



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

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MU- E DELTA- OPIOIDES NO ÓRGÃO
SUBFORNICAL (SFO) SOBRE O APETITE POR SAL**

ANDREI LUIS BORGES BELTRÃO MOITEIRO

**Salvador – Bahia
2017**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MU- E DELTA- OPIOIDES NO ÓRGÃO
SUBFORNICAL (SFO) SOBRE O APETITE POR SAL**

ANDREI LUIS BORGES BELTRÃO MOITEIRO

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.

M715p Moiteiro, Andrei Luis Borges Beltrão.
Participação dos receptores mu- e delta- opioides no órgão subfornical (SFO) sobre o apetite por sal / Andrei Luis Borges Beltrão Moiteiro. - 2017.
65 f. : il. ; 30 cm.

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

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

1. Sódio. 2. Receptores delta opioide. 3. Receptores delta mu opioide.
4. Apetite. I. Título.

CDU 615.241:323.4

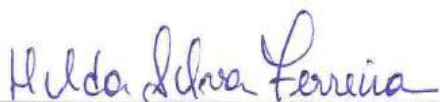
“PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES UM-E DELTA-OPIOIDES NO ÓRGÃO SUBFORNICAL (SFO)
SOBRE O APETITE POR SAL”

ANDREI LUIS BORGES BELTRÃO MOITEIRO

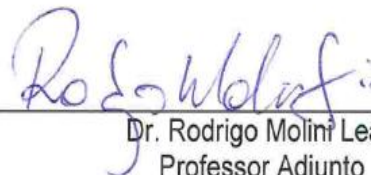
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 04 de dezembro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Hilda Silva Ferreira
Professora Titular
UNEB



Dr. Rodrigo Molinê Leão
Professor Adjunto
UFBA



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze
Professora Titular
UFBA

A realização deste trabalho contou com o apoio: Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB.

Dedico este trabalho à todos que me apoiaram,
de alguma forma, durante esse processo de
evolução pessoal!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro à Deus por ter me colocado no Laboratório de Neurociências da UFBA, por ter me iluminado e me reconfortado nos momentos difíceis ao longo dessa jornada.

Agradeço o apoio e dedicação do colegiado da pós- graduação de Patologia Humana e aos colaboradores da Biblioteca do Instituto Gonçalo Muniz- Fiocruz- Ba.

Do fundo do meu coração agradeço à minha orientadora professora Josmara Bartolomei Fregoneze, por ter me aceitado e acreditado em mim para essa longa e difícil jornada. Por está sempre presente "puxando minha orelha". Pelos ensinamentos que me fizeram ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório Camila, Emerson, Átila e Diana, pela amizade, as risadas, o apoio e cumplicidade durante a pesquisa e fora dela. Em especial à Daniele e Lucinez, minhas companheiras de curso, pesquisa, de tristezas e de alegrias... entramos juntos nessa e iremos sair juntos!

Grande agradecimento ao profissional bioterista e amigo, Sr. José de Souza, " seu Zé", por está sempre nos apoiado, tanto com seu profissionalismo, quanto com sua amizade.

Sou grato a minha família: Dona Nicinha (minha vó), ao meu irmão Bruno, minha tia Rai e minha mãe, por tudo que fizeram por mim todos esses anos, sem vocês nenhuma conquista seria possível.

Por fim, agradeço a minha amiga e namorada, Drielle. Obrigado por sempre está comigo nas horas de alegrias e tristezas, de certezas e incertezas, de conquistas e derrotas. Essa conquista é nossa.

Muito Obrigado!

"Antes de voar é preciso aprender bater as asas."

(autor desconhecido)

MOITEIRO, Andrei Luis Borges Beltrão. Participação dos receptores mu- e delta- opioides no órgão subfornical (SFO) sobre o apetite por sal. 65 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos sugerem que as vias opioidérgicas centrais desempenham papel no controle hidroeletrólítico através da ingestão de sal. O órgão subfornical (SFO) é uma área circunventricular que monitora centralmente os níveis circulantes de sódio no sangue e líquido cefaloraquidiano devido presença de receptores de sódio nesta área. Os níveis de concentração de sódio no sangue ou no líquido cefaloraquidiano causam ativação ou inativação dos neurônios GABAérgicos presentes no SFO, que por sua vez, a ativação dos neurônios GABAérgicos promovem aversividade a ingestão de sódio. Trabalhos tem mostrado que ocorre ativação de receptores opioides no SFO em animais submetidos a protocolos de depleção de sódio. Porém, ainda é pouco elucidado o papel dos receptores opioides, dentre eles, os receptores mu- e delta- opioides sobre o controle hidroeletrólítico central. **OBJETIVO:** Verificar se o apetite por sódio induzido por depleção deste íon depende da atividade endógena dos receptores mu- e delta-opioides e da interação com vias GABAérgicas no SFO. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados ratos Wistar (270 ± 20 g), submetidos a cirurgia estereotáxica para implante de cânula guia no SFO. Após 4 dias da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao protocolo de depleção de sódio, por administração de furosemida via subcutânea. Posteriormente ao protocolo de depleção de sódio foi fornecido ao animais alimentação hipossódica e água destilada por 24 h. No fim das 24 horas, foi administrado no SFO antagonista mu- opioide nas concentrações 3, 6 e 12 nmol/0,2µl e antagonista delta- opioide nas concentrações 1.5, 3 e 6 nmol/0,2 µl, após 15 min da administração das drogas foi fornecido bebedouro com água destilada e solução salina 1,5% iniciando o registro de ingestão cumulativa nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 6.0. Utilizou-se ANOVA - *two away* modelo misto para medidas repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações dos volumes ingeridos e teste “t” de Student não pareado para análise dos testes de comportamento. **RESULTADOS:** Os animais que receberam microinjeção de naloxone ou naltrindole no SFO tiveram redução estatisticamente significativa na ingestão cumulativa de salina hipertônica quando comparado aos animais do grupo controle. Quando verificou-se a relação dos receptores mu- e delta- opioides com os neurônios GABAérgicos, o bloqueio da ingestão de solução salina hipertônica promovida pela microinjeção de naltrindole no SFO foi abolida quando administrado antagonista dos receptores GABA na mesma área. Porém a mesma resposta não foi encontrada entre o bloqueio dos receptores GABA e bloqueio dos receptores mu-opioide. **CONCLUSÕES:** Os dados obtidos neste estudo sugerem que os receptores mu- e delta- opioides, presentes no SFO, participam na modulação do controle da ingestão de sódio. Também com base nos dados neste estudo, sugere-se que os receptores delta-opioides modulam a ingestão de sódio por via GABAérgica.

Palavras-chave: Ingestão de sódio; Receptor delta-opioide; Receptor mu-opioide; Depleção de sódio.

MOITEIRO, Andrei Luis Borges Beltrão. Participation of mu- and delta-opioid receptors in the subfornical organ (SFO) on salt appetite. 65 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Studies suggest that central opioidergic pathways play a role in hydroelectrolytic control through ingestion of salt. The subfornical organ (SFO) is a circumventricular area that centrally monitors circulating levels of sodium in the blood and cerebrospinal fluid due to the presence of sodium receptors in this area. The levels of sodium concentration in the blood or cerebrospinal fluid cause activation or inactivation of the GABAergic neurons present in the SFO, which, in turn, the activation of GABAergic neurons promote aversivity to sodium intake. Studies have shown that activation of opioid receptors occurs in SFO in animals submitted to sodium depletion protocols. However, the role of opioid receptors, among them, the mu- and delta-opioid receptors on central hydroelectrolytic control, is still little elucidated. **OBJECTIVE:** To verify if the sodium appetite induced by depletion of this ion depends on the endogenous activity of the mu- and delta-opioid receptors and the interaction with GABAergic pathways in the SFO. **MATERIAL AND METHODS:** Wistar rats (270 ± 20 g) were submitted to stereotaxic surgery to guide cannula implantation in SFO. After 4 days of stereotactic surgery, the animals were submitted to sodium depletion protocol, by administration of furosemide subcutaneously. Subsequently to the sodium depletion protocol, the animals received hyposodium and distilled water for 24 h. At the end of 24 hours, a mu- opioid antagonist at concentrations of 3, 6 and 12 nmol / 0.2 μ l and delta-opioid antagonist at concentrations of 1.5, 3 and 6 nmol / 0.2 μ l was administered to the SFO after 15 min of administration of the drugs was supplied with distilled water and 1.5% saline solution starting the cumulative intake record at times 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software. Two-way ANOVA was used for repeated measurements followed by the Bonferroni post-test for multiple comparisons of ingested volumes and unpaired Student's t test for analysis of behavioral tests. **RESULTS:** Animals receiving naloxone or naltrindole microinjection in the SFO had a statistically significant reduction in the cumulative intake of hypertonic saline when compared to the animals in the control group. When the mu- and delta-opioid receptors were correlated with the GABAergic neurons, the blockade of the hypertonic saline solution promoted by the microinjection of naltrindole in the SFO was abolished when administered GABA receptor antagonist in the same area. However, the same response was not found between GABA receptor blockade and mu-opioid receptor blockade. **CONCLUSIONS:** The data obtained in this study suggest that mu- and delta-opioid receptors, present in the SFO, participate in modulating the control of sodium intake. Also based on the data in this study, it is suggested that the delta-opioid receptors modulate the sodium intake by the GABAergic route.

Keywords: Sodium intake; Delta-opioid receptor; Mu-opioid receptor; Sodium depletion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	O mecanismo de osmoregulação. Mudanças na osmolaridade dos fluidos extracelular modula respostas homeostáticas que afeta o balanço de Na ⁺ (esquerda) e o balanço de água (direita).....	19
Figura 02	Conexões neurais no controle dos fluidos corporais. Em vermelho órgãos sensoriais que expressam NAX; Linhas verdes indicam conexões neurais envolvidas na liberação de vasopressina e em linhas azuis indicam conexões neurais pituitárias envolvidas no controle da ingestão de sal e água.....	20
Figura 03	Família de opioides endógenos.....	23
Figura 04	Ilustração da sinalização da ativação dos receptores opioides.....	25
Figura 05	Desenho experimental do teste de ingestão cumulativa de solução salina com administração de antagonista mu-opioide no SFO.....	34
Figura 06	Desenho experimental do teste de ingestão cumulativa de solução salina com administração de antagonista delta-opioide no SFO.....	34
Figura 07	Desenho experimental do teste de ingestão cumulativa de solução salina com administração de antagonista mu-opioide e antagonista GABA no SFO.....	34
Figura 08	Desenho experimental do teste de ingestão cumulativa de solução salina com administração de antagonista delta-opioide e antagonista GABA no SFO.....	35
Figura 9	Desenho experimental do teste de campo aberto com administração de antagonista mu-opioide no SFO.....	35
Figura 10	Desenho experimental do teste de campo aberto com administração de antagonista delta-opioide no SFO.....	36
Figura 11	Desenho experimental do teste de ingestão cumulativa de sacarina 0,1% com administração de antagonista mu-opioide no SFO.....	36
Figura 12	Desenho experimental do teste de ingestão cumulativa de sacarina 0,1% com administração de antagonista mu-opioide no SFO.....	36
Figura 13	Fotomicrografia mostrando o local da microinjeção dos antagonistas opioides mu- e delta- no SFO indicada pela seta vermelha.....	37
Figura 14	Imagem esquemática de um corte coronal do cérebro de rato onde a seta vermelha indica o posicionamento topográfico do SFO.....	37
Figura 15	Comparação da ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de Naloxone no SFO.....	38
Figura 16	Comparação da ingestão cumulativa de água destilada em animais depletados de sódio após microinjeções de Naloxone no SFO.....	39
Figura 17	Comparação da ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de Naltrindole no SFO.....	40
Figura 18	Comparação da ingestão cumulativa de água destilada em animais depletados de sódio após microinjeções de Naltrindole no SFO.....	41
Figura 19	Comparação da ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de Naloxone e Bicuculina no SFO.....	42
Figura 20	Comparação da ingestão cumulativa de água destilada em animais depletados de sódio após microinjeções de Naloxone e Bibiculina no SFO.....	44.

Figura 21	Comparação da ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em animais depletados de sódio após microinjeções de Naltrindole e Bicuculina no SFO.....	45
Figura 22	Comparação da ingestão cumulativa de água destilada em animais depletados de sódio após microinjeções de Naltrindole e Bicuculina no SFO.....	46
Figura 23	Comparação dos quadrantes percorridos em animais depletados de sódio após microinjeções de Naloxone no SFO.....	47
Figura 24	Comparação dos quadrantes percorridos em animais depletados de sódio após microinjeções de Naltrindole no SFO.....	48
Figura 25	Comparação da ingestão cumulativa de solução de sacarina 0,1% em animais privados de água após microinjeções de Naloxone no SFO.....	49
Figura 26	Comparação da ingestão cumulativa de solução de sacarina 0,1% em animais privados de água após microinjeções de Naltrindole no SFO.....	50

LISTA DE ABREVIACOES

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio anti-diurético
ANGII	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP	rea Postrema
AS	rea septal
ATP	Trifosfato de adenosina
BLA	Amígdala Basolateral
BST	Núcleo do leito da estria terminal
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclica,
CeA	Amígdala Central
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
CTAP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH ₂
CVOs	rgos circunventriculares
C	Graus celsius
DAMGO	d- Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol
fos-ir	Fos-imunoreativo
FURO-CAP	Furosemida+captopril
ICS-UFBA	Instituto de Ciências da Saúde- Universidade Federal da Bahia
ICV	Intra-crebroventricular
i.m.	Intramuscular
JNK	Jun N-terminal kinase
Kg	Quilogramas
LEC	Liquido extracelular
LH	Hipotálamo lateral
LIC	Líquido intracelular
LPBN	Núcleo para braquial lateral
min	Minutos
ml	Millitros
Mm	Milímetros
MnPO	Núcleo Pr-ptico Mediano
mRNA	cido Ribonucléico mensageiro
N	Noceptina
NAcc	NcleoAccumbens
NaCl	Cloreto de sódio
Nax	Receptores de sódio
Na ⁺ /K ⁺ - ATPase	ATPase canal de sódio / potássio atpase
Nmol	Nano molécula
NOR-BNI	Nor-Binaltorfinina
NTS	Núcleo do trato solitário
OFQ	Orfanina
OVLT	rgo Vasculosum da Lamina Terminal
p	Probabilidade de significância
POMC	Proopiomelanocortina

PVN	Núcleo Paraventricular
RLVM	Região Ventromedial do Bulbo
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SFO	Órgão Subfornical
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo Supraóptico
VP	Ventral Palidum
VTA	Área Tegmentar Ventral
WD-PR	Desidratação de água – Repleção parcial
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	EQILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO.....	17
2.1.1	Mecanismo Periférico de Controle do Equilíbrio Hidroeletrolítico.....	18
2.1.2	Mecanismo Central de Controle do Equilíbrio Hidroeletrolítico.....	19
2.2	OPIOIDES.....	22
2.2.1	Família Opioide.....	22
2.2.2	Receptores Opioides.....	24
2.2.3	Opioides no Comportamento Ingestivo.....	26
3	HIPÓTESES.....	29
4	OBJETIVOS.....	29
4.1	OBJETIVO GERAL.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	ANIMAIS.....	30
5.2	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	30
5.3	DROGAS E MICROINJEÇÕES.....	31
5.4	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	31
5.4.1	Teste de Ingestão de Sal.....	31
5.4.2	Teste de Campo Aberto.....	32
5.4.3	Teste de Sobremesa.....	32
5.5	HISTOLOGIA.....	33
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5.7	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
6	RESULTADOS.....	37
7	DISCUSSÃO.....	52
8	CONCLUSÃO.....	58
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
10	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O sódio é importante para determinar o gradiente osmótico dos espaços intracelulares e extracelulares, movendo a água para dentro ou para fora da célula, já que ele é soluto em maior concentração no espaço extracelular. A sede é desencadeada devido o aumento da pressão osmótica plasmática causada pela hipertoncidade nos compartimentos ou diminuição do volume extracelular, geralmente causadas por hemorragias, vômitos e diarreias (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; MCKINLEY e JOHNSON, 2004). O apetite por sódio envolve varias áreas cerebrais, neurônios e neurotransmissores. Os órgãos circumventriculares são áreas essenciais para detecção dos níveis circulantes de sódio. Em especial, o Órgão Subfornical (SFO) possui receptores para sódio e ANGII, além disso o SFO possui conexão com o terceiro ventrículo, por ser formado uma simples camada de células endimárias achatadas que possibilita verificar a concentração de sódio no líquido encefaloraquidiano. Outro fator importante desta área é a existência de barreira hematoencefálico fenestrada, isso permite a passagem moléculas do plasma, como o sódio, para o espaço intercelular, e assim ser detectado pelos receptores de sódio. (FITZSIMONS, 1998; MCKINLEY et al., 2003). A depleção de sódio gera um distúrbio no equilíbrio hidroeletrólítico, que por sua vez, causa ativação/inativação neuronal, como na inativação dos neurônios GABAérgicos que quando ativados provocam uma sensação não prazerosa ou seja, aversividade para a ingestão de sódio (HIYAMA e NODA, 2016), e liberação de neurotransmissores, como o opioide endogéno, que é principalmente expresso em áreas límbicas. Estudos com depleção de sódio tem mostrado ativação de receptores Mu-opioide por fos-ir em CVO's como SFO e Núcleo Pré-Ópítico Mediano (MNPO), e em áreas límbicas como núcleo Accumbens e Amígdala. Alguns estudos já mostraram que injeção intracérebro ventricular de antagonista dos receptores kappa- e delta- opioides inibiram a ingestão de solução salina em animais depletados sódio (NASCIMENTO et al., 2014 e 2012). Em outras áreas cerebrais como Amígdala Basolateral (BLA) foi mostrado que a ingestão de sódio por animais depletados deste íon foi inibida quando administrado antagonista do receptor kappa. Além disso, foi-se observado através do teste de reatividade ao sabor que a administração do antagonista kappa-opioide aumenta o impacto aversivo causado pela solução salina hipertônica. Os opioides endógenos tem sido envolvido no mecanismo do prazer que envolve motivação e recompensa, que tem sido amplamente discutido, pois é a base para o entendimento da dependência do uso de drogas de abuso. Porém pouco se sabe do envolvimento dos opioides no mecanismo do controle de manutenção do equilíbrio

hidroeletrolítico. Contudo nosso objetivo neste presente estudo foi verificar se o apetite por sódio induzido por depleção deste íon depende da atividade endógena dos receptores mu- e delta-opioides e da interação com vias GABAérgicas no SFO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO

Alterações na homeostasia dos líquidos corporais são informadas momento a momento ao sistema nervoso central. A regulação primária dos compartimentos líquidos corporais dá-se pela ingestão e excreção de água e eletrólitos pelos rins, assim, ajustes são necessários quando há desequilíbrio entre estas variáveis. O cérebro integra os sinais sensoriais e hormonais da periferia e dirige correções através de mudanças autonômicas, endócrinas e comportamentais. A sede e o apetite por sódio são comportamentos essenciais para correção da homeostasia hidrossalina (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; MCKINLE e JOHNSON, 2004). Na tentativa de equilibrar as perdas fisiológicas de água a ingestão de líquidos faz-se necessária, tal comportamento é apresentado como sede. Este mecanismo é indispensável para a sobrevivência animal, pois é a forma que organismo tem para manter as variáveis hidroeletrolíticas (MCKINLEY e JOHNSON, 2004). A sensação de sede origina-se no centro da sede, localizado nas porções anterior e ventromedial do hipotálamo. Homeostasia dos líquidos exige um mecanismo que mantém os eletrólitos, em especial o sódio, em total equilíbrio com a água, bem como uma apropriada distribuição destes nos espaços intracelular e extracelular. Quando ocorre a perda de água, geralmente esta água é perdida tanto do compartimento intracelular quanto do extracelular. (MCKINLEY e JOHNSON, 2004, MCKINLEY et al., 2004).

O sódio é importante para determinar o gradiente osmótico dos espaços intracelulares e extracelulares, movendo a água para dentro ou para fora da célula, já que ele é soluto em maior concentração no espaço extracelular. A sede é desencadeada devido o aumento da pressão osmótica plasmática causada pela hipertonidade nos compartimentos ou diminuição do volume extracelular, geralmente causadas por hemorragias, vômitos e diarreias.

2.1.1 Mecanismos Periféricos de Controle do Equilíbrio Hidroeletrólítico

Periféricamente, os receptores de sódio (Na_x) estão localizados na mucosa oral, próximos a veia porta hepática, trato gastrointestinal e rins. A estimulação da sede pelo espaço extracelular acontece pela diminuição do volume extracelular ou pressão sanguíneas, geralmente causadas por hemorragias, vômitos e diarreias. Os receptores de distensão estão localizados nos átrios, vasos pulmonares e nos rins, sinalizam alterações na pressão sanguínea. (MCKINLEY e JOHNSON, 2004; MCKINLEY et al., 2004; JOHNSON, 2008). Informações de desequilíbrios na osmolaridade vindos da periferia levados pelos nervos vago e glossofaríngeo até o núcleo do trato solitário (NTS), que por sua vez, projeta para outros núcleos do cérebro, SFO e Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT) que retransmite sinais osmóticos e hormonais para o núcleo pré óptico mediano (MnPO), este núcleo apresenta grande densidade de receptores de angiotensina do tipo I (AT1). Todos os estímulos chegam ao hipotálamo. A resposta osmótica dá-se pela estimulação da hipófise posterior de onde há liberação do hormônio anti-diurético (ADH). O ADH atua nos receptores v1 e v2 que atuam abrindo os canais de aquaporinas do tipo 2, localizados nos ductos coletores renais, promovendo a reabsorção de água nos rins, na tentativa de reestabelecer as variáveis em desequilíbrio.

O ADH ativa a liberação de aldosterona pelas glândulas supra-renais, que tem como função a manutenção do volume de fluidos extracelular, por conservação do Na^+ corporal, atuando nos ductos coletores dos rins, reabsorvendo Na^+ . O atrial natriurético peptídeo (ANP) é sintetizado no coração. O aumento da concentração circulante nos vasos sanguíneos promove a inibição da ingestão de água, além disso, possui um efeito inibitório sobre a estimulação da sede causada pela angiotensina. Com o passar dos anos, os níveis de ANP circulante aumentam, fazendo com que a percepção da sede diminua, por esse motivo, um indivíduo idoso bebe menos água do que um indivíduo jovem. (MCKINLEY e JOHNSON, 2004; JOHNSON, 2004; BOURQUE, 2008).

O mecanismo do controle periférico hidroeletrólítico pode ser melhor compreendido a partir da figura 1. Onde uma situação de hipertonicidade irá desencadear o aumento da natriurese, diminuição da ingestão de sódio, aumento da ingestão de água e aumento da reabsorção de água. Enquanto em situação de desequilíbrio hipotônico causa a diminuição da natriurese, aumento da ingestão de sódio, diminuição da ingestão de água e diminuição da reabsorção de água (BOURQUE, 2008).

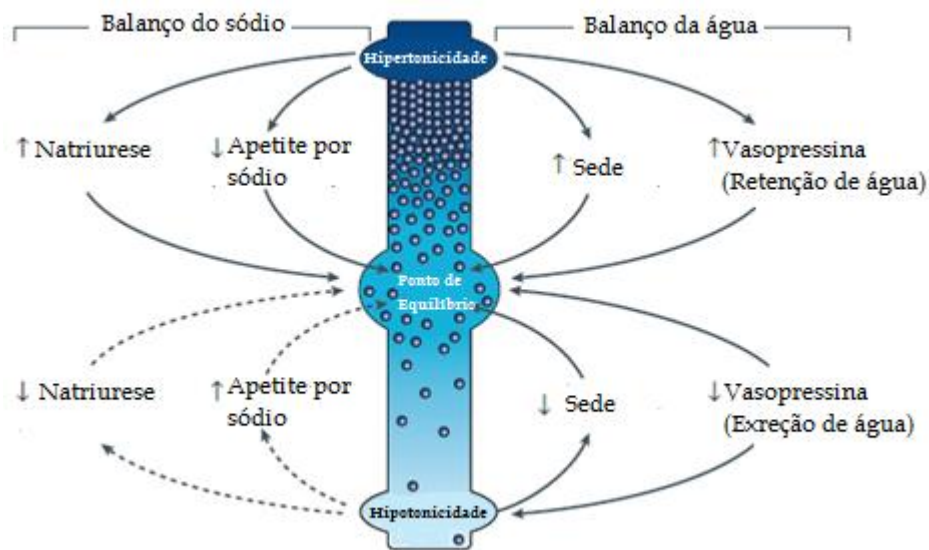


Figura 1. O mecanismo de osmoregulação. Mudanças na osmolaridade dos fluidos extracelular modula respostas homeostáticas que afeta o balanço de Na^+ (esquerda) e o balanço de água (direita) (BOURQUE, 2008).

2.1.2 Mecanismo Central de Controle do Equilíbrio Hidroeletrólítico

A lâmina terminal apresenta estruturas sensoriais que detectam alterações químicas, no líquido cefalorraquidiano, próximas aos ventrículos. Os órgãos circumventriculares (CVOs) são caracterizados por apresentarem barreira hematoencefálica diferenciada, isto se deve aos capilares fenestrados que permitem a passagem de substâncias de elevado peso molecular do plasma para o parênquima cerebral (ENGELHARDT, 2003) e apresentarem receptores para renina e angiotensina. Os CVOs incluem: área postrema (AP), o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o órgão subfornical (SFO). O núcleo pré-óptico mediano (MnPO) é uma estrutura importante na regulação central do apetite por sódio e da pressão arterial, não integra os CVOs mas está localizado entre o OVLT e SFO compondo a lâmina terminal (FITZSIMONS, 1998; MCKINLEY et al., 2003).

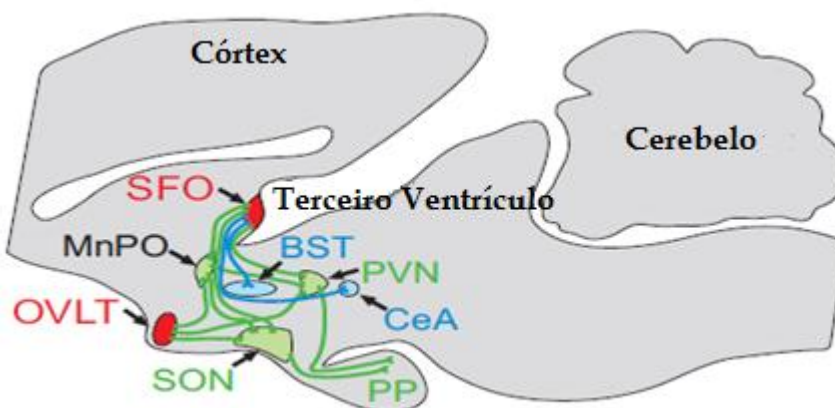


Figura 2. Conexões neurais no controle dos fluidos corporais. Em vermelho, órgãos sensoriais que expressam Nax; Linhas verdes indicam conexões neurais envolvidas na liberação de vasopressina e em linhas azuis indicam conexões neurais pituitárias envolvidas no controle da ingestão de sal e água (NODA, 2014).

O SFO é um tecido situado dorsalmente da parede anterior do terceiro ventrículo, que faz parte do fornix. A parte caudal do SFO é limitado pelo plexo coroide. Caracteriza-se o SFO pela presença de canais de sódio (Nax) nas células endoteliais e astrócitos o que as tornam sensíveis as variações de concentração de sódio, pois o aumento nas concentrações de sódio promove a abertura dos Nax (HIYAMA et al., 2002; WATANABE et al., 2006), além da presença de corpos de neurônios predominante GABAérgica (WATANABE et al., 2006) e de uma barreira hematoencefálica fenestrada que permite a passagem de componentes do plasma para o espaço intercelular. Estudos apontam que no SFO ocorre uma angiogênese constante, o que favorece a permanência dos capilares fenestrados (MORITA et al., 2015; MIYATA, 2015). Como pode ser visto na figura 2, o SFO possui neurônios que enviam eferências para diversos núcleos relacionados ao controle da ingestão de sódio e controle cardiovascular, como: MnPO, OVLT, supraóptico, núcleo da estria terminal, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo parabraqueal (PBN) (GUI-BAO GU e GONG JU, 1995; CHARANJIT KAUR e ENG-ANG LING,2017). Ainda possui contato com o líquido cefaloraquidiano, por ser formado uma simples camada de células endoteliais achatadas, que não possuem cílios copiosos e tem junções apertadas entre as células adjacentes, que bloqueiam a difusão entre o parênquima do SFO e o terceiro ventrículo. Essas características estruturais devem ser fundamentais para SFO desempenha um papel fundamental no monitoramento do equilíbrio hidroeletrólítico. (MCKINLEY, 2003; NODA, 2014; HIYAMA, 2016).

Em animais desidratados, ou em alta do consumo de sal, aumenta-se a concentração de sódio no plasma e/ou LCR levando abertura dos Nax, e consequentemente a ativação da

bomba Na^+/K^+ -ATPase nos astrócitos e células endoteliais, tendo como produto final da glicólise anaeróbica, o lactato. O lactato é fornecido para os neurônios como substrato energético para regular a atividade dos neurônios gabaérgicos, pois o lactato nos neurônios é oxidado e assim ocorre o aumento de ATP intracelular. O aumento de ATP intracelular inativa os canais de K sensíveis a ATP, proporcionando assim, ativação dos neurônios GABAérgicos que leva a uma aversão a salina (HIYAMA e NODA, 2016). A presença de receptores de ANGII em alguns neurônios colabora para a atividade no SFO na regulação da concentração de sódio. Estudos mostraram que as injeções ICV de ANGII estimularam a atividade de dos CVO's para ingestão de salina.

Animais submetidos a protocolos distintos que estimulam a sede como, privação hídrica, hipovolemia induzida por injeção subcutânea de polietilenoglicol e hipertonicidade induzida por sobrecarga intragástrica de sal, ao receberem injeções ICV de naloxone ou nor-BNI, antagonistas dos receptores mu e kappa, respectivamente, não alterou a ingestão de água. (GOSNEL et al., 1990; LUZ et al., 2009). Gosnell e Marjchrzak (1990) sugerem que preferência por sal seja mediada por opióides centrais.

O apetite por sódio e a sede são comportamentos necessários para reestabelecimento do LIC e LEC frente a desequilíbrios na homeostasia hidrossalina, são modulados por alguns neurotransmissores e/ou neuromoduladores no SNC através de receptores localizados nas áreas envolvidas na regulação destes comportamentos. Diversos estudos mostram o envolvimento das vias de neurotransmissão central angiotensinérgica, serotoninérgica, GABAérgica, histaminérgica, colinérgica e adrenérgica no controle da homeostasia hidrossalina (SAAD et al., 2006; LUZ et al., 2006; LUZ et al., 2007; HENRY e MOUGINOT, 2009; MAGRINI et al., 2005; KOLAJ et al., 2004), entretanto os estudos envolvendo os opióides, especialmente em áreas específicas, são escassos e pouco elucidativos.

2.2 OPIOIDES

2.2.1 Família Opioides

Desde os tempos antigos, o homem utiliza compostos naturais em rituais sociais e cerimônias religiosas, compondo a cultura de diversos povos nas mais variadas regiões do mundo. A *Papaversomniferum L.*, conhecida como papoula dormideira, pertence à família da *Papaveraceae* é originária da Ásia Menor utilizada na alimentação, rituais religiosos e fins medicinais no antigo Egito, Mesopotâmia, Pérsia, Assíria, Babilônia, Grécia e Roma, seu cultivo, se estende da China à Turquia e sudoeste asiático (DUARTE, 2005). A papoula é uma planta perene de hábito herbáceo apresenta caule alto e ramificado, folhas sésseis e ovaladas, suas flores são grandes, de cores variadas, e o fruto capsulado (BODNAR, 2013).

Em 1803, o alemão Friedrich Serturmer descobriu e isolou o componente ativo do ópio, a morfina, e em 1827 tem-se início sua produção comercial. Desde então o interesse pelos opioides cresceu e antes mesmo da identificação dos opioides endógenos, surgia evidências da presença de estruturas celulares com capacidade de reconhecer diferentes substâncias com certo grau de especificidade (MARTINA, et al., 2012).

Nos anos 40, surgiram os antagonistas opioides naloxona e naltrexona. Em 1973, dois pesquisadores norte-americanos, Pert e Snyder, demonstraram a existência de receptores específicos da naloxona no cérebro e no intestino de cobaias. Momento importante foi a identificação de um fator do opiáceo endógeno, que foi nomeado de endorfina (HUGUES et al., 1975). Posteriormente, foi descoberto que esse fator representava duas moléculas, dois pentapeptídeos que possuem relação estrutural, Tyr- Gly- Gly- Phe- Met e Tyr- Gly- Gly- Phe- Leu. Sendo denominados de Metionina-encefalina e Leucina-encefalina, respectivamente. Mais tarde foi identificado que todos opiáceos são caracterizados por terem um terminal-amino, Tyr- Gly- Gly- Phe- [Met/Leu], que é seguido de várias extensões terminais carboxil, que resulta peptídeos que variam em comprimento de 5 a 31 (AKIL et al., 1998).

A β -endorfina e dinorfina A, membros da família de endorfinas, foram extremamente importantes no curso da história dos opioides, pois no mapeamento anatômico dessas moléculas, revelou as distribuições atômicas diferentes, sendo assim, surgindo que eles são sintetizados e expressados separadamente. Essas sugestões foram esclarecidas após a clonagem dos 3 precursores. O primeiro a ser clonado foi proopiomelanocortina (POMC), precursor comum da proteína para β -endorfina, bem como Hormônio do estresse, ACTH. A

observação de que um determinado precursor pode dar origem a múltiplos peptídeos ativos se tornou verdade para outros dois precursores de opioides. Primeiramente, a Proencefalina que codifica múltiplas cópias de Met-enkefalina, incluindo duas extensas formas de Met-enkefalina, heptapeptídeos e octapeptídeo e uma cópia de Leu-enkephalin. Enquanto, o outro precursor Pro-dinorfina codifica três peptídeos opióides: dinorfina A, dinorfina B e neodinorfina, como mostra a Figura 4. (AKIL et al., 1998 e NAKANISHI et al., 1979). Família mais recente identificada foi a das orfaninas, que é composto por heptadecapeptídeo descobertos em cérebros de ratos e suínos, que foram denominados nociceptina e FQ de orfanina, respectivamente. Esses neuropeptídeos, N / OFQ, tem um alto grau de similaridade com o heptadecapéptidodinorfina, ligante endógeno dos receptores kappa (ZAVERI, 2016).

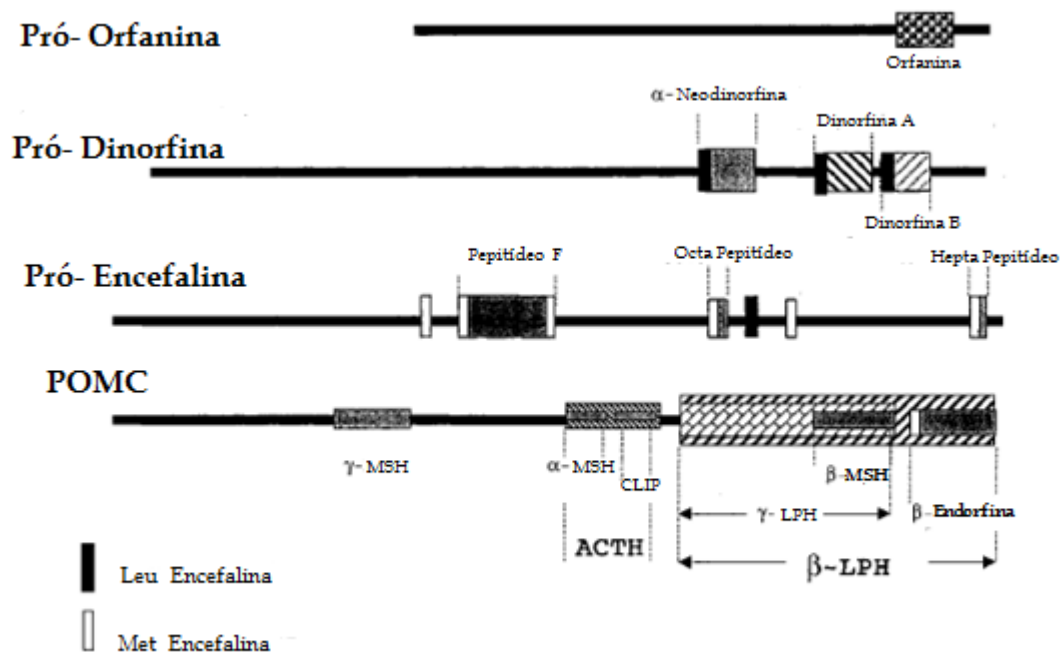


Figura 3. Família de opioides endógenos. Fonte: (AKIL, 1998)

Endorfinas, dinorfinas, encefalinas e orfaninas são opioides endógenos sintetizados pelo sistema nervoso central (SNC), a partir dos precursores, pró-opiomelanocortina, pró-dinorfina, pro-encefalina, pró-orfanina FQ, respectivamente. Estes neuropeptídeos diferem quanto à distribuição, seletividade do receptor e seu papel neuroquímico (KANDEL et al., 2013). As endorfinas que são encontradas estão amplamente distribuídas no SNC, no telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo e medula espinhal, dentre os núcleos presentes nessas regiões estão os núcleos relacionados ao controle hidroeletrólítico, como amígdala, MnPO, SON, PVN e NTS, vistos na tabela abaixo (MANSOUR, 1988). Os peptídeos opioides podem agir como neurotransmissores ou neuromoduladores e são distribuídos por todo o

SNC, contudo os estudos envolvendo a participação neuropeptídeos opioides e mecanismos de controle central ainda são contraditórios, o que fomenta o interesse pela investigação.

2.2.2 Receptores Opioides

Os receptores opioides são classificados em quatro tipos de receptores: mu (μ), kappa (κ), delta (δ) e sigma (σ), todos pertencentes à família de receptores acoplados a proteína G. Sendo os receptores mu, kappa e delta são os mais estudados.

Estruturalmente os receptores opioides possuem um domínio N-terminal extracelular, com 3 domínios extracelular e 3 domínios intracelular e uma cauda C-terminal intracelular, formando um quarto loop intracelular. Presume-se que as 7 hélices transmembrânicas dos receptores opioides estão dispostas seqüencialmente em sentido anti-horário formando uma pacote helicoidal apertado. Os domínios extracelulares proporcionam uma interface dinâmica para a ligação de vários ligantes opioides. Os receptores opioides apresentam 60% de homologia entre eles, sendo maior homologia nas hélices transmembrânicas e a maior diferença está nos seus terminais N e C e nos `loops` extracelulares (CHEN et al., 1993; WALDHOER et al., 2004). Contudo, os quatro receptores opioides possuem duas cisteínas conservadas no primeiro e segundo laços extracelular, possivelmente formam uma ponte de dissulfeto (WALDHOER et al., 2004).

O acoplamento de agonistas dos receptores opioides desencadeia varias respostas celulares através de segundos mensageiros. Estudos apontam que a proteína G acoplada aos receptores opioides exercem um papel inibitório na ativação dos receptores mu, delta e kappa-opioides sobre o sistema de adenilciclase (CHILDERS, 1993; POLASTRON, 1990; SATOH, 1995; NESTLER, 1996 ; AL-HASANIA e BRUCHAS, 2011). Outros eventos que ocorrem contidos na ativação dos receptores opioides são a redução da excitabilidade celular e diminuição da liberação de neurotransmissores devido a inibição dos canais de Ca^{+} voltagem dependente e hiperpolarização de membrana causado por aumento da condutância do K^{+} (SEWARD, 1991 e NOTH, 1987). Junto aos eventos citados acima, a ativação dos receptores opioides desencadeia a fosforilação da proteína G acoplada ao receptor, todos os efeitos da ativação do receptor opioide desencadeia a cascata de transdução de sinal pelo MARK. O MARK sinaliza varias respostas extracelulares através das kinases: c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK e kinase1 e 2(ERK 1/2). As kinases JNK e p38 estão envolvidas com

processos inflamatórios, ativação de citocinas e neuropatia da dor (KARANDIKAR e COOB, 1999; AL-HASANIA e BRUCHAS, 2011). Enquanto a kinase ERK 1/2 não tem função bem esclarecida, porém estudos sugerem relação com resposta de recompensa. Entretanto os receptores opioides são considerados excitatórios, pelo fato de inibirem uma inibição causada pelos neurônios GABAérgicos (SATO 1995). A ativação dos opioides seja por ligantes endógenos ou exógenos, resulta em múltiplos efeitos, como analgesia, depressão respiratória, euforia, alimentação, liberação de hormônios, inibição do transito gastrointestinal e ansiedade.

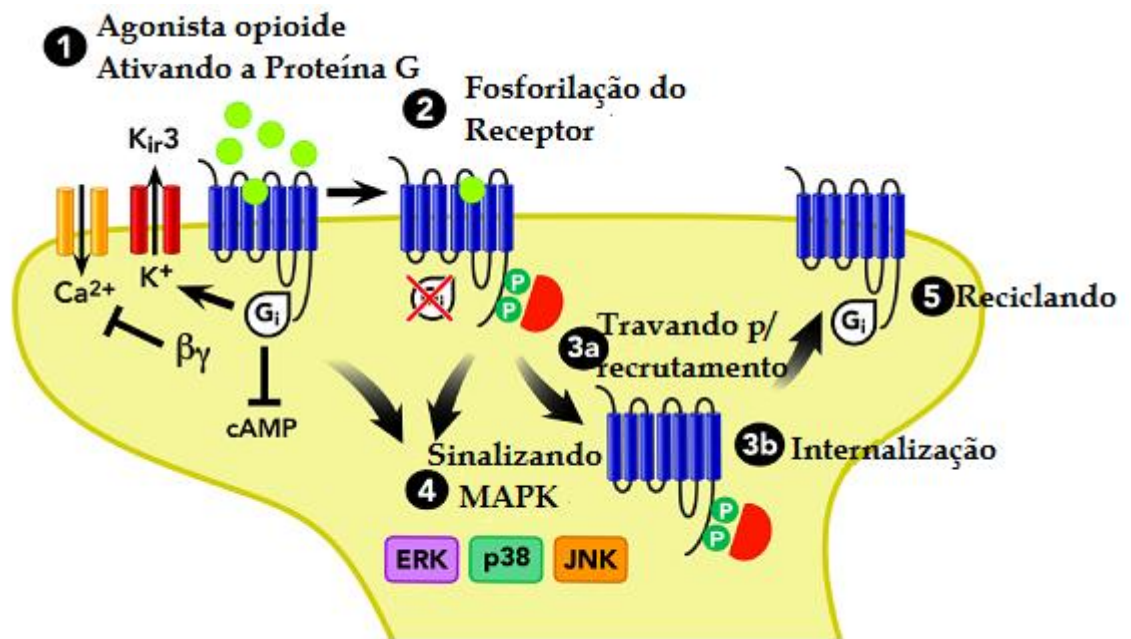


Figura 4. Ilustração da sinalização da ativação dos receptores opioides. Todos os 4 subtipos dos receptores opioides mu, delta, kappa e ORL1 compartilham o mesmo caminho. A ativação dos receptores opioides pode levar a sinalização de um ou mais eventos. As setas referem-se ao passo de ativação; a linha em T refere-se ao passo de bloqueio ou inibição de função. Abreviações: α - subunidade alfa da proteína G, βγ - subunidade beta-gama da proteína G, cAMP- adenosina monofosfatocíclica, sinalização extracelular regulados por kinase, JNK - c-Jun N-terminal kinase, p38 - p38 MAPK e kinase 1 e 2(ERK 1/2). Fonte: (AL-HASANIA E BRUCHAS, 2011).

O receptor opioide do tipo mu está distribuído por todo o SNC, especialmente em áreas envolvidas na função motora e sensorial, como o córtex, caudado putâmen, núcleo acumbens, complexo amigdalóide e substância cinzenta periaquiductal (MC DONALD e LAMBERT, 2005). A morfina é o agonista mais conhecido do receptor mu-opioide; os agonistas destes receptores produzem analgesia tanto por mecanismos pré-sinápticos quanto

pós-sinápticos (MC DONALD e LAMBERT, 2005; FIELDS, 2004). Os receptores mu-opioides estão presentes em todo o circuito central da dor, incluindo a ínsula, hipotálamo e região ventromedial do bulbo (RLVM) (FIELDS, 2004), são atribuídos aos agonistas, depressão respiratória, inibição de secreções do trato gastrointestinal e peristaltismo (MC DONALD e LAMBERT, 2005)

Diversos estudos apontam o envolvimento dos receptores opioides do tipo delta na analgesia, funções cognitivas e ansiedade. Tais receptores são encontrados de maneira ampla no SNC, em regiões como o córtex, núcleos da ponte, complexo amigdalóide (GOZZANI, 1994; KIEFFER e EVANS, 2009). Microinjeções do agonista encefalina no núcleo do trato solitário de gatos promoveu diminuição da pressão arterial, frequência cardíaca e frequência respiratória (HASSEN et al., 1982).

Os receptores kappa-opioides são encontrados no caudado putâmen, complexo amigdalóide, núcleo accumbens, hipotálamo, tálamo, neurohipófise, eminência média e núcleo do trato solitário (NTS) (GOZZANI, 1994; MC DONALD e LAMBERT, 2005; BODNAR, 2013).

2.2.3 Opioides no Comportamento Ingestivo

De acordo com o subtipo de receptor e sua localização no SNC, algumas ações são notórias, pois é observado através de vários estudos, que a ativação de áreas prosencefálicas (VTA, NAcc, VP e Complexo Amigdalóide) e áreas hipotalâmicas (SFO, MnPO, OVLT e área septal) tem efeito estimulatório no comportamento ingestivo, na contra mão, áreas rombencefálicas (NTS e LPBN) possuem tônus inibitório. Os opioides endógenos tem sido relacionados com a avaliação hedônica da palatabilidade dos alimentos (ZHANG e KELLEY, 2000). Na Amígdala Basolateral (BLA) os opioides endógenos são fundamentais para a ocorrência do desejo por sacarose, enquanto a ativação dos receptores opioides nos núcleo Accumbens (NAcc) e Ventral Palidum (VP) aumentam a palatabilidade à sacarose (WASSUM et al., 2009). Confirmando essa hipótese, microinjeções no núcleo Accumbens do antagonista naltrindole inibe a ingestão de sacarose e enquanto injeções ICV do agonista deltorfina aumenta a ingestão de sacarose (LEVENTAHL et al., 1995; RUEGG et al., 1997). Além disso, estudos sugerem que o sistema de opioides endógenos no NAcc são a chave para o consumo de álcool (ZHANG e KELLEY, 2000 ; KATSUURA et al., 2011), isso pode estar relacionado ao fato de que a estimulação dos receptores mu e delta opioides no NAcc aumentam os níveis extracelulares de dopamina (HIROSE et al., 2005). Em Inui e Shimura

(2014), foi verificado que os receptores opioides localizados em terminais neuronais GABAérgicos no VP quando bloqueados, aumentam a ingestão de sacarina. Esta resposta sinérgica também foi observada no estudo de Ardianto et al. (2016), onde injeções no hipotálamo lateral dos antagonistas dos receptores mu e kappa opioides inibiram o comportamento alimentar e este efeito parece depender do sistema GABAérgico. Periféricamente a interação GABA/opioide pode ser observada nos efeitos da administração intraperitoneal de agonista GABA_B que sozinho reduz palatabilidade à ingestão de alimentos hipercalóricos e hipercalórico-doce. A associação da administração intraperitoneal de agonista GABA_B com a administração do antagonista delta-opioide, intensifica a alteração do comportamento ingestivo quando comparado ao GABA sozinho. (AYENA et al., 2014). Em outro estudo, o tratamento periférico com antagonista mu-opioide reduz a palatabilidade de alimentos gordurosos, provavelmente por diminuir as propriedades motivacionais que causam a compulsão alimentar que está diretamente relacionada à obesidade (GUILIANO et al., 2012). Os opioides tem modulado a liberação de neurotransmissores, como a dopamina, e o comportamento ingestivo de alimentos que possuem impacto hedônico positivo, como exemplo alimentos doces e gordurosos.

Estudos apontam que os receptores opioides além do papel no controle da ingestão alimentar, também estejam envolvidos com o equilíbrio hidroeletrólítico (BLOORI et al., 1991). Normalmente, soluções de altas concentrações de sódio são aversivas, como pode ser verificado em estudos de padrões comportamentais orofaciais à administração oral de salina, que desencadeia comportamento característico negativo à ingestão (aversividade/desagradável) em animais repletos de sódio. Porém esses padrões na palatabilidade de impacto aversivo ao sódio são modificados para padrões comportamentais de impacto positivo, hedônicos, frente a depleção de sódio. Estes dados sugerem que a depleção de sódio causa mudanças em áreas cerebrais que codificam a recompensa (HURLEY e JONHSON, 2015). Uma área importante no circuito da recompensa é a amígdala, a ativação dos receptores mu-opioides na Amígdala Central (CeA) aumenta a ingestão de solução hipertônica, enquanto, o bloqueio deste receptores no mesmo nucleo inibe a ingestão(YAN, et al., 2013) Estudos do laboratório de neurociências (ICS-UFBA) mostram que injeções ICV dos antagonista Nor-Binaltorfinina (NOR-BNI) e Naltrindole promovem efeito antinatriorexigênico em ratos depletados de sódio (NASCIMENTO et al., 2014 e 2012;). A nível periférico a administração de agonistas e/ou antagonista opioides também modifica a ingestão de salina. Observou-se que injeção intraperitoneal de agonista dos receptores mu-opioides em animais depletados de sódio, aumentou a ingestão de solução hipertônica

enquanto o antagonista inibiu a ingestão. Além disso, o uso do antagonista mu-opioide, periféricamente, diminuiu o impacto positivo da salina hipertônica em animais depletados de sódio que apresentaram redução à ingestão de salina hipertônica (NA et al., 2012). Grondin et al.(2011) sugere que o aumento de mRNA de receptores mu-opioide no SFO em resposta a depleção de sódio indica possível modulação na ingestão de sódio por estes receptores. A participação dos receptores opioides no controle central da homeostasia hidrossalina ainda são pouco esclarecedoras, especialmente no que concerne o envolvimento dos receptores mu e delta opioides em áreas CVO's, assim sendo, no presente estudo focamos a participação destes receptores localizados no SFO no controle da ingestão de sódio.

3 HIPÓTESE

A depleção de sódio ativa vias opioidérgicas no SFO que inibem a atividade de vias gabaérgicas resultando em aumento do apetite por sódio a fim de reestabelecer o balanço hidrossalino.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o apetite por sódio induzido por depleção deste íon depende da atividade endógena dos receptores mu- e delta-opioides e da interação com vias gabaérgicas no SFO.

4.2 OBJETIVO ESPECIFICO

Específico 1: Verificar se a atividade dos receptores mu-opioides endógenos está envolvida no apetite por sódio observado em condição de depleção deste íon.

Específico 2: Verificar se a atividade dos receptores delta-opioides endógenos está envolvida no apetite por sódio observado em condição de depleção deste íon. .

Específico 3: Verificar se os receptores mu-opioides endógenos reduzem a atividade inibitória do GABA sobre o apetite por sódio.

Específico 4: Verificar se os receptores delta-opioides endógenos reduzem a atividade inibitória do GABA sobre o apetite por sódio.

Específico 5: Avaliar se a inibição da ingestão de sódio causada pelo receptor mu-opioides corre em função de impedimento locomotor;

Específico 6: Avaliar se a inibição da ingestão de sódio causada pelo receptor Delta opioide ocorre em função de impedimento locomotor;

Específico 7: Avaliar se receptores mu-opioides no SFO interfere com o apetite por soluções palatáveis de forma inespecífica ou se altera especificamente o apetite por sódio.

Específico 8: Avaliar se receptores delta-opioides no SFO interfere com o apetite por soluções palatáveis de forma inespecífica ou se altera especificamente o apetite por sódio.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados no estudo ratos, Wistar, com peso entre 250 a 270 gramas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de 22 ± 2 °C e luz controlada com período de claro/escuro de 12 horas (luz das 07h às 19h) com ração (Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, Brasil), água destilada e salina hipertônica (1,5%) *ad libitum*. O número de animais utilizados nos experimentos foi previamente calculado e os protocolos experimentais estão de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS-UFBA) para apreciação e subseqüente autorização.

5.2 CIRURGIA

Na realização da cirurgia estereotáxica todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com a combinação de cetamina - xilazina (80-7mg/kg). Quando anestesiados, os animais tiveram a cabeça tricotomizada, posteriormente colocados no aparelho estereotáxico para implante de uma cânula no SFO. Para a cirurgia de canulação utilizou-se cânula de 13 mm, de acordo as coordenadas estereotáxicas: anteroposterior – 0,9 mm posterior ao bregma, lateral 0,0 mm e vertical - 4,8 mm a partir do crânio. (WATSON e PAXINOS, 1998).

As cânulas utilizadas na cirurgia central foram confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável, com diâmetro de 0,7 mm, fixadas no crânio comacrílico dentário auto-polimerizante. Após este procedimento, a cânula foi ocluída com mandril removível, confeccionado com fio de aço inoxidável, para prevenir a obstrução da mesma ou fazer dela uma via de acesso para infecção. O pós cirurgico dos animais foi realizada com doses profiláticas de pentabiótico veterinário Fort-Dogde (Benzilpenicilinabenzatina; Benzilpenicilina procaína; Benzilpenicilina potássica; Diidroestreptomicina base; Estreptomicina base), na dose de 0,2 ml/Kg, e anti-inflamatório e analgésico flunixinameglumina e na dose de 0,1 ml/100g, ambos por via intramuscular (i.m.). Em seguida, os animais foram acomodados em caixas plásticas individuais, onde foram

manipulados diariamente durante o período de recuperação cirúrgica, em uma simulação das condições experimentais aos quais foram submetidos, a fim de reduzir o estresse. As caixas, os mandris e os bebedouros de água filtrada foram trocados diariamente. No quarto dia após as cirurgias era dado início a realização das sessões experimentais.

5.3 DROGAS E MICROINJEÇÕES

Foram utilizadas as seguintes drogas: antagonista dos receptores mu-opioide, naloxone, nas concentrações de 3, 6 e 12 nmol/0,2µl, antagonista dos receptores delta opioide, naltrindol, nas concentrações de 1,5, 3 e 6 nmol/0,2 µl, antagonista dos receptores GABA, bicuculina, 2nmol/0,2 µl, diurético de alça, furosemida (Lasix), na dose de 20mg/rato e solução fisiológica isotônica (NaCl 0,9%) como veículo. As microinjeções centrais foram efetuadas através de uma seringa de 10 µl (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica nº 30G com 14 mm no SFO, através de um tubo de polietileno (PE10). O volume injetado foi de 0,2 µl durante aproximadamente sessenta segundos.

5.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.4.1 Teste de Ingestão de Sal

Os animais foram submetidos a cirurgia esterotáxica e nos 3 dias seguintes foram mantidos com ração, água destilada e solução salina hipertônica de 1,5%. No quarto dia os animais foram depletados com injeção subcutânea de furosemida, um diurético de alça que inibe o transportador Na⁺K⁺2CL reduzindo a reabsorção destes eletrólitos e de água. Os animais foram mantidos por 240 min em caixas com papel absorvente que era trocado a cada hora. Posteriormente, foram transferidos para caixas com maravalha e permanecerem por 24 h com água destilada e dieta hipossódica (fubá de milho cozido com água destilada). Ao quinto dia os animais foram submetidos aos testes experimentais nos quais foram divididos em 4 grupos. Os animais do **grupo 1** receberam microinjeções no SFO de naloxone nas concentrações de 3, 6 e 12 nmol/0,2 µl ou salina isotônica. O **grupo 2** foi submetido as mesmas condições, mas os ratos receberam microinjeções no SFO de naltrindole 1,5, 3,0 e 6,0 nmol/0,2 µl ou salina isotônica. O **grupo 3** os animais depletados de sódio receberam 2 injeções no SFO: primeiro

naloxone 12 nmol/0,2 µl e 15 min depois bicuculina 2 nmol/0,2 ou naloxone 12 nmol/0,2 µl + salina ou, no controle, salina + salina. O **grupo 4** os animais depletados de sódio receberam 2 injeções no SFO: primeiro naltridole 6 nmol/0,2 µl e 15 min depois bicuculina 2 nmol/0,2 ou naltridole 6 nmol/0,2 µl + salina ou, no controle, salina + salina. Após 15 min das microinjeções, foram oferecidos bebedouros com solução salina 1,5% e água destilada e o volume ingerido foi registrado nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min.

5.4.2 Teste do Campo Aberto

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica e nos 3 dias seguintes permaneceram com o fornecimento de ração, água destilada e solução salina hipertônica de 1,5%. No quarto dia os animais foram depletados com injeção subcutânea de furosemida, sendo mantidos por 240 min em caixas com papel absorvente. Em seguida, foram transferidos para caixas normais para permanecerem por 24 h com alimento hipossódico e água destilada como no protocolo anterior. No dia teste, os animais controle receberam microinjeção de 0,2µl de salina 0,9% no SFO , enquanto os animais do grupo teste receberam microinjeções de 0,2 µl de naloxone 12 nmol ou naltrindol 6 nmol no SFO. Após 15 min da administração das microinjeções, cada animal foi colocado por 10 min na caixa teste. A caixa teste tem o piso demarcado em 8 quadrantes que servem para avaliar a motilidade do animal através da quantificação da sua passagem por eles. Uma passagem pelo quadrante é considerada apenas quando o animal coloca as 4 patas dentro do mesmo.

5.4.3 Teste de Sobremesa

Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica e nos 3 dias seguintes permaneceram com o fornecimento de água filtrada e ração. Durante este período os animais foram treinados para ingestão de sacarina que consistia em mudar o animal para uma caixa forrada com papel absorvente com fornecimento de dois bebedouros, um com água destilada e outro com sacarina 0,1% durante 2 horas. No quarto dia, foi retirado o bebedouro de água filtrada, assim, os animais permaneceram por 24h apenas com ração até o início do teste. No dia teste, os animais controles receberam microinjeção de 0,2µl de salina 0,9%no SFO, enquanto os animais do grupo teste receberam microinjeções de 0,2 µl de naloxone 12 nmol ou naltrindol 6 nmol no SFO. Após as injeções os animais foram colocados em caixas com papel absorvente. Após 15 min da administração das microinjeções, foram fornecidos dois

bebedouros, um com água destilada e outro com sacarina 0,1% sendo registrada a ingestão cumulativa por 120 min.

5.5 HISTOLOGIA

Após as sessões experimentais os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia por perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida por formol 10%, após o procedimento, os cérebros foram removidos e mergulhados em solução salina 0,9% e refrigerados, 24 horas depois, transferidos para solução de formol glicosado a 30%, onde ficaram estocados e refrigerados por 48 horas. Após este período os cérebros foram cortados por técnica de congelamento no criostato, montados em lâminas gelatinadas e secos em estufa a 50°C. Após secagem, os cortes foram corados com cresil violeta para posterior verificação do posicionamento das cânulas. Apenas os dados referentes aos ratos cujas injeções atingiram o SFO os dados dos animais cujas injeções atingiram o ventrículo não foram consideradas (20%).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de todos os dados obtidos foi realizada através do programa GraphPad versão 6.0. Para analisar o efeito de microinjeções de naloxone ou naltrindole no SFO sobre a ingestão cumulativa de solução salina 1,5%, e o teste de sobremesa comparado ao grupo controle, utilizou-se ANOVA *two-way*, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para o teste de campo aberto foi usado o teste "t" de Student. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$; os dados foram apresentados como média e erro padrão da média (média \pm SEM).

5.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Figura 5. Grupo I - Verificar se a atividade dos receptores mu-opioides endógenos está envolvida no apetite por sódio observado em condição de depleção deste íon.

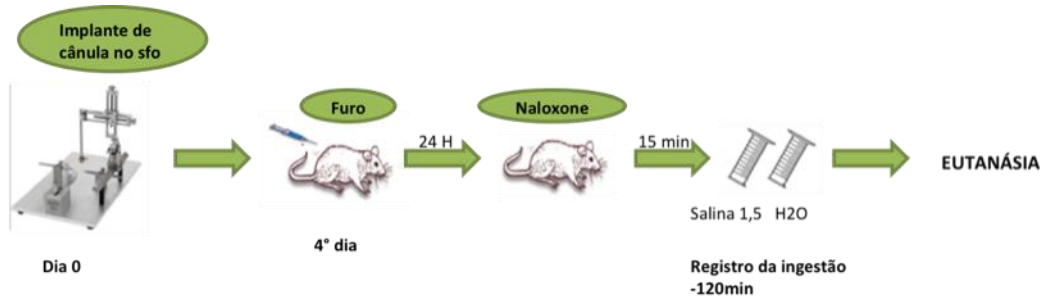


Figura 6. Grupo II - Verificar se a atividade dos receptores delta-opioides endógenos está envolvida no apetite por sódio observado em condição de depleção deste íon.

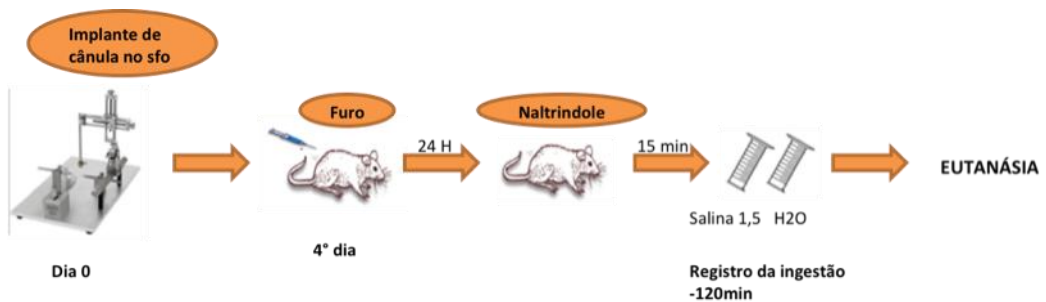


Figura 7. Grupo III - Verificar se os receptores mu-opioides endógenos reduzem a atividade inibitória do GABA sobre o apetite por sódio.

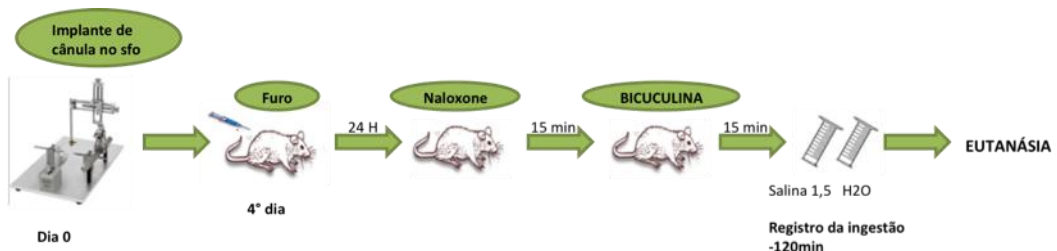


Figura 8. Grupo IV - Verificar se os receptores delta-opioides endógenos reduzem a atividade inibitória do GABA sobre o apetite por sódio.

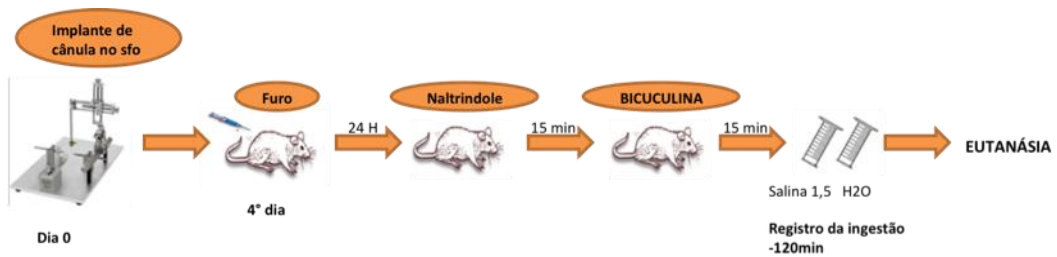


Figura 9. Grupo V - Avaliar se a inibição da ingestão de sódio causada pelo receptor mu-opioides corre em função de impedimento locomotor.

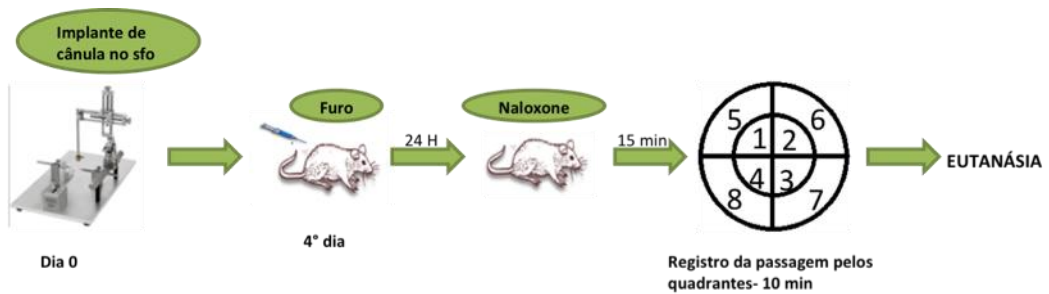


Figura 10. Grupo VI - Avaliar se a inibição da ingestão de sódio causada pelo receptor Delta opioide ocorre em função de impedimento locomotor.

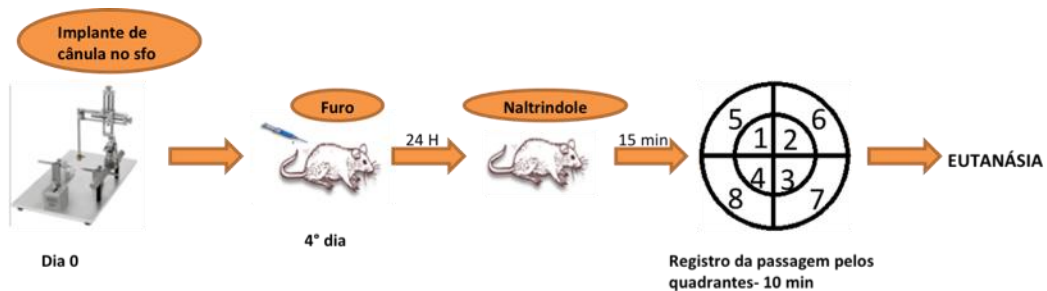


Figura 11. Grupo VII - Avaliar se receptores mu-opioides no SFO interfere com o apetite por soluções palatáveis de forma inespecífica ou se altera especificamente o apetite por sódio.

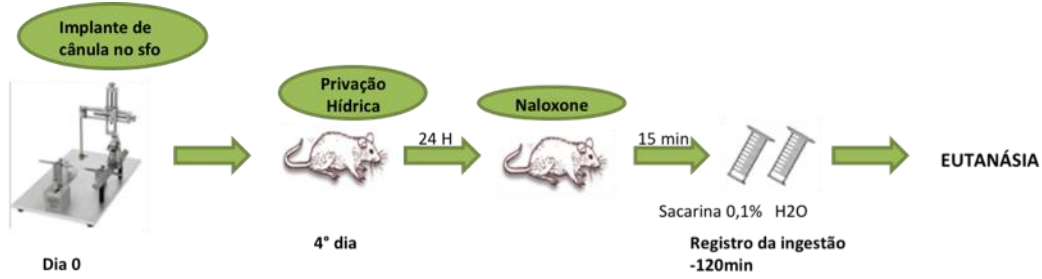
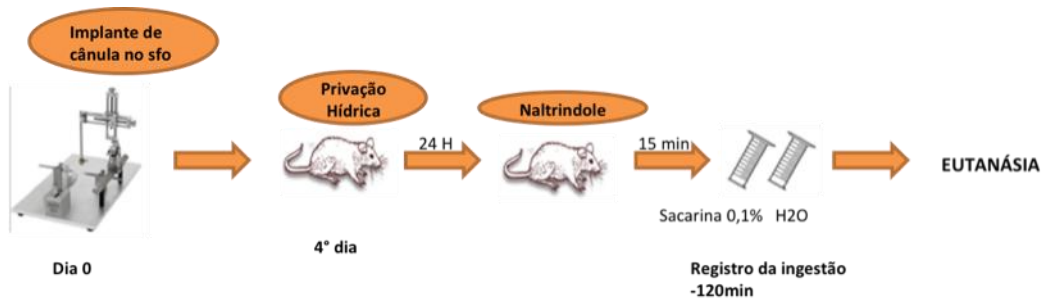


Figura 12. Grupo VIII - Avaliar se receptores delta-opioides no SFO interfere com o apetite por soluções palatáveis de forma inespecífica ou se altera especificamente o apetite por sódio.



6. RESULTADOS

A imagem abaixo é uma microfotografia mostrando o local da microinjeção dos antagonistas opioides mu- e delta- no SFO indicada pela seta vermelha.

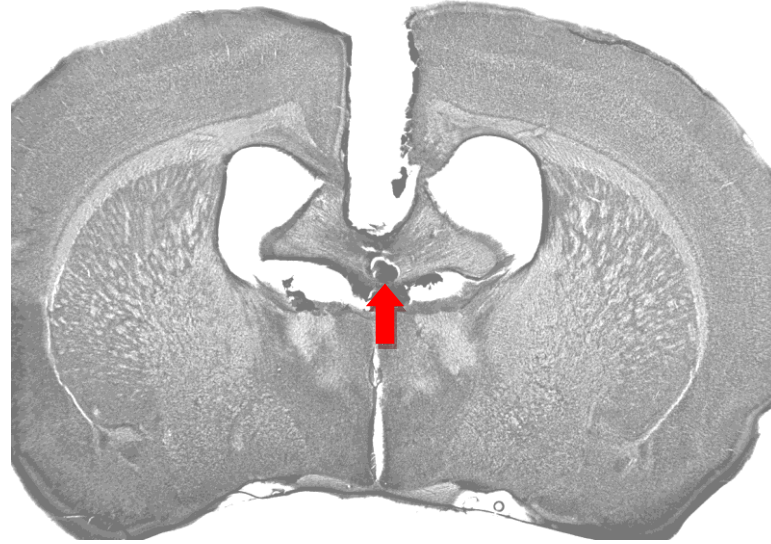


Figura 13. Fotomicrografia mostrando o local da microinjeção dos antagonistas opioides mu- e delta- no SFO indicada pela seta vermelha.

Abaixo, é uma imagem esquemática de um corte coronal do cérebro de rato onde a seta vermelha indica o posicionamento topográfico do SFO (PAXINOS & WATSON, 1998).

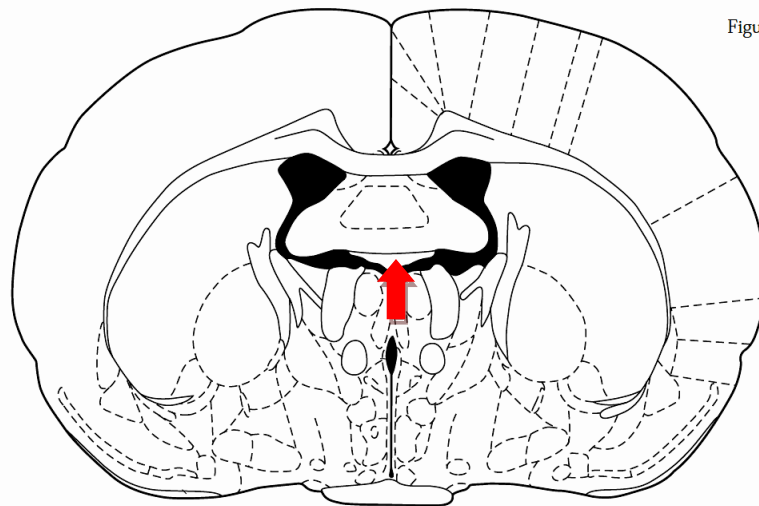


Figura 14. Imagem esquemática de um corte coronal do cérebro de rato onde a seta vermelha indica o posicionamento topográfico do SFO.

Grupo I - Verificar se a atividade dos receptores mu-opioides endógenos está envolvida no apetite por sódio observado em condição de depleção deste íon.

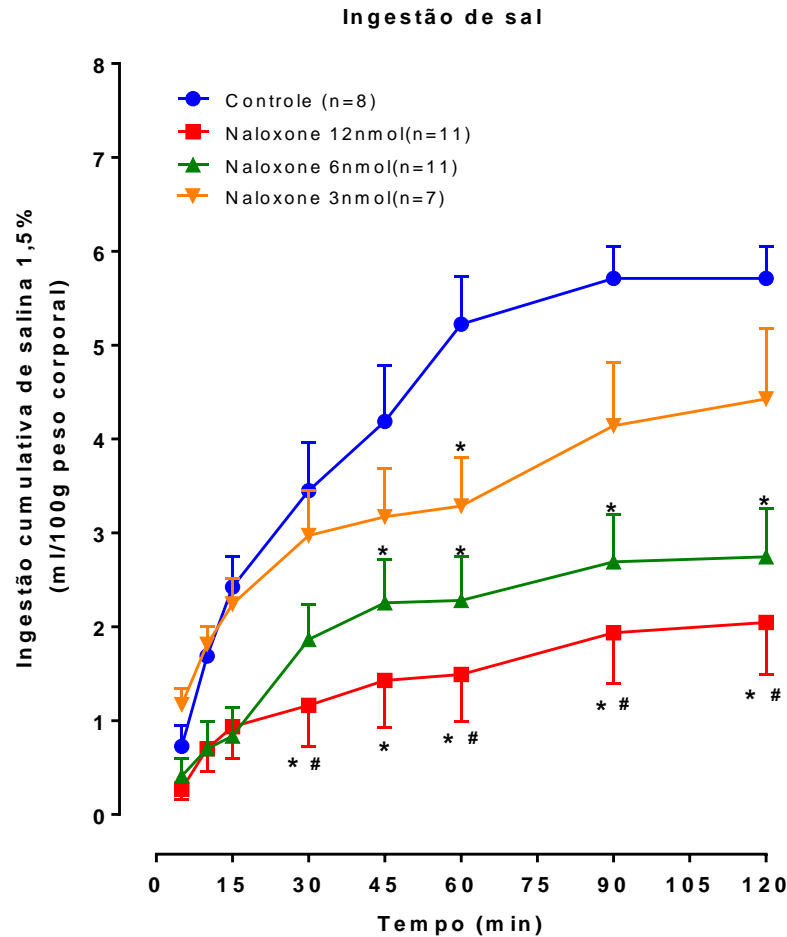


Figura 15. O gráfico compara a ingestão cumulativa de solução salina a 1,5% em cada grupo experimental : **●** grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, **■** grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone) na concentração de 12nmol no SFO, **▲** grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista mu-opioide na concentração de 6nmol e **▼** grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista mu-opioide na concentração de 3nmol, * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significativa comparada ao grupo experimental naloxone 3nmol.

Na figura 15, na ingestão cumulativa de sódio em animais depletados deste íon, quando comparado o grupo controle, que recebeu microinjeção de salina a 0,9% no SFO com o grupo droga que recebeu microinjeção do antagonista mu-opioide (naloxone) na maior concentração de 12 nmol no SFO, foi possível verificar uma atenuação da ingestão de salina a 1,5% a partir do registro de tempo de 30 min ($1,2 \pm 0,4$ ml/100g do peso corporal), se mantendo atenuado até o registro final de tempo aos 120 min ($2,0 \pm 0,6$ ml/100g do peso corporal). O grupo droga que recebeu microinjeção de naloxone na concentração intermediária de 6nmol no SFO, observa-se uma atenuação da ingestão de salina a 1,5% a partir do registro no tempo de 45min

($2,3 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal), mantendo essa atenuação até o fim do registro no tempo de 120 min ($2,7 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal). Na comparação do grupo controle com o grupo droga que recebeu microinjeção no SFO de naloxone na menor concentração de 3nmol, foi observado diferença estatística significativa apenas no registro de tempo dos 60 min ($3,3 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal), sendo os demais tempos estatisticamente iguais ao controle. Onde o grupo controle registrou aumento na ingestão cumulativa de solução salina 1,5% comparados aos grupos droga acima nos tempos de 30, 45 e 60 min ($3,5 \pm 0,5$; $4,2 \pm 0,6$ e $5,2 \pm 0,5$ ml/100g do peso corporal, respectivamente), se mantendo até os 120 min ($5,7 \pm 0,3$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa na interação tempos X tratamentos [$F(21,231)=4,81$; $p<0,0001$], nos tratamentos [$F(3, 33)=8,88$; $p=0,0002$] e nos tempos [$F(7, 231)=74,25$; $p<0,0001$], respectivamente

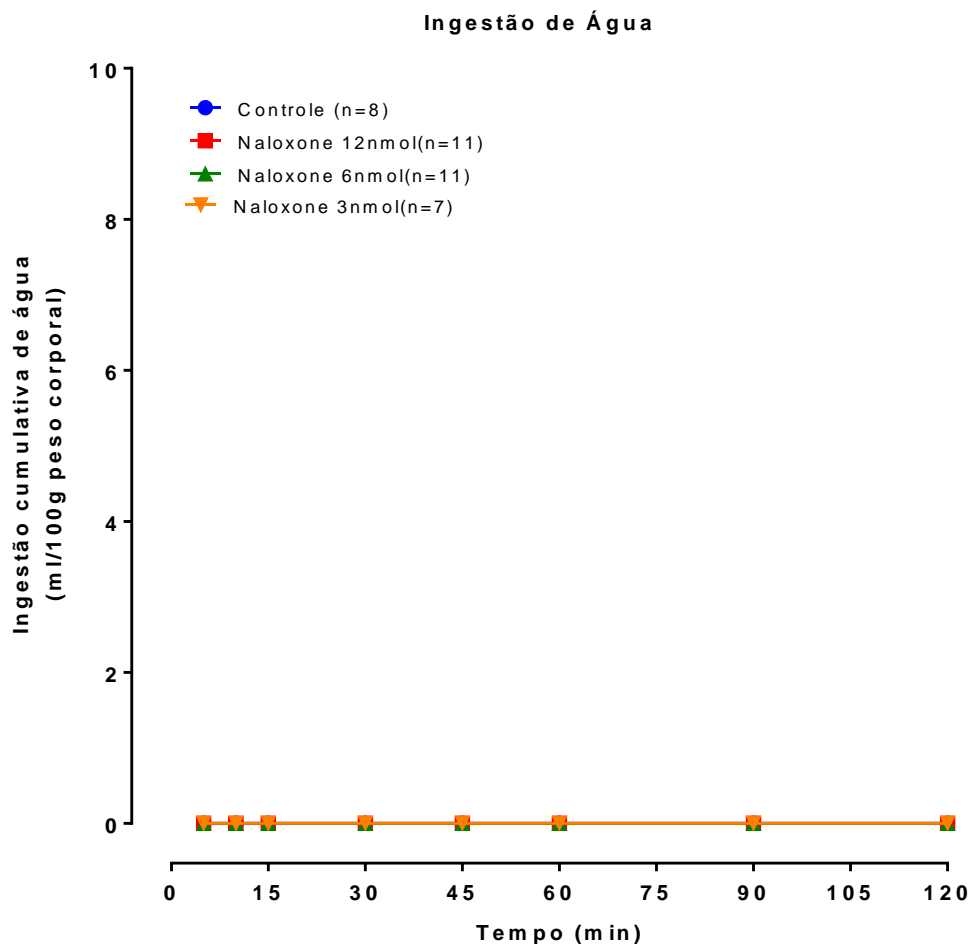


Figura 16. O gráfico compara a ingestão cumulativa de água destilada em cada grupo experimental : ■ grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, ■ grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone) na concentração de 12nmol no SFO, ■ grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista mu-opioide na concentração de 6nmol e ■ grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista mu-opioide na concentração

de 3nmol, * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significativa comparadas ao grupo experimental naloxone 3nmol.

Na figura 16, a ingestão de água destilada em animais depletados de sódio, quando comparado o grupo controle, que recebeu microinjeção no SFO de salina a 0,9%, com os grupos droga, que receberam microinjeção no SFO de naloxone nas concentrações de 12, 6 e 3 nmol, não houve diferença estatísticas significante na ingestão cumulativa de água destilada na comparação entre os grupos. A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na interação tempos X tratamentos [F(21,231)=0,0; p<0,9999], nos tratamentos [F(3, 33)=0,02852; p=0,9934] e nos tempos [F(7, 231)=0,0; p<0,9999], respectivamente.

Grupo II - Verificar se a atividade dos receptores delta-opioides endógenos está envolvida no apetite por sódio observado em condição de depleção deste íon

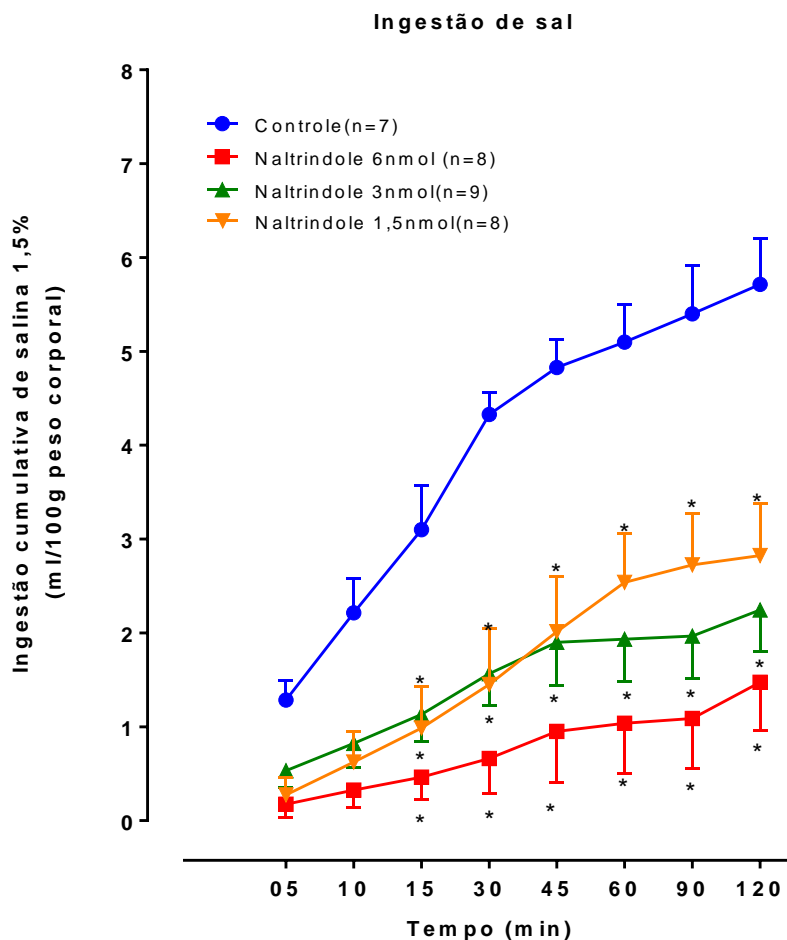


Figura 17. O gráfico compara a ingestão cumulativa de solução salina a 1,5% em cada grupo experimental : • grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, ■ grupo de animais

depletados de sódio com microinjeção de antagonista do receptor delta-opioide (Naltrindole) na concentração de 6nmol no SFO, \blacktriangle grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagosnista delta-opioide na concentração de 3nmol e \blacktriangledown grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista delta-opioide na concetração de 1,5nmol, * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significante comparadas ao grupo experimental naltrindole 3nmol.

Na figura 17, da ingestão cumulativa de sódio em animais depletados deste íon, que receberam microinjeções do antagonista delta-opioide (naltrindole) nas concentrações de 6, 3 e 1,5 nmol no SFO, teve inibição na ingestão de salina a 1,5% a partir do registro de tempo de 10 min ($0,32\pm 0,18$; $0,82\pm 0,25$ e $0,63\pm 0,32$ ml/100g do peso corporal, respectivamente), onde, se manteve atenuado até o registro final de tempo aos 120 min ($1,47\pm 0,52$; $2,24\pm 0,44$ e $2,82\pm 0,55$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). Onde o grupo dos animais controle no registro de 10 min ($2,21\pm 0,31$ ml/100g do peso corporal), mantendo a ingestão cumulativa de até os 120 min ($5,71\pm 0,49$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na interação tempos X tratamentos [$F(21,196)=3,63$; $p<0,0001$], nos tratamentos [$F(3, 28)=16,11$; $p<0,0001$] e nos tempos [$F(7, 196)=43,77$; $p<0,0001$], respectivamente

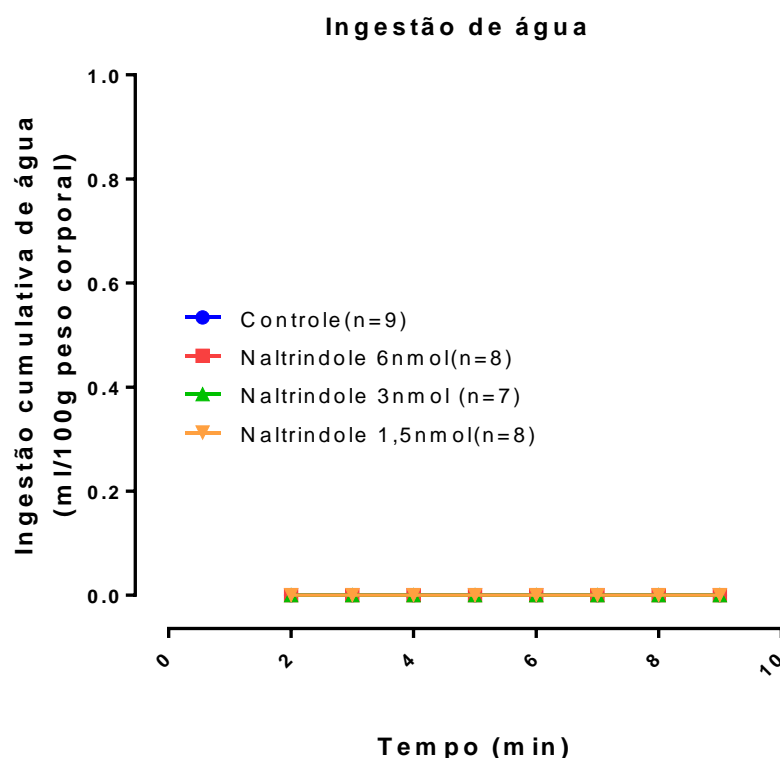


Figura 18. O gráfico compara a ingestão cumulativa de água destilada em cada grupo experimental : \blacktriangle grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, \blacktriangle grupo de animais depletados de sódio

com microinjeção de antagonista do receptor delata-opioide (Naltrindole) na concentração de 6nmol no SFO, ▲ grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagosnista delta-opioide na concentração de 3nmol e ▲ grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista mu-opioide na concetração de 1,5nmol, * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significante comparadas ao grupo experimental naloxone 3nmol.

Na figura 18, na comparação da ingestão cumulativa de água destilada em animais depletados de sódio, quando foi comparado o grupo controle, que recebeu microinjeção de salina a 0,9% no SFO, com o demais grupos droga, que receberam micro injeções de naltrindole nas concentrações de 6, 3, e 1,5 nmol, não teve diferença estatisticamente significante. A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na interação tempos X tratamentos [$F(21,196)=0,0$; $p<0,9999$], nos tratamentos [$F(3, 28)=0,04466$; $p=0,9872$] e nos tempos [$F(7, 196)=0,0$; $p<0,9999$], respectivamente.

Grupo III - Verificar se os receptores mu-opioides endógenos reduzem a atividade inibitória do GABA sobre o apetite por sódio

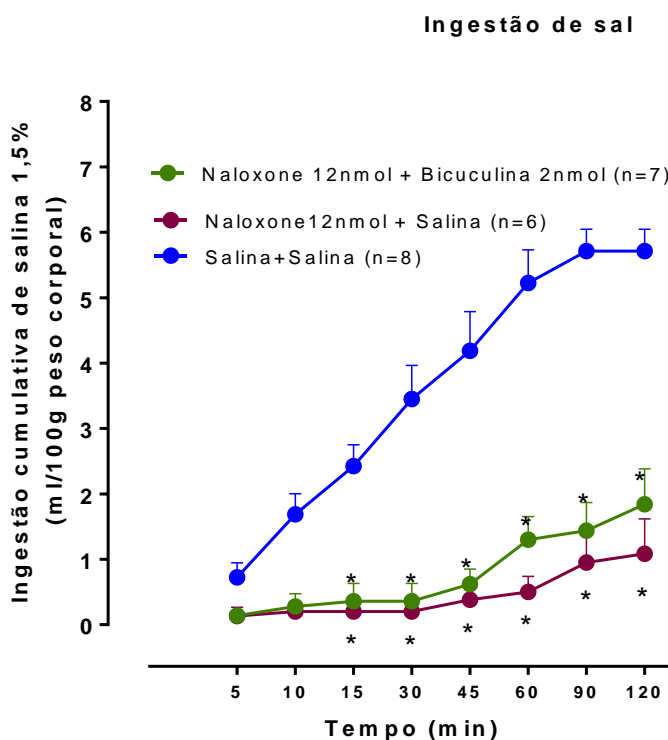


Figura 19. O gráfico compara a ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em cada grupo experimental : ● grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO , sendo 1 de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone na concentração de 12nmol/ 0,2μL) e a 2 do antagonista GABA (Bicuculina na concentração de 2 nmol/ 0,2μl) e ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO, sendo 1 de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone na concentração de 12nmol/ 0,2μL) e a 2 de salina isotônica 0,9% . * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significante entre grupos experimentais Naloxone + Bicuculina e Naloxone + Salina.

Na figura 19, foi comparado a ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em animais depletados de sódio, os grupos de animais Naloxone + Bicuculina e o grupo de animais Naloxone + Salina apresentam inibição na ingestão de salina 1,5% a partir do registro de 10min (0,28±0,19 e 0,20±0,13 ml/100g do peso corporal, respectivamente) se mantendo inibido até o registro de 120min (1,84±0,54 e 1,08±0,53 ml/100g do peso corporal, respectivamente) enquanto o grupo Salina + Salina no registro de tempo de 10min (1,68±0,22 ml/100g do peso corporal) ingeriu solução salina 1,5% até o registro dos 120 min (5,71±0,33 ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na interação tempos X tratamentos [F(14,112)=11,27; p<0,0001], nos tratamentos [F(2, 16)=44,17; p<0,0001] e nos tempos [F(7, 112)=35,25; p<0,0001], respectivamente.

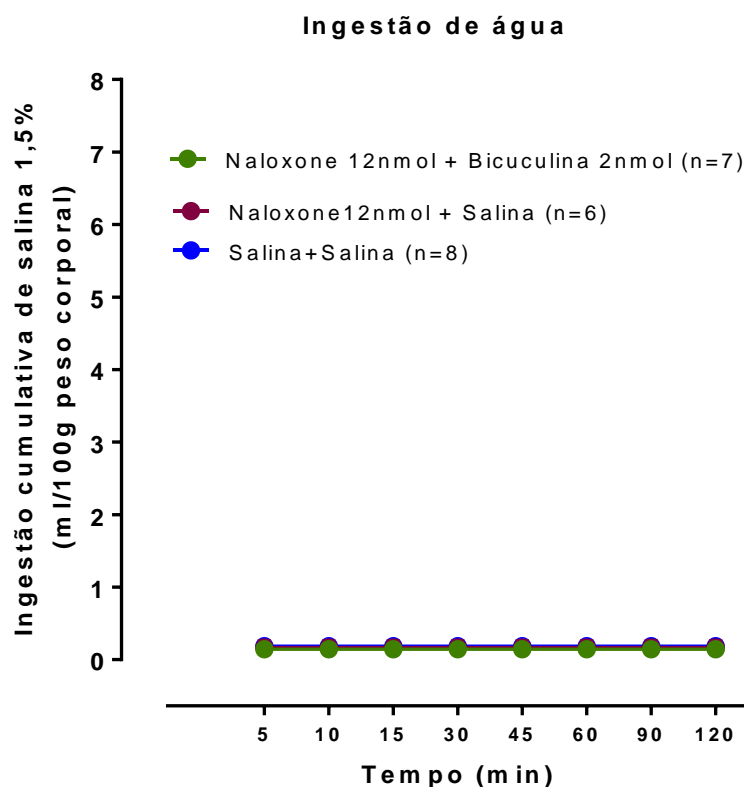


Figura 20. O gráfico compara a ingestão cumulativa de água destilada em cada grupo experimental : ● grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO, sendo 1 de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone na concentração de 12nmol/ 0,2µL) e a 2 do antagonista GABA (Bicuculina na concentração de 2 nmol/ 0,2µl) e ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO, sendo 1 de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone na concentração de 12nmol/ 0,2µL) e a 2 de salina isotônica 0,9% . * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significante entre grupos experimentais Naloxone + Bicuculina e Naloxone + Salina.

Na figura 20, a ingestão de água destilada em animais depletados de sódio, quando comparado o grupo controle, que recebeu microinjeção no SFO de salina a 0,9%, com os grupos, que receberam duas microinjeções no SFO sendo a 1 injeção de naloxone nas concentração de 12 nmol e a 2 injeção de salina 0,9%, e que receberam duas microinjeções no SFO, sendo a 1 injeção de naloxone nas concentração de 12 nmol e a 2 injeção de bicuculina na concentração de 2 nmol, não houve diferença estatísticas significante na ingestão cumulativa de água destilada na comparação entre os grupos. A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na interação tempos X tratamentos [F(14,126)=0,0; p<0,9999], nos tratamentos [F(2, 18)=0,02852; p=0,9440] e nos tempos [F(7, 126)=0,0; p<0,9999], respectivamente.

Grupo IV - Verificar se os receptores delta-opioides endógenos reduzem a atividade inibitória do GABA sobre o apetite por sódio

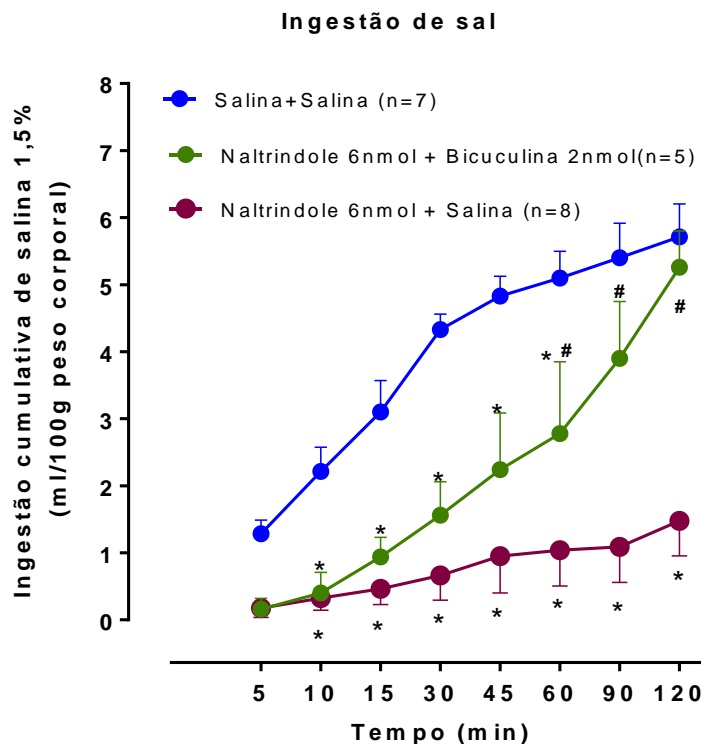


Figura 21. O gráfico compara a ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em cada grupo experimental : ● grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO, sendo 1 de antagonista do receptor delta-opioide (Naltrindole na concentração de 6nmol/ 0,2µL) e a 2 do antagonista GABA (Bicuculina na concentração de 2 nmol/ 0,2µl) e ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO, sendo 1 de antagonista do receptor delta-opioide (Naltrindole na concentração de 6nmol/ 0,2µL) e a 2 de salina isotônica 0,9%. * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significante entre grupos experimentais Naltrindole+ Bicuculina e Naltrindole + Salina.

Na figura 21, foi comparado a ingestão cumulativa de solução salina 1,5% em animais depletados de sódio, o grupo de animais Naltrindole + Bicuculina apresentou inibição na ingestão a partir do registro de 10min ($0,40 \pm 0,31$ ml/100g do peso corporal,) se mantendo inibido até o registro de 60min ($1,3 \pm 0,35$ ml/100g do peso corporal) enquanto grupo Naltrindole + Salina teve inibição a partir dos 10 min ($0,35 \pm 0,18$ ml/100g do peso corporal) onde se manteve inibido até os 120min ($1,47 \pm 0,51$ ml/100g do peso corporal), já grupo Salina + Salina o registro de tempo de 10min ($2,21 \pm 0,36$ ml/100g do peso corporal) ingeriu solução salina 1,5% até o registro dos 120 min ($5,7 \pm 0,49$ ml/100g do peso corporal). Porém o grupo Naltrindole + Bicuculina a partir dos registro de 90 min ($3,9 \pm 0,8$ ml/100g do peso corporal) a ingestão cumulativa de salina 1,5% ficou igual a ingestão ao grupo Salina+Salina,

se mantendo até os 120min($5,26 \pm 0,54$ e $5,7 \pm 0,49$ ml/100g do peso corporal, respectivamente). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa na interação tempos X tratamentos [$F(14,119)=5,83$; $p<0,0001$], nos tratamentos [$F(2, 17)=25,24$; $p<0,0001$] e nos tempos [$F(7, 119)=39,74$; $p<0,0001$], respectivamente.

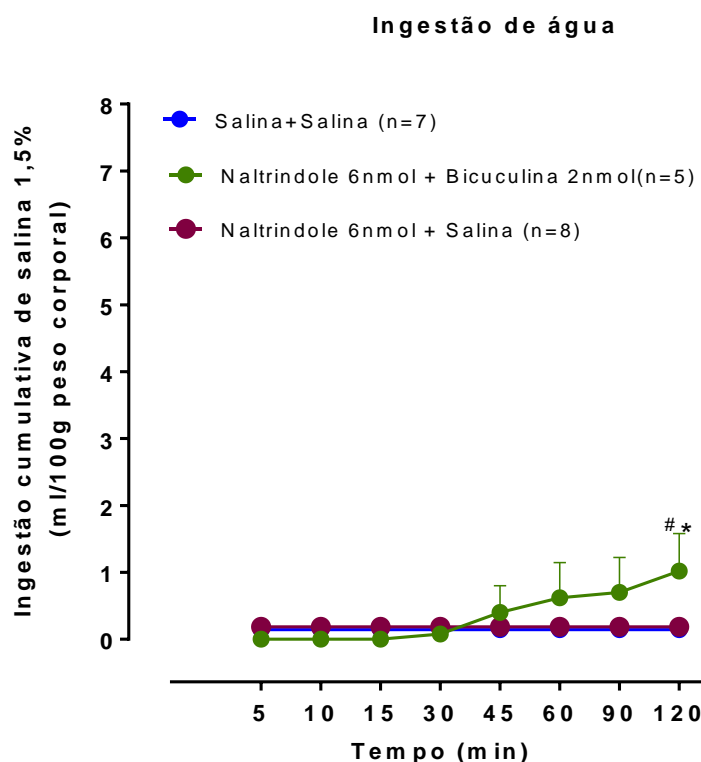


Figura 22: O gráfico compara a ingestão cumulativa de água destilada em cada grupo experimental : ● grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO , sendo 1 de antagonista do receptor mu-opioide (Naltrindole na concentração de 6 nmol/ 0,2µL) e a 2 do antagonista GABA (Bicuculina na concentração de 2 nmol/ 0,2µl) e ● grupo de animais depletados de sódio com duas microinjeções no SFO, sendo 1 de antagonista do receptor delta-opioide (Naltrindole na concentração de 6nmol/ 0,2µL) e a 2 de salina isotônica 0,9% . * indica diferença estatísticas significativo quando comparados ao grupo controle e # indica diferença estatística significativa entre grupos experimentais Naltrindole + Bicuculina e Naltrindole + Salina.

Na figura 22, a ingestão de água destilada em animais depletados de sódio, quando comparado o grupo controle, teve aumento na ingestão de água no tempo de 120 min no grupo naltrindole 6nmol + bicuculina 2 nmol($1,02 \pm 0,56$ ml/100g do peso corporal), comparado com o grupo salina + salina($0,14 \pm 0,09$ ml/100g do peso corporal) e o grupo naltrindole 6 nmol + salina($0,2 \pm 0,09$ ml/100g do peso corporal). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significativa na interação tempos

X tratamentos [F(14,119)=0,0; p<0,0002], nos tratamentos [F(2, 17)=0,02852; p=0,5830] e nos tempos [F(7, 119)=0,0; p<0,0010], respectivamente.

Grupo V - Avaliar se a inibição da ingestão de sódio causada pelo receptor mu-opioides corre em função de impedimento locomotor

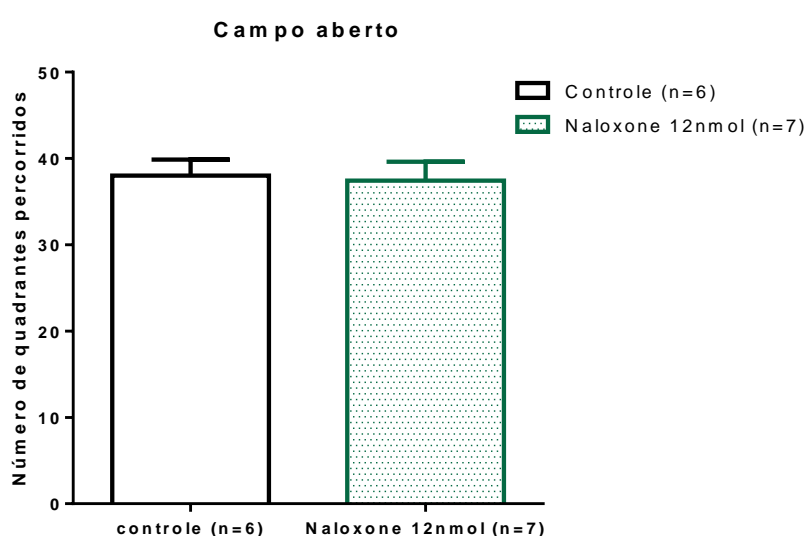


Figura 23. O gráfico compara o número de quadrantes percorridos pelo grupo controle e grupo experimental. grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone) na concentração de 12nmol no SFO e * indica a diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo naloxone 12 nmol.

Na figura 23, a motilidade dos animais depletados de sódio, quando comparado o grupo controle, que recebeu microinjeção de salina a 0,9% no SFO, com o grupo droga, que recebeu o microinjeção de naloxone na concentração de 12nmol no SFO, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A análise não pareada do teste “t” de Student indica [t=0,1955; df=11; p=0,8486]

Grupo VI - Avaliar se a inibição da ingestão de sódio causada pelo receptor delta-opioides corre em função de impedimento locomotor

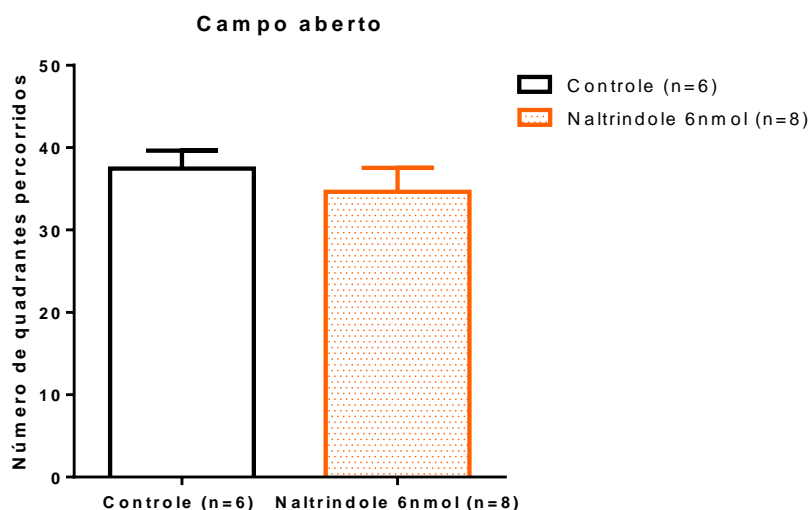


Figura 24. O gráfico compara o número de quadrantes percorridos pelo grupo controle e grupo experimental. grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de salina 0,9% no SFO, grupo de animais depletados de sódio com microinjeção de antagonista do receptor delta-opioide (Naltrindole) na concentração de 6nmol no SFO e * indica a diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo naltrindole 6 nmol.

A figura 24, que mostra a motilidade dos animais dos animais depletados de sódio, na comparação do grupo controle, que recebeu microinjeção de salina a 0,9% no SFO, com o grupo droga, que recebeu microinjeção de naltrindole na concentração de 6nmol, não houve diferença estatisticamente significativa no número de quadrantes percorridos. A análise não pareada do teste “t” de Student indica [$t=0,7732$; $df=12$; $p=0,4543$]

Grupo VII - Avaliar se receptores mu-opioides no SFO interfere com o apetite por soluções palatáveis de forma inespecífica ou se altera especificamente o apetite por sódio.

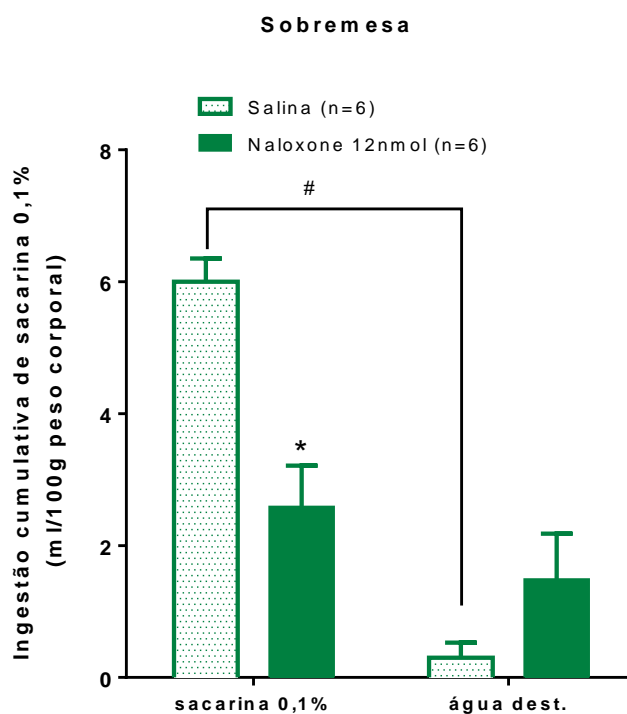


Figura 25. O gráfico compara a ingestão cumulativa de água destilada e sacarina 0,1% em cada grupo experimental : grupo de animais privados de água com microinjeção de salina 0,9% no SFO, grupo de animais privados de água com microinjeção de antagonista do receptor mu-opioide (Naloxone) na concentração de 12nmol no SFO, * indica diferença estatísticas significante quando comparado grupo droga ao grupo controle e # indica diferença estatística significante comparando a ingestão das diferentes soluções dentro do mesmo grupo.

Na figura 25, que mostra o hedônismo por substancias palatáveis, ocorreu diminuição da ingestão de sacarina 0,1% no grupo naloxone 12 nmol(2,58±0,68 ml/100g do peso corporal) comparado ao grupo salina(6 ±0,35 ml/100g do peso corporal). Quando comparado o ingestão dentro do mesmo grupo, no grupo salina observa-se maior ingestão de solução de sacarina 0,1% comparado a ingestão de água destilada (6 ±0,35 , 0,3 ±0,23 ml/100g do peso corporal, respectivamente). Porém na comparação de ingestão de sacarina 0,1% e água destilada dentro do mesmo grupo naloxone 12 nmol não houve diferença estatística significante (6 ±0,35 , 0,3 ±0,23 ml/100g do peso corporal, respectivamente) comparando o grupos salina e grupo naloxone 12 nmol na ingestão cumulativa de agua destilada, não houve diferença estatística significante(0,3±0,23 , 1,48 ±0,69 ml/100g do peso corporal, respectivamente).). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na interação tempos X tratamentos [F(1,20)=20,03; p=0,0002], nos tratamentos [F(1, 20)=4,72; p=0,0420] e nos tempos [F(1, 20)=43,76; p<0,0001], respectivamente.

Grupo VIII - Avaliar se receptores delta-opioides no SFO interfere com o apetite por soluções palatáveis de forma inespecífica ou se altera especificamente o apetite por sódio.

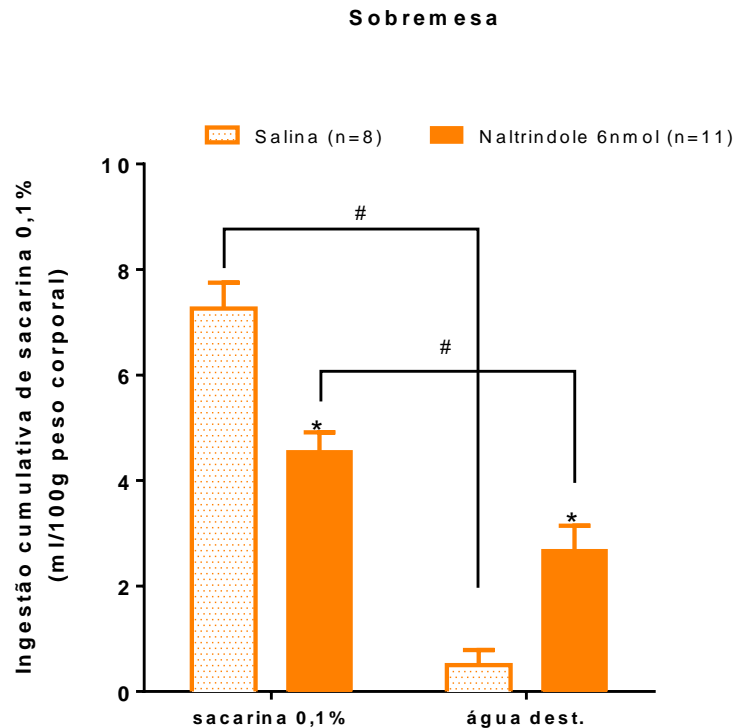


Figura 26. O gráfico compara a ingestão cumulativa de água destilada e sacarina 0,1% em cada grupo experimental : grupo de animais privados de água com microinjeção de salina 0,9% no SFO, grupo de animais privados de água com microinjeção de antagonista do receptor delta-opioide (Naltrindole) na concentração de 6nmol no SFO, * indica diferença estatísticas significante quando comparado grupo droga ao grupo controle e # indica diferença estatística significante comparando a ingestão das diferentes soluções dentro do mesmo grupo.

A figura 26, que mostra o hedonismo por substancias palatáveis, ocorreu diminuição da ingestão de sacarina 0,1% no grupo naloxone 12 nmol($4,55 \pm 0,36$ ml/100g do peso corporal) comparado ao grupo salina($7,26 \pm 0,49$ ml/100g do peso corporal), porém houve aumento na ingestão de água destilada pelo grupo naltrindole 6 nmol($2,67 \pm 0,47$ ml/100g do peso corporal) quando comparado ao grupo salina($0,5 \pm 0,29$ ml/100g do peso corporal). Quando comparado o ingestão das diferentes soluções dentro do mesmo grupo, grupo salina e grupo naltrindole 6 nmol, observa-se maior ingestão de solução de sacarina 0,1% ($7,26 \pm 0,49$, $4,55 \pm 0,36$ ml/100g do peso corporal, respectivamente) comparado a ingestão de água destilada ($0,5 \pm 0,29$, $2,67 \pm 0,47$ ml/100g do peso corporal, respectivamente).). A análise de variância modelo misto de duas vias para medidas repetidas indica diferença estatística significante na

interação tempos X tratamentos [$F(1,28)=35,36$; $p<0,0001$], nos tratamentos [$F(1, 28)=0,43$; $p=0,5185$] e nos tempos [$F(1, 28)=110,43$; $p<0,0001$], respectivamente.

7 DISCUSSÃO

A hipótese do presente trabalho é que a depleção de sódio ativa vias mu- e delta-opioidérgicas no SFO, que por sua vez inibe vias gabaérgicas, resultando em aumento do apetite por sódio e, desta forma, o balanço hidrossalino é reestabelecido. A fim de verificar esta hipótese, inicialmente procedeu-se o bloqueio dos receptores mu- e delta-opioides no SFO em ratos depletados de sódio e observou-se inibição do apetite por este íon. Para verificar a interação entre vias opioidérgicas e gabaérgicas nesta resposta, procedeu-se ao bloqueio dos receptores gabaérgicos e observou-se a reversão do efeito antinatriorexigênic do naltrindole, mas sem alteração da resposta inibitória do naloxone. Além disso, verificou-se que o efeito antinatriorexigênic do naltrindole e do naloxone não decorre de um impedimento locomotor. No entanto o bloqueio dos receptores mu- e delta-opioides reduz a ingestão de solução de sacarina no teste de sobremesa.

A hipótese que a depleção de sódio ativa vias opioidérgicas centrais está baseada em dados da literatura que mostram aumento da expressão de fos-imunoreativo (fos-ir), de mRNA para encefalina e mRNA para o receptor mu-opioide em neurônios dos núcleos da CeA, no NAc, Leito da Estria Terminal (BST) 4h após injeção de furosemida. Também foi observado que a depleção de furosemida aumenta a expressão de fos-ir e mRNA do receptor mu-opioide em neurônios do MnPO e SFO, sendo que a expressão de mRNA do receptor mu-opioide corresponde a 12% dos neurônios fos-ir positivo e no MnPO corresponde a 9%, isso é importante pois estas áreas são responsáveis em detectar alterações dos níveis de osmolaridade do sódio presente no sangue e no líquido encefaloraquidiano (GRONDIN et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que os opioides no SFO parecem ser importantes para o controle do balanço hidrossalino, uma vez que o bloqueio dos receptores mu- e delta-opioides nesta área inibe o apetite por sódio em ratos depletados deste íon. Na comparação das respostas dos receptores mu- e delta-opioide sobre a ingestão de solução salina hipertônica, mostrou que os receptores do tipo delta-opioide possuem um efeito antinatriorexigênic mais intenso, pelo fato de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre as concentrações administrada do antagonista delta opioide no bloqueio do apetite por sódio. Estes dados são corroborados por alguns estudos da literatura mostrando que estes receptores em diferentes áreas encefálicas modulam a ingestão de sódio. Em estudo com animais normonatrêmicos a administração I.C.V de agonista mu-opioide, DAMGO,

aumentou a ingestão de solução salina hipertônica (GOSNEL e MAJCHRZAK, 1990). Já Smith et al. (2016), mostraram que o bloqueio dos receptores mu-opioide na amígdala central (CeA) reduz a ingestão cumulativa de solução salina hipertônica em animais depletados de sódio. Em outro estudo, os animais foram submetidos a dois protocolos experimentais: privação hídrica associada a repleção parcial (WD-PR) e depleção de sódio com uso de diuréticos associada a inibidor da conversão de angiotensina (Furosemida+captopril - FURO-CAP). Observou-se que a injeção do agonista mu-opioide, DAMGO, na CeA, foi capaz de aumentar a ingestão de solução salina hipertônica nos dois protocolos. Além disso a administração do antagonista CTAP na CeA foi capaz de bloquear a ingestão de salina promovida pela administração do DAMGO na mesma área (YAN et al., 2013). Em outras áreas encefálicas também se observa participação dos receptores mu-opioides no controle da ingestão de sódio. Verificou-se que a administração de naloxone no LPBN reduz a ingestão salina hipertônica induzida pela depleção de sódio e que bloqueia a ingestão de solução salina hipertônica induzida pela administração de β -endorfina no LPBN em ratos normonatremicos. (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Em relação a participação do receptores delta-opioides no controle da ingestão de sódio são mais escassos. Em estudo da literatura com bloqueio dos receptores delta-opioide no VTA verificou-se atenuação do apetite por sal em animais depletados de sódio (LUCAS et al., 2007). Dados anteriores do laboratório mostram que a administração ICV do antagonista delta-opioide, naltrindole, leva a inibição do apetite por sódio em ratos depletados deste íon (NASCIMENTO et al 2014). Outro receptor opioide também parece estar envolvido no controle do apetite por sódio. Outro estudo do nosso laboratório, mostrou que outro tipo de receptor os receptores kappa-opioide, também participa da modulação da ingestão de sódio em animal depletados no SFO (NASCIMENTO, 2015), uma vez que, o bloqueio dos receptores kappa por administração do antagonista Nor-BNI I.C.V, MnPO e SFO foi capaz de inibir a ingestão de salina hipertônica por animais depletados deste íon (NASCIMENTO et al., 2012; NASCIMENTO, 2015). Assim, podemos considerar o envolvimento dos receptores mu-, kappa e delta- opioides e seus ligantes endógenos participam da modulação de atividade neuronal no SFO que parece ser importante na manutenção hidroeletrolítica, pela ingestão de sódio.

O órgão subfornical possui projeções eferentes para diversas áreas que participam da homeostase dos fluidos corporais, controle cardiovascular e homeostase energética, sendo essas áreas: PVN, LH, OVLT, SON e MnPO (SMITH e FERGUSON, 2010; JOHNSON e GROSS, 1993). Em um estudo de Saad et al. (1979), observaram a relação da área septal (

AS) com o SFO na ingestão de água, os autores observaram que a lesão eletrolítica no AS que provocava aumento da ingestão de água. Esse efeito de hiperdipsia foi bloqueado por lesão simultânea da AS e do SFO. A lesão isolada do SFO não aumentou a ingestão de água, mesmo em animais submetidos a protocolo de desidratação. Isso mostra que AS possui um conexão de carácter inibitório sobre o SFO para a ingestão de água. Diversos neuromoduladores, como a ANG II, que atua nos receptores tipo I no SFO e estimula a ingestão de solução salina e pode modular o balanço hidroeletrólítico (COBLE et al., 2014). Outros estudos mostram a importância da serotonina no SFO sobre o controle da ingestão de sódio e água. Observou-se por microdiálise a diminuição das concentrações extracelular de serotonina no SFO em animais que receberam injeção associada de furosemida e captopril. Ao contrário, a ingestão de salina hipertônica e de água por estes animais, causou um aumento dos níveis basais de serotonina extracelular no SFO (TAKAHASHI e TANAKA, 2016) .

Dado da literatura mostra a existência de interação entre vias opioidérgicas e gabaérgicas centrais. Em estudo de comportamento de ingestão alimentar em animais privados de alimento por 16h, observou-se que a ativação GABAérgica pelo agonista muscimol no LH, inibe produção de preproorexina e conseqüentemente diminui a ingestão de alimento e esta inibição foi revertida pelo bloqueio GABAérgico pelo antagonista bicuculina. Nesse mesmo estudo, foi observado que a administração de antagonista dos receptores mu-, kappa- e delta-opioides quando administrados no LH inibiu a ingestão de alimento. Além disso, verificou-se que a administração do antagonista naloxone aumentou os níveis de GABA no LH. Estes dados mostram que os receptores opioides modulam o sistema GABAérgico no comportamento ingestivo alimentar (ARDIANTO et al., 2016).

O aumento da concentração de sódio no sangue e/ou no líquido encefaloraquidiano ativam os neurônios GABAérgicos no SFO. A ativação dos neurônios GABAérgicos ocorre devido a inativação dos canais de K^+ sensíveis a ATP, causando assim, aversão ao sódio (SHIMIZU et al., 2007). Enquanto que a ativação de receptores opioides causa redução na excitabilidade celular devido a inibição dos canais de Ca^{+} e hiperpolarização de membrana pelo aumento da condutância de K^+ (SEWARD 1991 e NORTH 1987), assim aumentando o hedonismo pelo sódio. Desta forma, poderíamos sugerir que no presente trabalho um possível mecanismo que explicaria o efeito antinatriorexigênico induzido pelo bloqueio dos receptores mu- e delta- opioides, poderia ser que o aumento de opioide endógeno, estimulado pela depleção de sódio, impedisse a atividade inibitória das vias GABAérgicas.

Estudo da literatura mostra que o bloqueio dos neurônios GABAérgicos no NAcb inibe a liberação de dopamina (RAHMAN e McBRIDE, 2002), assim, se nossa hipótese

estiver correta, pode-se supor que a ativação endógena dos receptores opioides no SFO estaria estimulando a ingestão de sódio pelo mecanismos de recompensa. O estímulo da resposta de recompensa esta condicionada a experiências sensoriais ao sabor, tato, proprioceptivo e visceral, que resulta em mudanças biológicas propiciando o comportamento motivacional (CHIARA, 1995). Sendo assim, a depleção de sódio pode causar mudanças sensoriais na palatabilidade à salina hipertônica que permitiria a reestabelecimento da homeostasia hidrossalina (NASCIMENTO, 2015; MOITEIRO, 2014). Esta mudança sensorial na palatabilidade pode ser desencadeada por alterações na atividade neuronal em estruturas límbicas de forma que a ingestão de salina hipertônica, que normalmente tem caráter aversivo, passe a gerar a sensação de "prazer" à ingestão de salina hipertônica, assim levando à resposta de recompensa motivada.

Baseando-se nisso, no presente estudo foi feito o bloqueio dos receptores mu- e delta-opioides associado ao bloqueio dos receptores GABA no SFO. Observou-se que a administração de bicuculina reverteu a inibição da ingestão de sódio causado pela administração de naltrindole, mas não modificou efeito inibitório do bloqueio dos receptores mu-opioides. Com isso, sugerimos que apenas os receptores delta-opioide endógeno participem deste mecanismo de controle da ingestão de sódio descrito acima. Assim sugerimos que os resultados encontrados no teste de ingestão de sódio dos receptores delta-opioide foi mais intensa do que os receptores mu-opioide, devido os receptores mu- e delta-opioides atuarem em vias diferentes sobre o bloqueio do apetite por sódio. Quanto aos receptores mu-opioides, pode-se sugerir que a modulação do apetite por sódio seja mediada por outras vias que não dependam do GABA ou do mecanismo de recompensa, por exemplo, ativação da amígdala modificando a palatabilidade, ou ainda, modulação de atividade de núcleos hipotalâmicos como os núcleos paraventricular e supraóptico que participariam do controle homeostático do apetite por sódio. Entretanto, estudos futuros devem ser realizados para confirmar estas hipóteses

No presente trabalho os dados mostram que o bloqueio dos receptores mu- e delta-opioides no SFO atenua a ingestão de sacarina 0,1%, no teste de sobremesa. Este resultado indica um papel dos receptores opioides na modulação da palatabilidade no impacto hedônico de soluções palatáveis de sabor doce, como é a sacarina 0,1 %, ou de solução salina hipertônica em animal deficientes de sódio. Além disso, o teste de sobremesa mostrou que o bloqueio dos receptores do tipo delta-opioide causou um efeito dipsogênico. Estudo da literatura mostrou em teste de reatividade ao sabor que a injeção subcutânea de morfina aumentou o impacto hedônico da palatabilidade do sabor doce, quando solução de sacarose é

administrada intraoralmente (RIDEOUT e PARKER, 1996). Agonistas mu- e delta-opioides I.C.V leva a aumento no consumo de solução de sacarina e aumentos de respostas positivas a palatabilidade desta solução em animais não privados (GOSNELL e PATEL, 1993). Em outro estudo, a administração de DAMGO no NAcb aumentou a ingestão de solução de sacarose em animais não privados (ZHANG e KELLEY, 1997; 2002), enquanto a administração no NAcc de antagonista mu-opioide foi pouco efetivo na diminuição da preferência à ingestão de soluções de sabores doces (BERNAL et al., 2010). Em outra área observou-se resposta semelhante, com aumento da ingestão de solução de sacarina quando DAMGO foi administrado no VP (SHIMURA; IMAOKA e YAMAMOTO, 2006), Além disso verifica-se também que injeção de DAMGO no VP aumenta as respostas comportamentais de impacto hedônico positivo na palatabilidade à infusão intraoral de sacarina e diminui as respostas comportamentais de impacto aversivo na palatabilidade à infusão intraoral de lítium, que tem sabor amargo (INUI e SHIMURA, 2017). Estudo do nosso laboratório com o teste de reatividade ao sabor, onde foi administrado antagonista kappa-opioide na amígdala basolateral (BLA) e realizou-se infusão intraoral de sacarina em animais privados de água ou salina em animais depletados de sódio, verificou-se atenuação nas respostas, comportamentais de impacto hedônico positivo ao sabor doce. Já para o sabor salgado, administrado antagonista kappa-opioide na amígdala basolateral (BLA) levou diminuição das respostas comportamentais hedônicas e aumentou as respostas comportamentais aversivas a solução salina hipertônica em animais depletados de sódio (NASCIMENTO, 2015; MOITEIRO, 2014). Desta forma os resultados do presente trabalho sugerem que a atividade dos receptores mu- e delta-opioide endógenos presentes no SFO, de alguma forma, podem modular a atividade destas estruturas límbicas levando a alteração da palatabilidade ao sabor salgado em animais depletados de sódio. Estudos futuros devem ser conduzidos para esclarecer a possível interação dos opioides no SFO com estruturas límbicas na modulação do apetite por sódio.

O bloqueio dos receptores mu e delta não afetaram a locomoção dos animais. Assim, mostrando que a inibição da ingestão de solução salina não foi causada por dificuldade de ir em busca da solução salina. Dado da literatura mostra que ativação dos receptores delta opioides no NAc aumenta a atividade locomotora (KATSUURA e TAHA, 2010). Já em outro estudo, a administração subcutânea de morfina causou uma redução na locomoção a curto prazo, onde a administração subcutânea dos antagonistas naloxone ou naltrexone foi capaz de reverter esta resposta locomotora da morfina (FRISCHKNECHT et al., 1983).

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste presente estudo elucidam algumas questões que envolvem o papel do SFO sobre o controle hidroeletrolítico, bem como, o envolvimento dos opioides endógenos, μ - e δ -, presentes no SFO. Já que, a administração de antagonistas μ - e δ - opioide no SFO inibiram a ingestão de solução salina hipertônica em animais depletados de sódio. Conseguimos com nosso estudo comprovar nossa hipótese de que existe uma sinergia do receptor δ opioide e neurônios GABAérgicos no SFO sobre o controle do apetite por sódio. Uma vez que, administração apenas de antagonista δ -opioide inibe a ingestão de solução salina. Porém a inibição promovida pelo antagonista δ -opioide é abolida quando é também administrado no SFO o antagonista de receptores GABA.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Ainda existe a necessidade de mais estudos para esclarecer algumas questões que foram levantadas com o resultado desse nosso trabalho. Sendo importante descobrir quais áreas cerebrais estão sendo ativadas em resposta da administração de opioide no SFO em animais depletados de sódio por meio do método de marcação de fos-ir. Estudos com marcação de fos-ir para receptores δ - e κ - opioide após protocolo de depleção de sódio é uma opção para verificar o envolvimento se existe ativação destes receptores quando ocorre desequilíbrio osmótico e em quais regiões esses receptores estariam sendo encontrados. Seria também interessante utilizar dupla marcação em animais depletados para receptores μ - δ - e κ - opioide com marcadores para GABA, pois com isso poderia-se observar em quais regiões e que tipo de receptor opioide é ativado ao mesmo tempo que o GABA é ativado.

Outra importante direcionamento de estudo seria a verificação da administração dos receptores δ em regiões límbicas, como: VTA, NAcc, e complexo amigdalóide. Pois ainda faltam dados que mostrem o envolvimento do receptor δ em áreas límbicas sobre o controle da ingestão de sódio. Que pode ser utilizado protocolo de depleção de sódio e teste de ingestão cumulativa, por se tratar de regiões ligadas as emoções se tornaria interessante submeter os animais também ao protocolo de reatividade ao sabor, a fim de avaliar se o receptor δ -opioide modifica os valores hedônicos ou aversivos dos sabores, amargo, azedo, doce e salgado.

Contudo, nosso estudo levantou a questão de que se os neurônios GABA que interagem com o receptores delta opioide no SFO sobre o controle da ingestão de sódio em animais depletados estão de fato modificando o impacto aversivo do sódio por liberação de dopamina no NAcc. Para verificar esta hipótese, poderia ser feito experimento com administração de agonista delta opioide no SFO com dosagem dopamina por microdiálise no NAcc.

10 REFERÊNCIAS

- AKIL, H. et al. Endogenous opiates and behavior: **Review**, 2012.
- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M.R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363-1381, 2011.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiology Review.**, v. 84, p. 169–208, 2004.
- ARDIANTO, C. et al. Opioid systems in the lateral hypothalamus regulate feeding behavior through orexin and GABA neurons. **Neuroscience**, v. 21, n. 320, p. 183-193, 2016 .
- AVENA, N .M. et al. Effects of baclofen and naltrexone, alone and in combination, on the consumption of palatable food in male rats. **Experimental Clinical Psychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 460-467, 2014.
- BLOOR, B.C.; MAZE, M.; SEGAL, I. Interaction between adrenergic and opioid pathways. **Estafanous FG. Opioids in anesthesia**, p. 34-46, 1991.
- BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 97, p. 519-531, 2008.
- CHARANJIT KAUR; ENG-ANG LING The circumventricular organs **Histology and histopathology** v. 32, p. 11881, 2017.
- CHEN, Y. et al. Molecular cloning and functional expression of a CL-opioid receptor from rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 8-12, 1993.
- CHILDERS, S. R. Opioid receptor-coupled second messenger systems. **Opioid I, Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 104, p. 189-216, 1993.
- COBLE, J. P. et al. Activation of the renin-angiotensin system, specifically in the subfornical organ is sufficient to induce fluid intake. **American Journal of Physiology Regulation Integr Comp Physiology**, n.15, p. 307,2014.
- DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. **Drug Alcohol Dependence**, v. 38, n. 2, p. 95-137, 1995.
- DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opioides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.
- ENGELHARDT, B. Development of the blood-brain barrier. **Cell Tissue Research.**, v. 314, p. 119–129, 2003.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiology Review**, v. 78, p. 583-686, 1998.

FRISCHKNECHT, H. R. et al. Inhibition of morphine-induced analgesia and locomotor activity in strains of mice: a comparison of long-acting opiate antagonists. **Pharmacology Biochemisto & Behavior**, v. 19, p. 933-934, 1983.

GIULIANO, C. et al. Inhibition of Opioid Transmission at the μ -Opioid Receptor Prevents Both Food Seeking and Binge-Like Eating. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 12, p. 2643–2652.

GOSNELL, B. A; MAJCHRZAK, M. J. Effects of a selective Mu opioid receptor agonist and naloxone on the intake of the sodium chloride solutions. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 66-71, 1990.

GOSNELL, B.A.; PATEL, C.K. Centrally Administered/ mu – and delta -Opioid Agonists Increase Operant Responding for Saccharin **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, V. 45, p. 979-982, 1993.

GOZZANI, J. L. Opióides e Antagonistas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 1, p. 65 – 73, 1994.

GRONDIN, M. E. et al. Na⁺ appetite induced by depleting extracellular fluid volume activates the enkephalin/mu-opioid receptors system in the rat forebrain. **Neuroscience**, v. 192, p. 398–412, 2011.

GUI-BAO GU; GONG JU The parabrachio- subfornical organ projection in the rat **Brain Research** V. 38, p. 41- 47, 1995.

HASSEN, A. H.; FEUERSTEIN, G; FADEN, A.I. mu Receptors and opioid cardiovascular effects in the NTS of rat. **Peptides**, v. 3, n. 6, p. 1031-1037, 1982.

HENRY, M.; GROB, M.; MOUGINOT, D. Endogenous angiotensin II facilitates GABAergic neurotransmission afferent to the Na⁺-responsive neurons of the rat median preoptic nucleus. **American Journal of Physiology Regulation Integr Comp Physiology**, v. 297, p. 783–792, 2009.

HIROSE, N. et al. Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioidreceptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 135, n. 1, p. 213-252, 2005.

HIYAMA, T.Y. et al. Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 511–512, 2002.

HUGHES, J. et al. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 577-580, 1975.

HURLEY, S.W.; JOHNSON, A.K. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. **Pflugers Archives**, v. 467, n. 3, p. 445-456, 2015.

INUI, T.; SHIMURA, T. Delta-opioid receptor blockade in the ventral pallidum increases perceived palatability and consumption of saccharin solution in rats. **Behavior Brain Research**, v. 1, n. 269, p. 20-27, 2014.

JOHNSON, A. K. The Sensory Psychobiology of Thirst and Salt Appetite. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1388–1400, 2007.

JOHNSON, A.K.; GROSS, P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 8, p. 678-686, 1993

KANDEL. **Principles of Neural Science**. 5th ed., 2013.

KARANDIKAR, M.; COBB, M.H. Scaffolding and protein interactions in MAP kinase modules. **Cell Calcium**, v. 26, n. 5, p. 219-226, 1999.

KATSUURA, Y.; HECKMANN, J. A.; TAHA, S.A. μ -Opioid receptor stimulation in the nucleus accumbens elevates fatty tastant intake by increasing palatability and suppressing satiety signals. **American Journal of Physiology Regulation Integr Comp Physiology**, v. 301, n. 1, p. 244-254, 2005.

KAUR, C.; LING, E.A. *HistolHistopathol. Review*, v. 32, n. 8, p. 879-892, 2017.

KOLAJ, M.; BAI, D.; RENAUD, L.P. GABAB receptor modulation of rapid inhibitory and excitatory neurotransmission from subfornical organ and other afferents to median preoptic nucleus neurons. **Journal Neurophysiology**, v.92, 2004.

LUCAS, L.R.; GRILLO, C.A.; MCEWEN, B.S. Salt appetite in sodium-depleted or sodium-replete conditions: possible role of opioid receptors. **Neuroendocrinology**, v. 85, p. 139–147, 2007.

LUZ, C. P. et al. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. **Brain Research**, v. 1139, p. 178–194, 2007.

LUZ, P. A. et al. Inhibition of water intake by the central administration IL-1 β in rats: role of the central opioid system. **Neuropeptides**, v.40, p. 85–94, 2006.

LUZ, P. A. et al. Blockade of central kappa-opioid receptors inhibits the antidipsogenic effect of interleukin-1 β . **Neuropeptides**, v. 93, p. 93-103, 2009.

MANSOUR, A. et al. Anatomy of CNS opioid receptors. **Trends Neuro Science**, v. 11, p. 308–314, 1988.

MARTINS, R. T. et al. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.

MCDONALD, J.; LAMBERT, D.G. Opioid receptors. Continuing Education in Anaesthesia. **Critical Care & Pain**, v. 5, n. 1, 2005.

MCKINLEY, M. J. et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **International Journal Biochemical Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 901-918, 2003.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **Physiology**, v. 19, p. 1-6, 2004.

MCKINLEY, M. J. et al. Physiological and pathophysiological influences on thirst. **Physiology e Behavior**, v. 81, p. 2004.

MINAM, M.; SATOH, M. **Neuroscience Research**, v. 23, p. 121–145, 1995.

MOITEIRO, A. L. B. B. **Efeito da administração de kappa opioide na amígdala basolateral: ingestão de água, apetite por sal e alteração da palatabilidade**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2014.

NA, E.S; MORRIS, M.J.; JOHNSON, A. K. Opioid mechanisms that mediate the palatability of and appetite for salt in sodium replete and deficient states. **Physiology e Behavior**, v. 6, p. 164-170, 2012.

NAKANISHI, S. et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta lipotropin precursor. **Nature**, v. 278, p. 423-27, 1979.

NASCIMENTO, A.I. et al. Blockade of central delta-opioid receptors inhibits salt appetite in sodium-depleted rats. **Peptides**, v. 55, p. 110-119, 2014.

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

NASCIMENTO, A. I. R. **Participação dos receptores delta e kappa –opioides centrais no controle do apetite por sódio em ratos estimulados a ingerir solução salin hipertônica**. 125f. 2015. Tese (Doutorado em Patologia Humana)- Fundação Gonçalo Moniz, Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

NESTLER, E. **Journal Neuron**, v. 16, p. 897–900, 1996.

NODA, M.; HIYAMA, T.Y. The NaxChannel: What It Is and What It Does. **The Neuroscientist**, p.1- 14,2014

NURULAIN T. ZAVERI. The Nociceptin opioid receptor (NOP) as a therapeutic target: progress in translation from preclinical research to clinical utility. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.

PERT, C. B.; SNYDER, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. **Science**, v. 179, p. 1011-1014, 1973.

POLASTRON, J. et al. Mu-opioid receptors and not kappa-opioid receptors are coupled to the adenylate cyclase in the cerebellum. **Journal Neurochem**, v. 54, p. 562-570, 1990.

RAHMAN, S.; MCBRIDE, W.J. Involvement of GABA and cholinergic receptors in the nucleus accumbens on feedback control of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area. **Journal Neurochem**, v. 80, n. 4, p. 646-654, 2002.

RICHARD J. BODNAR. Endogenous opioids: overview and current issues Drug and Alcohol Dependence. **Peptides**, v.50, p. 55–95, 2013.

RIDEOUT, H. J.; PARKER, L. AMorphine enhancement of sucrose palatability: analysis by the taste reactivity test. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, 1996.

SAAD, W. A. et al. Influence of the subfornical organ on water intake induced by septal lesion. **Acta Physiologica Latino Americana**, v. 29, n. 6, p. 323-332, 1979.

SEWARD, E.; HAMMOND, C.; HENDERSON, G. p-Opioid receptor-mediated inhibition of the N-type calcium channel current. **Proceedings Royal Society London**, v. 244, p. 129-135, 1991.

SHIMIZU, H. et al. Glial Nax channels controllactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. **Neuron**, v. 54, p.5 9–72, 2007.

TAKAHASHI, M.; TANAKA, J. Serotonin release in the subfornical organ area induced by sodium and water intake in the rat. **Physiological Behavior**, 2016.

TSUYOSHI SHIMURA, T.; IMAOKA, H.; YAMAMOTO, T. Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum. **The European Journal of Neuroscience**, 2006.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. Opioid receptors. **Annual Review Biochemistry**, v. 73, p. 953–990, 2004.

WASSUM, K. M. et al. Disruption of endogenous opioid activity during instrumental learning enhances habit acquisition. **Neuroscience**, v. 163, p. 770-80, 2009.

WATANABE, E. et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **Regulation Integr Comp Physiology**, v. 290, p. 568–576, 2006.

ZHANG, M.; KELLEY, A.E. Opiate agonists microinjected into the nucleus accumbens enhance sucrose drinking in rats. **Psychopharmacology**, v. 132, p. 350–360, 1997.

ZHANG, M.; KELLEY. Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: microinjection mapping and *fos* expression. **Neuroscience**, v. 99, n. 2, p. 267-277, 2000.