the rat. **Rev. Exp.**, v. 32, p. 659-660, 1976.

DUMONT, E. C. et al. Physiological properties of central amygdala neurons: species differences. **Eur. J. Neurosci.**, v. 15, p. 545–552. 2002.

EHRlich, I. et al. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Rev. Neuron**, v. 62, p. 757–71. 2009.

ENGELHARDT, B. Development of the blood-brain barrier. **Rev. Cell Tissue Res.**, v. 314: p.119–129, 2003.

ERICKSON, J. D. et al. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. **Rev. Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 5166–5171, 1996.

EYRE, P.; CHAND, N. Histamine receptor mechanism of the lung. In: GANELLIN, C. R.; PARSONS, M. E.; BRISTOL, U. K. **Pharmacology of Histamine Receptors**. Wright, 1982, p. 298–322.

FITZGERALD, D. A. et al. Beyond threat: amygdala reactivity across multiple expressions of facial affect. **Rev. Neuroimage**, v. 30, p. 1441–1448, 2006.

FOWLER, C. H. et al. Disrupted amygdala-prefrontal connectivity during emotion regulation links stress-reactive rumination and adolescent depressive symptoms. **Rev. Develop. Cognitive Neurosci.**, v. 27, p. 99–106, 2017.

FUDGE, J. L.; HABER, S. N. The central nucleus of the amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. **Rev. Neurosci.**, v. 97, p. 479–494, 2000.

GALAVERNA, O. G. et al. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Rev. Brain Res.**, v. 28, p. 89–98, 1992.

GALLAGHER, M.; GRAHAM, P.W.; HOLLAND, P.C. The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 1906–1911, 1990.

GBAHOU, F. et al. Protean agonism at histamine H₃ receptors in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 11086–11091, 2003.

GBAHOU, F. et al. Compared pharmacology of human histamine H₃ and H₄ receptors: structure-activity relationships of histamine derivatives. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 744–754, 2006.

GEERLING, J. C; LOEWY, A.D. Central regulation of sodium appetite. **Exp. Physiol.**, v. 93, p. 177-209, 2008.

GRAY, T.S; MAGNUSON, D. J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 262, p. 365–374, 1987.

HALL, J. E. et al. Regulation of arterial pressure: role of pressure natriuresis and diuresis. **Rev. Fed. Proc.**, v. 45, p. 2897–903, 1986.

HAAS, H. L. SERGEEVA, O. A.; SEBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Rev. Physiol.**, v. 88, p. 1183–1241, 2008.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Rev. Nature**, v.4, p. 121-130, 2003.

HAYASHI, H. et al. Fine structure of histaminergic neurons in the caudal magnocellular nucleus of the rat as demonstrated by immunocytochemistry using histidine decarboxylase as a marker. **J. Comp. Neurol.**, v. 229, p. 233–241, 1984.

HARRING, T. R.; DEAL, N. S.; KUO, D. C. Disorders of Sodium and Water Balance. **Rev. Emerg. Med. Clin. North Am.**, v. 32, n. 2, p. 379- 401, 2014.

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. **J. Neurosc.**, v. 24, n. 42, p. 9276-9281, 2004.

HILL, S. J. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of histamine receptors. **Rev. Pharmacol.**, v. 49, p. 3-278, 1997.

HOLLAND, P. C.; GALLAGHER, M. Effects of amygdala central nucleus lesions on blocking and unblocking. **Rev. Behav. Neurosci.**, v. 107, p. 235–245, 1993.

HOPKINS, D.A. Amygdalotegmental projections in the rat, cat, and rhesus monkey. **Rev. Neurosc. Letters**, v. 1, p. 263–270, 1975.

HSU, M. et al. Neural systems responding to degrees of uncertainty in human decision-making. **Rev. Scien.**, v. 310, p. 1680–1683, 2005.

HU, B. et al. At₁ receptor blockade in the central nucleus of the amygdala attenuates the effects of muscimol on sodium and water intake. **Rev. Neurosc.**, v. 307, p. 302–310 2015.

HUANG, T.; YAN, J.; KANG, Y. Role of the central amygdaloid nucleus in shaping the discharge of gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. **Rev. Brain Res Bull.**, v. 61, p. 443–452, 2003.

HUBER, D.; VEINANTE, P.; STOOP, R. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. **Rev. Scienc.**, v. 308, p. 245–248, 2005.

ISHIZUKA, T. et al. The effect of hardness of food on amygdalar histamine release in rats. **Rev. Brain Res.**, v. 1313, p. 97–102, 2010.

IVES, H.E. Diuretic agents. In: KATZUNG, B. G. (Ed.). **Basic and clinical pharmacology.** Stamford (CT): Appleton & Lange, 1998. p. 242,

INAGAKI, N. et al. Organization of histaminergic fibers in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 273, p. 283–300, 1988.

JANAK, P.H.; TYE, K.M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Rev. Nat.**, v. 517, p. 284–292, 2015.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Rev. Front Neuroendocrinol.**, v. 18, p. 292–353, 1997.

JOHNSON, A. K. et al. The extended amygdala and salt appetite. **Ann. New York Acad. Scienc.**, v. 877, p. 258–80, 1999.

JOHNSON, A. K. The sensory Psychobiology of Thirst and salt Appetite. **Rev. Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 39, p. 1388–1400, 2007.

JOLKKONEN, E.; PITKANEN, A. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 395, p. 53–72, 1998.

JONGEJAN, A. et al. Linking agonist binding to histamine H1 receptor activation. **Rev. Nat. Chem. Biol.**, v. 1, p. 98–103, 2005.

JUTEL, M.; BBLASER, K.; AKDIS, C.A. Histamine in chronic allergic responses. **J. Invest. Allergy Clin. Immunol.**, v. 15, p. 1–8, 2005.

KARIMNAMAZI, H.; TRAVERS, J.B. Differential projections from gustatory responsive regions of the parabrachial nucleus to the medulla and forebrain. **Rev. Brain Res.**, v. 813, p. 283–302, 1998.

KATAOKA, K.; DE ROBERTIS, E. Histamine in isolated small nerve endings and synaptic vesicles of rat brain cortex, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 156, p. 114–125, 1967.

KITA, H.; OOMURA, Y. An HRP study of the afferent connections to rat lateral hypothalamic region. **Rev. Brain Res. Bull.**, v. 8, p. 63–71, 1982.

KJAER, A. et al. Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. **Rev. Endocrinol.**, v. 135, p. 675–681, 1994.

KUHAR, M.J.; TAYLOR, K.M.; SNYDER, S. H. The subcellular localization of histamine and histamine methyltransferase in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 18, p. 1515–1527, 1971.

KURAMASU, A. et al. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: roles of C-terminal tails of histamine receptors. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 101, p. 7–11, 2006.

KÖHLER, C. A. et al. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. **Rev. Neural Plast.**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

KOLLONITSCH, J. et al. Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. **Rev. Nat.**, v. 274, p. 906–908, 1978.

KRALY, F. S. et al. H₁, H₂, and H₃ Receptors Contribute to Drinking Elicited by Exogenous Histamine and Eating in Rats. **Rev. Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, n. 2, p. 347-354, 1996.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. **J. Comp. Neurol.**, v. 178, p. 255–280, 1978.

LECKLIN, A. et al. Effects of intracerebroventricularly infused histamine and selective H₁, H₂ and H₃ agonists on food and water intake and urine flow in Wistar rats. **Rev. Brain Res.**, v. 793, p. 279–288, 1998.

LECKLIN, A.; TUOMISTO, L. Fluid Balance in Rats of Three Different Strains After Inhibition of Histamine Catabolism. **Rev. Physiol. & Behav.**, v. 58, n. 5, p. 861-867, 1995

LECKLIN, A.; TUOMISTO, L. The Blockade of H₁ Receptors Attenuates the Suppression of Feeding and Diuresis Induced by Inhibition of Histamine Catabolism. **Rev. Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 59, n. 3, p. 753–758, 1998.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LEMOLO, A. et al. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide in the Central Amygdala Causes Anorexia and Body Weight Loss via the Melanocortin and the TrkB Systems. **Rev. Neuropsychopharmacol.**, v. 40, p. 1846–1855, 2015.

LEURS, R.; CHURCH, M.K.; TAGLIALATELA, M. H₁-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Rev.Clin. Exp. All.**, v. 32, p. 489–498, 2002.

LEPPANEN, J. M. Emotional information processing in mood disorders: a review of behavioral and neuroimaging findings. **Rev. Curr. Opin. Psych.**, v. 19, p. 34–39, 2006.

LI, C. S.; CHO, Y. K.; SMITH, D.V. Modulation of parabrachial taste neurons by electrical and chemical stimulation of the lateral hypothalamus and amygdala. **J. Neurophysiol.**, v. 93, p. 1183–1196, 2005.

- LICHTENSTEIN, L. M.; GILLESPIE, E. The effect of the H1- and H2 antihistamines on "allergic" histamine release and its inhibition by histamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 192, p. 441–450, 1975.
- LIM, H. D. et al. Evaluation of histamine H1-, H2-, H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, p. 1310–1321, 2005.
- LINTUNEN, N. et al. Postnatal expression of H1-receptor mRNA in the rat brain: correlation to L-histidine decarboxylase expression and local upregulation in limbic seizures. **Eur J. Neurosci.**, v. 10, n.7, p. 2287-301, 1998.
- LOZEVA, V. et al. Effects of the Histamine H1 Receptor Blocker, Pyrilamine, on Spontaneous Locomotor Activity of Rats With Long-Term Portacaval Anastomosis. **Rev. Hepatol.**, v. 31, n. 2, 2000.
- LUZ, C. P. et al. Role of 5-HT3 and 5-HT2C receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. **Rev. Brain Res.**, v. 1099, p. 121-132, 2006.
- LUZ, C. P. et al. The central amygdala regulates sodium intake in sodium depleted rats: role of 5-HT3 and 5-HT2C receptors. **Rev. Brain Res.**, v. 1139, p. 178-194, 2007.
- MAGRANI, J. et al. Histaminergic H1 and H2 receptors located within the ventromedial hypothalamus regulate food and water intake in rats. **Rev. Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 79, p. 189-198, 2004.
- MAGRANI, J. et al. Central H1 and H2 receptor participation in the control of water and salt intake in rats. **Rev. Physiol. Behav.**, v. 84, p. 233-243, 2005.
- MAGRANI, J. et al. Involvement of central H1 and H2 receptors in water intake induced by hyperosmolarity, hypovolemia and central cholinergic stimulation. **Rev. Physiol. Behav.**, v. 89, p. 241-249, 2006.
- MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 85, p. 1185-06, 2007.
- MARTIN, L. J. et al. The bed nucleus-amygdala continuum in human and monkey. **J. Comp. Neurol.**, v. 309, p. 445–485, 1991.
- MASAHARU, N.; HIRAKI, S. Central regulation of body-fluid homeostasis. **Trends in Neurosc.**, v. 36, n.11, p. 661-73, 2013.
- MCKINLEY, M. J. et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, v. 172, p. 1-127, 2003.
- MCDONALD, A. J. Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 208, p. 401–418, 1982.
- MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Rev. Prog. Brain Res.**, v. 55, p. 257–332, 1998.

MCDONALD, A. J. et al. Cortical afferents to the extended amygdala. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 877, p. 309–338, 1999.

MCDONALD, A. J. Is There an Amygdala and How Far Does It Goes: na anatomical perspective. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 985, p. 1-21, 2003.

MERICKEL, A.; EDWARDS, R. H. Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. **Rev. Neuropharmacol.**, v. 34, p. 1543–1547, 1995.

MORIMOTO, T.; YAMAMOTO, Y.; YAMATODANI, A. Brain histamine and feeding behavior. **Rev. Behav. Brain Res.**, v. 124, p. 145–150, 2001.

MORGAN, R. K. et al. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3_ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. **J. Immunol.**, v. 178, p. 8081–8089, 2007.

MORRIS, J.S.; DEBONIS, M.; DOLAN, R.J. Human amygdala responses to fearful eyes. **Rev. Neuroim.**, v. 17, p. 214–222, 2002.

NA, E. S. et al. The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. **Rev. Brain Res.**, v. 1171, p. 104-110, 2007.

NARDI, A. E.; FREIRE, R. C.; ZIN, W. A. Panic disorder and control of breathing. **Rev. Resp. Physiol. & Neurobiol.**, v. 167, p. 133–143, 2009.

NASCIMENTO, A. I. R. et al. Central kappa opioid receptors modulate salt appetite in rats. **Physiol. & Behav.**, v. 106, n. 4, p. 506-514, 2012.

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.

NACHMAN, M. The inheritance of saccharin preference, **J. Comp. Physiol. Psychol**, v. 52, p. 451–457, 1959.

OCHSNER, K. N. et al. Rethinking feelings: na fMRI study of the cognitive regulation of emotion. **J. Cogn. Neurosci**, v.14, p. 1215–1229, 2002.

OTTOSON, A.; JANSEN, I.; EDVINSSON, L. Characterization of histamine receptors in isolated human cerebral arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v. 94, p. 901–907, 1988.

OUSDAL, O.T. et al. The human amygdala encodes value and space during decision making. **Rev. Neuroim.**, v. 101, p. 712–719, 2014.

PANULA, P. et al. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. **Rev. Neurosci.**, v. 28, n. 3, p. 585-610, 1989.

PANULA, P.; NUUTINEN, S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.14, n.7, p. 472-87, 2013.

PASCOE, J. P.; KAPP, B.S. Electrophysiological characteristics of amygdaloid central nucleus neurons during Pavlovian fear conditioning in the rabbit. **Rev. Behav. Brain Res.**, v. 16, p. 117–133, 1985.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1998.

PHILIPPU, A.; PRAST, H. Importance of histamine in modulatory processes, locomotion and memory. **Rev. Behav. Brain Res.**, v. 124, p. 151-159, 2001.

PITKANEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: AGGLETON, J.P. **The Amygdala: A Functional Analysis**. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 2000. p. 31–115.

PRELL, G.D. et al. Histamine metabolites in cerebrospinal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*): cisternal-lumbar concentration gradients. **J. Neurochem.**, v. 50, p. 1194–1199, 1988.

PRICE, J. L.; AMARAL, D. G. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. **J. Neurosci.**, v. 1, p. 1242–1259, 1981.

PRICE, J.L.; RUSSCHE, F.T.; AMARAL, D.G. **Handbook of Chemical Neuroanatomy: Integrated Systems of the CNS**. Amsterdam: Elsevier, v. 5, p. 279-388, 1987. Part 1.

PHILIPPU, A.; PRAST, H. Importance of histamine in modulatory processes, locomotion and memory. **Rev. Behav. Brain Res.**, v. 124, p. 151-159, 2001.

ROMAN, C.W.; DERKACH, V.A.; PALMITER, R.D. Genetically and functionally defined NTS to PBN brain circuits mediating anorexia. **Rev. Nat. Commun.**, v. 7, n. 11905, 2016.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Rev. Physiol.**, v. 83, p. 803–834, 2003.

SCHLICKER, E.; BETZ, R.; GÖTHERT, M. Histamine H₃-receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. Naunyn-Schmiede-berg's Arch. **Rev. Pharmacol.**, v. 337, p. 588-590, 1988.

SCHLICKER, E. et al. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H₃-receptors. Naunyn-Schmiede-berg's Arch. **Rev. Pharmacol.**, v. 340, p. 633-638, 1989.

SCHLICKER, E. et al. Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃-receptors. **J. Neural Transm.**, vol. 93, p. 1-10, 1993.

SCHWARTZ, J. C. et al. Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Rev. Physiol.**, v. 71, p. 1–51, 1991.

SEIFERT, R., SCHWANER, A. H. I.; BUSCHAUER, A. Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in HL-60 promyelocytes predominantly via H₂ receptors with a unique agonist/antagonist profile and induces functional differentiation. **Rev. Mol. Pharmacol.**, v. 42, p. 235–241, 1992.

SMITH, C. M.; LAWRENCE, A. J. Salt Appetite, and the Influence of Opioids. **Rev. Neurochem. Res.**, 2017.

- SMIT, M.J. et al. Inverse agonism of histamine H₂ antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H₂ receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 6802–6807, 1996.
- STEINBUSCH, H.W. et al. Histaminergic projections from the premammillary and posterior hypothalamic region to the caudate-putamen complex in the rat. **Rev. Brain Res.**, v. 368, p. 389–393, 1986.
- STRAKHOVA, M. I. et al. Localization of histamine H₄ receptors in the central nervous system of human and rat. **Rev. Brain Res.**, v. 1250, p. 41–48, 2009.
- STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 28, p.155–159, 2004.
- TAKEUCHI, Y.; SATODA, T.; MATSUSHIMA, R. Amygdaloid projections to commissural interneurons for masticatory motoneurons. **Rev. Brain Res. Bull.**, v. 21, p. 123–127, 1988.
- TANDON, S.; SIMON, S. A.; NICOLELIS, M. A.L. Appetitive changes during salt deprivation are paralleled by widespread neuronal adaptations in nucleus accumbens, lateral hypothalamus and central amygdala. **J. Neurophysiol.**, v. 108, p. 1089–1105, 2012.
- YAN, J. et al. Activation of mu-opioid receptors in the central nucleus of the amygdala induces hypertonic sodium intake. **Rev. Neurosci.**, v. 233, p. 28–43, 2013.
- YASUI, Y. et al. Amygdaloid axon terminals are in contact with trigeminal premotor neurons in the parvicellular reticular formation of the rat medulla oblongata. **Rev. Brain Res.**, v. 1016, p. 129–134, 2004.
- WATANABE, T.; YANAI, K. Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 195, n. 4, p. 197–217, 2001.
- WATANABE, E. et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Na(x) is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, n. 3, p. R568–R576, 2006.
- WEIHE E.; EIDEN L. E. Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. **FASEB J.**, v. 14, n. 2435–2449, 2000.
- WHALEN, P.J.; PHELPS, E.A. **The Human Amygdala**. New York, NY: Guilford Press, 2009.
- WIEST, G.; LEHNER-BAUMGARTNER, E.; BAUMGARTNER, C. Panic Attacks in an Individual With Bilateral Selective Lesions of the Amygdala. **Rev. Arch. Neurol.**, v. 63, p. 1798–1801, 2006.
- 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. **Rev. Brain Res.**, v. 654, p. 123–134, 1994.