



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

FRANCINEIDE FERNANDES COSTA

INTERAÇÃO CENTRAL ENTRE ÓXIDO NÍTRICO, LACTATO E AS CÉLULAS DA
GLIA NA MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL DE INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO
EM RATOS

JOÃO PESSOA-PB

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

FRANCINEIDE FERNANDES COSTA

INTERAÇÃO CENTRAL ENTRE ÓXIDO NÍTRICO, LACTATO E AS CÉLULAS DA
GLIA NA MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL DE INGESTÃO DE ÁGUA E SÓDIO
EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia-SBFis, associada ao Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba (CBiotec-UFPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Josiane de Campos Cruz

JOÃO PESSOA-PB
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838i Costa, Francineide Fernandes.

Interação central entre óxido nítrico, lactato e as células da glia na modulação comportamental de ingestão de água e sódio em ratos / Francineide Fernandes Costa.

- João Pessoa, 2020.

82f.

Orientação: Josiane de Campos Cruz.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Biotecnologia.

1. Balanço hidroeletrolítico, astrócito, comportamento.

I. Cruz, Josiane de Campos. II. Título.

UFPB/BC

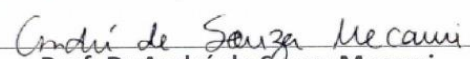


PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Ata da 16ª Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 23 de Janeiro de 2020.

No vigésimo terceiro dia do mês de janeiro de dois mil e vinte, às nove horas, foi realizada, no auditório do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, a defesa pública da Dissertação de Mestrado da discente **Francineide Fernandes Costa** intitulada **"Interação central entre óxido nítrico, lactato e as células da glia na modulação comportamental de ingestão de água e sódio em ratos"**. A banca examinadora foi constituída pela orientadora, a **Profª. Drª. Josiane de Campos Cruz** (Universidade Federal da Paraíba), pelo 1º examinador, **Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral** (Universidade Federal da Paraíba) e pelo 2º examinador **Prof. Dr. André de Souza Mecawi** (Universidade Federal de São Paulo). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição da candidata por cada membro, tendo a candidata o mesmo tempo para responder a cada examinador. Na sequência, a Banca Examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou a candidata APROVADA. De acordo com o artigo 98 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, a discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da Dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste Programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB, cabendo à esta Universidade a expedição do diploma para gozo das prerrogativas legais do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.


Profª. Drª Josiane de Campos Cruz


Prof. Dr André de Souza Mecawi


Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

APOIO FINANCEIRO

CAPES/FAPESQ 88887.227271/2018-00

CAPES 88881.062209/2014-01

CNQ 447690/2014-0

Aos meus pais, Francisco e Damiana

Eu agradeço, meus pais, por permitirem que eu saísse de casa aos 16 anos para um lugar desconhecido, isso foi o impulso para o meu amadurecimento. Obrigada por entenderem a minha distância e fazerem dos meus sonhos, os vossos. Dedico-vos mais essa vitória, pois foi a partir da luta diária de vocês que eu consegui chegar até aqui. Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, que acompanhou todas as minhas lutas e me deu ânimo e força para prosseguir. Obrigada Pai, por acalmar a minha alma em meio a tantas aflições e nutrir o meu espírito com a tua palavra e santa eucaristia. Eu não me canso de adorá-lo e bendizê-lo por todas as maravilhas que fizestes em meu favor. Obrigada por cada prece atendida, eu te amo muito Jesus. Não sou nada sem a tua presença; não me deixa ir para longe do teu abraço, nunca. Agradeço ainda à mãe do nosso Senhor e também minha, por interceder sempre a Jesus pela minha vida. Obrigada, nossa Senhora!

À minha família, aos meus pais Francisco e Damiana que sempre cuidaram de mim e me ensinaram a ser a mulher que eu sou hoje. Vocês foram a base para cada conquista alcançada na minha vida. Obrigada por me receberem com amor, sorriso e carinho a cada visita que vos faço, cheia de saudade. Eu acho que vocês não conseguem mensurar quão difícil é para subir cada degrau nessa minha jornada acadêmica, mas tenho certeza que sentem as minhas angústias. E à minha irmã, Deize, que me compreende, torce pelo meu sucesso e se orgulha de quem eu me tornei. Obrigada família, pela energia positiva que é enviada e as orações dirigidas a Deus em meu nome. Amo vocês muito.

Ao meu namorado, Everton, que está sempre disponível para me ajudar no que for preciso. Você me acompanhou dentro e fora do laboratório, algumas vezes você me viu chorar, desesperada porque as coisas não iam de acordo como eu planejei, e com seu abraço me acalmou. Obrigada por entender a falta de tempo, essa vida um pouco atarefada, por vibrar junto comigo em cada conquista e segurar na minha mão nos momentos ruins e bons da nossa caminhada. Eu te amo.

À minha orientadora, Prof^a Josiane Cruz, que me orientou nessa jornada nada fácil; não posso negar que as vezes vem o desespero e uma vontade de desistir. Obrigada pela atenção e disponibilidade! Eu espero concluir com êxito o mestrado, corresponder às suas expectativas, não a decepcionar e ser orgulho para a senhora. E peço a Deus, se for da vontade Dele que eu seja um dia professora, que eu possa tratar meus alunos me espelhando na senhora, assim nunca me esquecerei de ti e perpetuarei o seu ofício.

À doutoranda mais requisitada do nosso laboratório, Atalia, que esteve sempre disponível para me ajudar e me orientar no que fosse preciso. Tenho certeza que sem

você a caminhada teria sido mais árdua. Que Deus te abençoe por toda atenção e cuidado concedidos durante esses dois anos.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial, Rubens, Rayanelle, Nilton, Ellen, João, Brenda, Guilherme, Letícia e Samuel que me ajudaram sempre com bom ânimo. E aos amigos que a vivência no laboratório me trouxe: Mickael, Micaelle, Ivynna, Roxane, Ericka, Patrícia.

Às técnicas do Laboratório do Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), Clênia e Sara, que estavam sempre dispostas a ajudar e esclarecer minhas dúvidas. Aos professores da área de Fisiologia da Universidade Federal da Paraíba – Prof^a Camille Balarini, Prof^a Tatjana Keesen, Prof^a Maria de Socorro, Prof^o José Luiz, Prof^o Ian Porto pelo suporte intelectual e laboral para o desenvolvimento desse mestrado.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, por todo o apoio financeiro concedido ao desenvolvimento dessa pesquisa. Em especial à CAPES/FAPESQ (Processo nº 88887.227271/2018-00) pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Estudos recentes do nosso laboratório mostraram que a glia da região dos órgãos circumventriculares (OCVs) participam da modulação do equilíbrio hidroeletrólítico. Há evidências de que o lactato produzido pelos astrócitos, por meio do mecanismo chamado “*astrocyte-neuron lactate shuttle*” (ANLS), participa da via inibitória de modulação da ingestão de sódio através da ativação de interneurônios GABAérgicos. Um outro neuromodulador dessa via inibitória é o óxido nítrico (NO), o qual promove um aumento na atividade dos interneurônios GABAérgicos. Além disso, é conhecido que o NO atua no metabolismo energético astrocítico, inibindo a respiração mitocondrial e estimulando o consumo de glicose, resultando na produção e acúmulo de lactato nos astrócitos. Nesse contexto, a nossa hipótese é que o NO na região dos OCVs induz a liberação de GABA direta ou indiretamente via produção do lactato astrocítico. O GABA por sua vez, atuaria modulando a via tônica inibitória envolvida na modulação da ingestão de água e sódio. Para testar nossa hipótese, utilizamos ratos *Wistar*, que foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implante de cânula guia intracerebroventricular (icv) na região do ventrículo lateral (VL). Realizamos a microinjeção icv de salina estéril 0,9%; L-NAME (40 µg/0,5 µl- inibidor da óxido nítrico sintase); L-Lactato (2 µg/0,5 µl); α-CHCA (3 µg/0,5 µl-inibidor MCT4, um transportador de lactato astrocítico) ou fluorocitrato (FCt, 8 µg/0,5 µl-inibidor glial). Em outro protocolo realizamos a microinjeção de salina estéril 0,9% e do α-CHCA (3 µg/0,5) em ratos após a privação hídrica (48h). Após as microinjeções, a ingestão de água e sódio foi mensurada aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Realizamos ainda um protocolo *ex vivo*, incubando o órgão subfornicial (SFO) de ratos por 1h à 37°C em meio osmótico normal (145mM de Na⁺), normal (145mM de Na⁺) na presença de Nitroprussiato de Sódio (NPS, 3mM), hiperosmótico (170mM de Na⁺) e hiperosmótico na presença de L-NAME (500 µM), dosando em seguida a concentração de lactato da amostra. Os resultados mostraram que o L-NAME icv aumentou a ingestão de água e sódio, enquanto a inibição da glia com o FCt não alterou a ingestão de água ou sódio. Entretanto, a microinjeção prévia do FCt reduziu a ingestão de água e de sódio induzida pelo L-NAME. O L-Lactato icv não alterou a ingestão basal de água ou de sódio, mas aboliu a ingestão de água e de sódio induzidas pelo L-NAME. O bloqueio dos transportadores de lactato astrocíticos com o α-CHCA não alterou a ingestão basal de água ou de sódio, bem como a ingestão de água ou de sódio induzida pelo

L-NAME. Por outro lado, nos animais submetidos à privação hídrica, o α -CHCA promoveu aumento na ingestão de água e sódio. Observamos ainda que a submissão do SFO *ex vivo* dos animais ao meio hiperosmótico promoveu aumento na concentração de lactato; em contrapartida, esse resultado não sofreu alteração na presença do L-NAME. Além disso, o NPS não alterou a concentração de lactato em meio osmótico normal. Os resultados sugerem que há uma interação central entre NO, células da glia e lactato na modulação comportamental de ingestão de água e sódio em animais normohidratados. E que o mecanismo central de transporte de lactato astrócito-neurônio (ANLS) parece estar envolvido na modulação da ingestão de água e sódio em condições de hipertonicidade do meio extracelular.

Palavras-chave: Astrócito. Comportamento. Órgãos circumventriculares. Balanço hidroeletrólítico.

ABSTRACT

Recent studies from our laboratory have shown that circumventricular organs (CVOs) glial cells are involved in the modulation of the hydroelectrolytic balance. Furthermore, studies have shown that “astrocyte-to-neuron lactate shuttle” (ANLS) mechanism is part of the inhibitory pathway to modulate sodium intake through GABAergic interneurons activation. Another neuromodulator of this inhibitory pathway is the nitric oxide (NO), which induces increase in the GABAergic interneurons activity. In addition, NO is an important modulator to astrocytic energy metabolism, inhibiting mitochondrial respiration and stimulating glucose consumption, resulting in astrocytic lactate production. Regarding that, our hypothesis is that in the CVOs astrocyte, NO induces astrocytic lactate production which through ANLS mechanism modulated water and sodium intake. For that, we used Wistar rats, which were submitted to stereotactic surgery for intracerebroventricular (icv) guide cannula implantation in the lateral ventricle (VL) region. We performed icv microinjection of saline 0.9%; L-NAME (40 µg/0.5 µl- nitric oxide synthase inhibitor); L-lactate (2 µg/0.5 µl); α-CHCA (3 µg/0.5 µl MCT4 inhibitor, an astrocytic lactate transporter) or fluorocitrate (FCt, 8 µg/0.5 µl-glia inhibitor). In another protocol we performed the microinjection of sterile saline 0.9% and α-CHCA (3 µg/0.5) in rats after water deprivation (48h). After microinjections, water and sodium intake were measured at 5, 15, 30, 60 and 120 minutes. We also performed an ex vivo protocol, incubating rat subfornical organ (SFO) for 1h at 37°C in normal (145mM Na⁺), normal (145mM Na⁺) in the presence of Sodium Nitroprusside (SNP, 3mM), hyperosmotic (170mM Na⁺) and hyperosmotic medium in the presence of L-NAME (500 µM) to measure lactate concentration. The results showed that L-NAME icv increased water and sodium intake, while glia inhibition with FCt did not change water or sodium intake. However, prior FCt microinjection reduced water and sodium intake induced by L-NAME. In addition, L-Lactate icv did not change the basal intake of water or sodium; but abolished water and sodium intake induced by L-NAME. Inhibition of the ANLS mechanism with α-CHCA did not change either water or sodium basal intake, nor water or sodium intake induced by L-NAME. On the other hand, α-CHCA promoted a potentiation in the water and sodium intake induced by water deprivation. We also observed that the submission of ex vivo SFO of animals to hyperosmotic medium promoted an increase in lactate concentration; in contrast, this result did not change in the presence of L-NAME. In addition, the SNP did not change

the lactate concentration in normal osmotic medium. The results suggest that there is an central interaction between NO, glial cells and lactate in behavioral modulation of water and sodium intake in normohydrate animals. In addition, the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) central mechanism seems to be involved in the modulation of water and sodium intake under conditions of extracellular hypertonicity.

Keywords: Astrocyte. Behavior. Circumventricular organs. Hydromineral balance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de transporte de lactato astrócito-neurônio a partir da captação de glutamato pelo astrócito	25
Figura 2: Representação esquemática da interação central entre lactato astrocítico, óxido nítrico (NO) e GABA na modulação da ingestão de água e sódio.	30
Figura 3: Painel A: Animal posicionado no estereotáxico para o implante de uma cânula guia em direção ao VL direito. Podemos observar o pé de pato, suporte da cânula-guia (seta 1, preta) preso à torre do estereotáxico (seta 2, vermelha). Painel B: Fotografia da gaiola metabólica utilizada durante a execução dos experimentos comportamentais. Podemos observar, posicionados na grade da gaiola os bebedouros, tubos Falcons contendo água e sódio	33
Figura 4: Fotografia do momento de microinjeção no VL direito de um rato, em amarelo podemos visualizar o canhão da microinjetora, o qual encontra-se conectado à microseringa por meio de um tubo de polietileno.	34
Figura 5: Volume de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M) (mL) durante o período de adaptação à ingestão de sódio.....	42
Figura 6: Imagem histológica representativa de um corte coronal do cérebro de um animal evidenciando o trajeto da microinjetora em direção ao VLD	43
Figura 7: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou L-NAME (40 µg/0,5µl) sobre a ingestão de água em ratos.	44
Figura 8: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou L-NAME (40 µg/0,5µl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos	45
Figura 9: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou FCt (8 µg/0,5µl) sobre a ingestão de água em ratos	46
Figura 10: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou FCt (8 µg/0,5µl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos	47
Figura 11: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou microinjeção prévia de FCt (8 µg/0,5µl) ao L-NAME (40 µg/0,5µl) sobre a ingestão de água em ratos.	48
Figura 12: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou microinjeção prévia de FCt (8 µg/0,5µl) ao L-NAME (40 µg/0,5µl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos	49

Figura 13: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), L-Lactato (2 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de L-Lactato (2 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de água em ratos.	50
Figura 14: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), L-Lactato (2 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de L-Lactato (2 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos.	51
Figura 15: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), α-CHCA (3 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de α-CHCA (3 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de água em ratos.	52
Figura 16: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), α-CHCA (3 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de α-CHCA (3 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos.	53
Figura 17: Mensuração do volume urinário dos animais nos diferentes protocolos, após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M).....	54
Figura 18: Quantificação da osmolalidade urinária dos animais nos diferentes protocolos, após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M)	55
Figura 19: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de água em ratos submetidos à privação hídrica de 24h ou 48h	56
Figura 20: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de sódio (NaCl 0,3M) em ratos submetidos à privação hídrica de 24h ou 48h.....	57
Figura 21: Efeito da microinjeção icv de α-CHCA (3 μg/0,5μl) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de água em ratos submetidos à privação hídrica de 48h	58
Figura 22: Efeito da microinjeção icv de α-CHCA (3 μg/0,5μl) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de sódio (NaCl 0,3M) em ratos submetidos à privação hídrica de 24h ou 48h	59
Figura 23: Mensuração do volume urinário dos animais submetidos à privação hídrica, após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M).	60

Figura 24: Quantificação da osmolalidade urinária dos animais submetidos à privação hídrica após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M)	61
Figura 25: Análise (mmol/L) da concentração de lactato no SFO de ratos, modelo ex vivo, submetido a condições osmóticas normais (Na ⁺ 145 mM), normais na presença de NPS (3mM), hiperosmóticas (Na ⁺ 170 mM) e hiperosmóticas na presença de L-NAME (500 µM).....	62
Figura 26: Ilustração mostrando a interação entre NO-GABA e o lactato na região do SFO na modulação da ingestão de água ou sódio.....	66
Figura 27: Ilustração dos mecanismos que ocorrem durante incubação do SFO, modelo ex vivo, em solução hipertônica de 170 mM de Na ⁺	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água em animais normohidratados após microinjeção icv.	79
Tabela 2: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M) em animais normohidratados após microinjeção icv.	80
Tabela 3: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água em animais submetidos à PH após microinjeção icv.	81
Tabela 4: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M) em animais submetidos à PH após microinjeção icv.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3V = Terceiro ventrículo

ANLS: Astrocyte–neuron lactate shuttle

ATP: Adenosina trifosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

FCt: Fluorocitrato

GABA: Ácido gama-aminobutírico

G6P: Glicose-6-fosfato

G6PT: Glicose-6 translocase fosfato

G6Pase: Glicose-6-fosfatase

ICV = Intracerebroventricular

LDH: Lactato desidrogenase

L-NAME: Nomega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester

MCT2: Transportador de monocarboxilato do subtipo 2

MCT4: Transportador de monocarboxilato do subtipo 4

MCTs: Transportadores de monocarboxilato

NAD: Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida

NPS: Nitroprussiato de sódio

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NPS: Nitroprussiato de sódio

OCVs: Órgãos circumventriculares

OT: Ocitocina

OVLT: Órgão vascular da lâmina terminal

PVN: Núcleo paraventricular

PDH: Piruvato desidrogenase

PH: Privação hídrica

RE: Retículo endoplasmático

SFO: Órgão subfornicial

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sodium nitroprusside

SON: Núcleo supra-óptico

TTX: tetrodotoxina

vBNST: Núcleo leito ventral da estria terminal

VL = Ventrículo Lateral

VLD = Ventrículo Lateral Direito

VP: Vasopressina

α -CHCA: Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Interação neurônio-astrocitos-lactato	22
1.2 Mecanismo de transporte de lactato astrócitos-neurônios (<i>Astrocyte-neuron Lactate Shuttle</i>)	24
1.3 Transporte de lactato astrócito-neurônio e a modulação hidroeletrolítica	27
1.4 O papel do óxido nítrico na modulação do balanço hidroeletrolítico	28
1.5 Hipótese	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Estereotaxia: implante de cânula-guia em direção ao ventrículo lateral.....	32
3.3 Adaptação à ingestão de sódio	33
3.4 Microinjeções de drogas no ventrículo lateral direito.....	34
3.5 Coleta da urina e quantificação da osmolalidade	34
3.6 Análise histológica.....	35
3.7 Preparação de modelo <i>ex vivo</i> para análise da concentração de lactato no SFO de ratos.....	35
3.8 Dosagem do lactato contido no SFO.....	36
3.9 Drogas	37
3.10 Protocolos experimentais	37
3.10.1 Microinjeções icv em ratos submetidos a condições normais de hidratação:..	39
3.10.2 Microinjeções icv em ratos submetidos à privação hídrica:	40
3.10.3 Avaliação da concentração de lactato no SFO de ratos, modelo <i>ex vivo</i> :	40
3.11 Análise Estatística	41

4 RESULTADOS.....	42
4.1 Respostas comportamentais de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M) à microinjeções icv em ratos:	43
4.1.1 Microinjeção icv de L-NAME no VL de ratos:	43
4.1.2 Microinjeção icv de FCt no VL de ratos:	45
4.1.3 Microinjeção icv de FCt seguida de L-NAME no VL de ratos:	47
4.1.4 Microinjeção icv de L-Lactato e de L-Lactato seguida de L-NAME no VL de ratos:.....	49
4.1.5 Microinjeção icv de α -CHCA e de α -CHCA seguida de L-NAME no VL de ratos:.....	51
4.2 Medida do volume urinário (mL/100g) após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos a condições normais de hidratação:.....	53
4.3 Análise da osmolalidade urinária após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos a condições normais de hidratação:.....	54
4.4 Respostas comportamentais de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M) à microinjeções icv em ratos submetidos à privação hídrica (PH):	55
4.4.1 Microinjeção icv de salina 0,9% em ratos submetidos à PH de 24 ou 48h:.....	55
4.4.2 Microinjeção icv de α -CHCA em ratos submetidos à PH de 48h:.....	57
4.5 Medida do volume urinário (mL/100g) após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos à PH:.....	59
4.6 Análise da osmolalidade urinária após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos à PH:.....	60
4.7 Avaliação da concentração de lactato no SFO de ratos, modelo <i>ex vivo</i> :	61
5 DISCUSSÃO	63
5.1 Interação entre NO, lactato e células da glia na modulação do comportamento de ingestão de água e sódio:	63

5.2 Participação do lactato astrocítico em condições de hipertonicidade do meio extracelular:.....	67
5.3 Volume e osmolalidade urinária ao final dos protocolos comportamentais de ingestão de água e sódio:	68
5.4 Concentração de lactato no SFO de ratos em modelo <i>ex vivo</i> :.....	69
6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS	71
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE A – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água de animais normohidratados	79
APÊNDICE B – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio de animais normohidratados	80
APÊNDICE C – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água de animais submetidos à PH	81
APÊNDICE D – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio de animais submetidos à PH	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Interação neurônio-astrocitos-lactato

As primeiras descrições das células da glia no sistema nervoso central (SNC) foram realizadas por Rudolf Virchow em 1856, o qual nomeou as pequenas células que preenchem espaços em torno dos neurônios como “neuro-glue” (neuroglia). Posteriormente, estudos de Ramón y Cajal mostraram que essas células eram desprovidas de dendritos e polaridade (não expressam canais de Na^+ dependentes de voltagem), enfatizando a hipótese de que as células da glia dariam suporte físico e nutricional aos neurônios. Em 1920, Pio Del Río-Hortega, discípulo de Ramón e Cajal, classificou as células da glia como protoplasmática (astrocitos), micróglia e glia interfasciculada (oligodendrócitos) (ALLEN; BARRES, 2009; DEL RÍO-HORTEGA, 1920; NAVARRETE; ARAQUE, 2014; PENFIELD, 1924; PÉREZ-CERDÁ; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2015; RAMÓN e CAJAL, 1913; SOMJEM, 1988).

Atualmente diferentes estudos têm demonstrado que as células da glia são muito mais do que apenas células de suporte e nutrição neuronal, pois contribuem primordialmente na manutenção da barreira hematoencefálica, reatividade vascular cerebral, regulação dos níveis de neurotransmissores no espaço extracelular, bem como liberação de gliomoduladores (óxido nítrico, serina) e gliotransmissores (glutamato, ATP, GABA, glicina) (CHAN et al., 2013; JANZER; RAFF, 1987; KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994).

Os astrocitos são capazes de estabelecer comunicação entre si (ALLAMAN; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2011; ALLEN; BARRES, 2009) e bidirecionalmente com os neurônios adjacentes, por meio de ondas de Ca^{2+} (VERKHRATSKY; PARPURA, 2013; VERKHRATSKY; STEINHÄUSER, 2000). O íntimo contato entre neurônios pré e pós-sinápticos com os prolongamentos astrocíticos, bem como o papel primordial das células da glia na modulação da homeostase neuronal por meio de suas inúmeras funções, faz com que os astrocitos sejam considerados um terceiro elemento sináptico, reclassificando então as sinapses como tripartite (ALLEN; BARRES, 2009).

Os astrocitos além de se diferenciarem dos neurônios por não conduzirem potencial de ação elétrico (ALLEN; BARRES, 2009), possuem perfil metabólico distinto das células neuronais. Enquanto os neurônios são predominantemente oxidativos, as células da glia (em especial oligodendrócitos e astrocitos) utilizam

glicólise aeróbica, a partir da qual o lactato é sintetizado mesmo em condições normais de tensão de oxigênio (MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015; WEBER; BARROS, 2015). Os neurônios expressam exclusivamente a enzima lactato desidrogenase 1 (LDH1), responsável por favorecer a formação de piruvato a partir de lactato, já os astrócitos expressam a lactato desidrogenase 5 (LDH5), propiciando a formação de lactato a partir do piruvato (BITTAR et al., 1996). Além disso, os astrócitos ainda apresentam uma razão NADH:NAD⁺ muito maior, em relação aos neurônios, indicando status energético altamente reduzido, favorecendo a conversão de piruvato em lactato (MONGEON; VENKATACHALAM; YELLEN, 2016).

Nesse contexto, estudos de Pellerin e Magistretti (1994) foram os primeiros a sugerir que os astrócitos sintetizam, armazenam e liberam lactato, os quais são utilizados como fonte energética por neurônios adjacentes. Em adição, estudos recentes, têm mostrado que o lactato astrocítico é uma importante molécula de modulação da atividade neuronal (SADA et al., 2015; TANG et al., 2014). Não obstante, estudos *in vitro* de Sada et al. (2015) mostraram que a aplicação intracelular de lactato através de pipeta de *patch*, em neurônios do núcleo subtalâmico (STN, em inglês) e em células piramidais na sub-região CA1 do hipocampo promoveram despolarização neuronal.

Além disso, Tang et al. (2014) observaram que a estimulação optogenética de astrócitos promoveu a despolarização de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* de ratos. Interessantemente, essa resposta foi inibida pela prévia microinjeção de oxamate (inibidor LDH5) no *locus coeruleus*. Além disso, Matsuda et al. (2017) estudando neurônios do núcleo subfornicial (SFO) envolvidos com a modulação da ingestão de sódio em camundongos, especificamente neurônios da via do núcleo leito da estria terminal (vBNST, em inglês), observaram que o estímulo hiperosmótico (Na⁺ 160 mM) promoveu aumento na frequência de disparo de interneurônios GABAérgicos envolvidos com a via inibitória de apetite ao sódio. Essa resposta foi abolida pela prévia aplicação do α -CHCA (inibidor do transportador de lactato astrocítico). Nessa condição, os autores observaram uma maior ativação dos neurônios do SFO, sugerindo a participação do lactato astrocítico na modulação da ingestão de Na⁺ na região do SFO.

1.2 Mecanismo de transporte de lactato astrócitos-neurônios (*Astrocyte-neuron Lactate Shuttle*)

Há mais de uma década, Pellerin e Magistretti (1994) formularam um modelo conhecido como *Astrocyte–Neuron Lactate Shuttle* (ANLS) propondo a hipótese da existência de um transporte de lactato do astrócito para o neurônio. Há evidências de que a produção de lactato em astrócitos parece ser estimulada após aumento na concentração intracelular de Na^+ , cujo mecanismo inicia-se quando os astrócitos recaptam o glutamato do espaço extracelular, através do co-transporte com o Na^+ , promovendo consequentemente, um aumento na concentração intracelular astrocítica de Na^+ , a qual ativa a bomba de Na^+/K^+ , promovendo aumento no consumo de ATP, o que induz um aumento no transporte de glicose para o interior dos astrócitos e consequente aumento na produção de piruvato, o qual na presença da LDH5 é convertido à lactato (BOUVIER et al., 1992; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). O lactato astrocítico é então transportado para os neurônios adjacentes, através dos transportadores de monocarboxilato (MCTs) (ALLAMAN; BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2011) (Figura 1).

Existem vários subtipos de MCTs, os astrócitos expressam preferencialmente o transportador de monocarboxilato do tipo 4 (MCT4), um transportador de baixa afinidade, porém de rápido transporte do lactato para o meio extracelular. Os neurônios, por sua vez, expressam o transportador de monocarboxilato do tipo 2 (MCT2), este torna-se saturado em níveis baixos de lactato (alta afinidade) quando comparado ao MCT4. Assim, a velocidade de transporte de lactato dos neurônios é menor em comparação com a dos astrócitos (GANDHI et al., 2009; PIERRE; PELLERIN, 2005; SOTELO-HITSCHFELD et al., 2015; MOSIENKO; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2015; DIMMER et al., 2000).

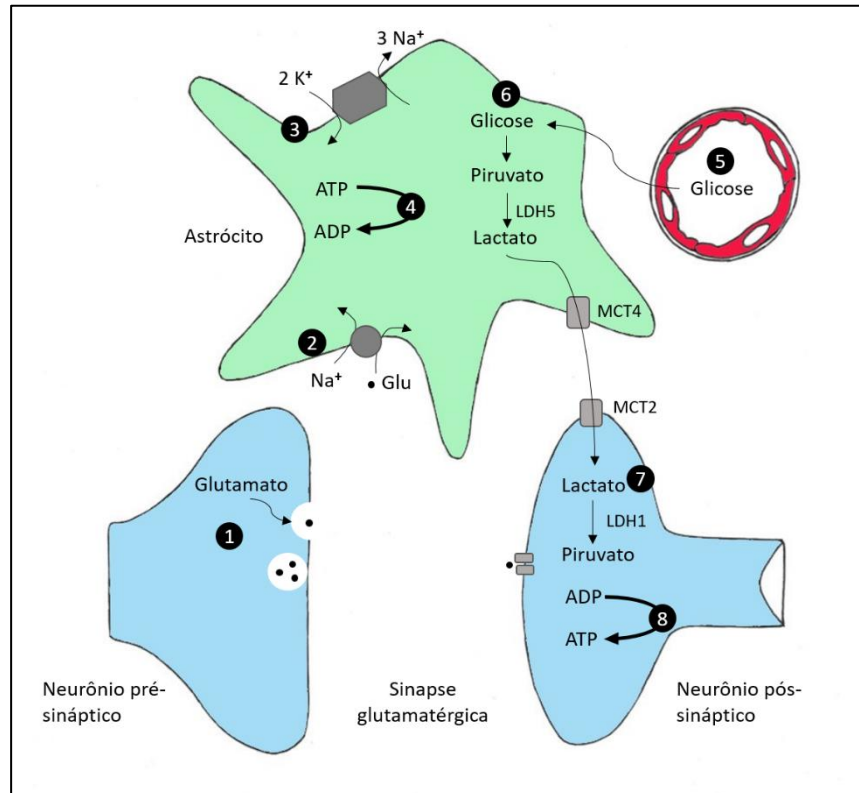


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de transporte de lactato astrócito-neurônio a partir da captação de glutamato pelo astrócito. 1: o glutamato é liberado na fenda sináptica; 2: astrócitos captam o glutamato extracelular através de co-transporte com o sódio; 3: o excesso de sódio intracelular aumenta a atividade da Na^+/K^+ ATPase; 4: o aumento na demanda metabólica causa maior consumo de ATP; 5: glicose sanguínea é captada pelos astrócitos; 6: glicose no interior dos astrócitos é convertida a piruvato e posteriormente a lactato através da enzima Lactato Desidrogenase subtipo 5, sendo transportado para o neurônio pós-sináptico por meio dos transportadores de monocarboxilato; 7: no neurônio, o lactato é convertido a piruvato pela enzima Lactato Desidrogenase subtipo 1; 8: o piruvato é utilizado como substrato energético pelo neurônio, produzindo ATP.

Em relação à via glicolítica, os astrócitos apresentam maior facilidade de absorção de glicose da corrente sanguínea, pois estão em íntimo contato com vasos sanguíneos cerebrais. No interior dos astrócitos, a glicose é transformada em glicose-6-fosfato (G6P) pela ação da enzima hexoquinase, em seguida a presença da enzima glicose-6 translocase fosfato (G6PT) conduz a G6P para o retículo endoplasmático (RE) e a glicose-6-fosfatase (G6Pase) β que é expressa no RE é responsável por desfosforilar a G6P, liberando glicose (MÜLLER; FOUYSSAC; TAYLOR, 2018; PELLERIN, 2018). Esse maquinário enzimático encontra-se presente de maneira similar no hepatócito, porém no cérebro essas enzimas são pouco expressas e consideradas de baixa importância (MÜLLER; FOUYSSAC; TAYLOR, 2018; PELLERIN, 2018).

No entanto, por possuírem essas enzimas os astrócitos são capazes de armazenar glicose no RE, favorecendo, portanto, a formação de uma espécie de estoque de glicose no interior dessa célula; no entanto, ao contrário dos hepatócitos, os astrócitos possuem estrutura enzimática que favorece a produção de lactato a partir da glicose (MÜLLER; FOUYSSAC; TAYLOR, 2018; PELLERIN, 2018). É conhecido que a entrada de piruvato no ciclo de Krebs depende da atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH), responsável por converter piruvato em acetil-CoA, que em condições basais apresenta menor atividade em astrócitos quando comparada com neurônios, fazendo com que o processamento do piruvato no ciclo de Krebs seja limitado, favorecendo assim a atividade glicolítica para a formação de lactato em astrócitos (HALIM et al., 2010; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015; ZHANG et al., 2014).

Nesse sentido, a produção de lactato é maior em astrócitos, enquanto os neurônios funcionam como células consumidoras de lactato. Um estudo *in vivo*, realizado com camundongos, através da utilização de um sensor de lactato, conhecido como Laconic, mensurou a captação de lactato em neurônios e astrócitos após infusão periférica intravenosa de lactato, eles observaram um maior sinal do sensor em neurônios do que em astrócitos sugerindo uma maior captação de lactato por parte dos neurônios. Além disso, os autores observaram que ao realizar a infusão intravenosa de piruvato, aumentando a concentração do piruvato extracelular no cérebro, houve uma redução significativa na concentração de lactato nos astrócitos, mas pouca alteração nos neurônios, o que sugere que os neurônios não possuem acúmulo de lactato já que não houve redução no seu nível de concentração após a infusão de piruvato, apoiando a existência do mecanismo ANLS (MÄCHLER et al., 2016).

Esses trabalhos em conjunto, suportam a hipótese de que os astrócitos produzem lactato, o qual é transportado via MCT4 para o meio extracelular, de onde é recaptado pelos neurônios adjacentes através dos transportadores MCT2. No interior dos neurônios, o lactato é convertido a piruvato e utilizado para produção de ATP, promovendo o fechamento dos canais de K^+ dependentes de ATP e consequentemente a despolarização neuronal (Figura 1) (MOSIENKO; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2015; TANG et al., 2014).

1.3 Transporte de lactato astrócito-neurônio e a modulação hidroeletrolítica

Os OCVs, localizados na região da lâmina terminal, são constituídos pelo órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano e SFO, os quais apresentam barreira hematoencefálica mais permeável (GROSS et al., 1987). Há na região do OVLT e SFO a presença de osmorreceptores, sensíveis ao aumento na concentração de Na^+ extracelular (HIYAMA; NODA, 2016; NODA; HYAMA, 2015a). O SFO é considerado um órgão circumventricular sensorial (GROSS et al., 1987), um dos principais núcleos envolvidos com mecanismos que controlam a ingestão de água e sódio (FITZSIMONS, 1998). Recentemente, foi descrita a existência de canais de Na^+ (denominados Na_x) em astrócitos do SFO (HIYAMA; NODA, 2016; NODA; HYAMA, 2015a; NODA; HYAMA, 2015b; MCKINLEY et al., 2003). Esses canais encontram-se expressos em processos perineurais de astrócitos e células endoteliais envolvendo populações neurais específicas, incluindo os interneurônios GABAérgicos no SFO (NODA; HIYAMA, 2015a).

Em situações em que há aumento da concentração extracelular de Na^+ , ocorre a ativação dos canais Na_x astrocítico, promovendo um aumento no influxo de Na^+ e consequente aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e do consumo de ATP, induzindo ao metabolismo anaeróbico da glicose que, por sua vez, aumenta a produção do lactato astrocítico, como descrito acima e representado na figura 1 (HIYAMA; NODA, 2016; MATSUDA et al., 2017; NODA; HYAMA, 2015a; SHIMIZU et al., 2007; WATANABE et al., 2006).

Estudos de Shimizu et al. (2007) ao mensurarem a quantidade de lactato e piruvato liberadas pelo SFO constataram aumento de 60% na secreção de lactato de camundongos *Wild type* comparado com os que tiveram o silenciamento do Na_x ; em contraste houve redução na liberação de piruvato, sugerindo a estimulação da glicólise anaeróbica em astrócitos Na_x da região do SFO. Esses estudos sugerem que os canais Na_x astrocíticos aumentam a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e estimulam a glicólise anaeróbica de forma dependente da concentração de Na^+ extracelular.

É conhecido que o lactato astrocítico, ao ser liberado por meio do transportador subtipo MCT4, é captado pelos neurônios circunvizinhos, incluindo os interneurônios GABAérgicos, sendo utilizado como substrato energético para síntese de ATP. O aumento da síntese de ATP neural conduz ao fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP intracelular, provocando então a despolarização dos interneurônios

GABAérgicos (HIYAMA; NODA, 2016; SHIMIZU et al., 2007; SONG; ROUTH, 2005). Estudos do grupo do Dr. Noda, sugerem que esse mecanismo astrócito-lactato-GABA na região do SFO estaria envolvido com a via inibitória da ingestão de sódio. Essa via inibitória é estimulada quando há aumento do Na⁺ extracelular, como observado na privação hídrica, fazendo com que o animal apresente inicialmente aversão à ingestão de sódio (HIYAMA; NODA, 2016; MATSUDA et al., 2017; NODA; HIYAMA, 2015b; SHIMIZU et al., 2007).

Não obstante, estudo *in vitro* do mesmo laboratório, foi observado que o aumento dos níveis de Na⁺ extracelular induz à ativação de interneurônios GABAérgicos do SFO; além disso, esse mecanismo foi inibido na presença do α -CHCA (inibidor do MCT4) (SHIMIZU et al., 2007). Esses estudos, em conjunto, sugerem que há uma interação entre astrócitos, lactato e interneurônios GABAérgicos da região do SFO para a modulação do balanço hidroeletrolítico.

1.4 O papel do óxido nítrico na modulação do balanço hidroeletrolítico

O óxido nítrico (NO) é um gás lipofílico sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (BREDT; SNYDER, 1994; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1989). Essa enzima encontra-se em várias estruturas do cérebro, como nos OCVs (OVLT, SFO), bem como em outros núcleos hipotalâmicos envolvidos com a modulação do balanço hidroeletrolítico, tais como, núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico (SON).

Diferentes estudos sugerem que o NO pode atuar no SNC como um modulador inibitório no SNC o qual, sabe-se, atua modulando positivamente a atividade de interneurônios GABAérgicos; uma vez que a utilização de doador (Nitroprussiato de sódio, NPS) e precursor de NO (L-arginina), *in vitro*, elevou a frequência e amplitude de correntes pós-sinápticas inibitórias GABAérgicas em neurônios magnocelulares do SON, bem como inibiu, *in vivo*, a atividade desse grupo neuronal em ratos após retrodiálise de NPS no SON (STERN; LUDWIG, 2001). Nesse sentido, o NO produzido no SNC pode participar da modulação das respostas neuroendócrinas e do equilíbrio hidromineral (REIS et al., 2007). Essa modulação na homeostase dos fluidos foi estudada por Reis et al. (2010), o qual evidenciou que a microinjeção prévia da L-arginina (precursor do NO) inibiu o aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina (VP) e ocitocina (OT), reduziu os efeitos antidiurético e natriurético

promovidos pela microinjeção icv de angiotensina II no VL de ratos não anestesiados. Em adição, a microinjeção icv de L-NAME (inibidor da NO-sintase) promoveu elevação da concentração plasmática de VP e OT, além de aumento na ingestão de água e sódio (REIS et al., 2007, 2010).

Outros estudos mostraram que o NO pode modular o metabolismo energético em astrócitos. Estudos *in vitro* comprovaram que a exposição de cultura de células astrocíticas de camundongos a um doador de NO (DETANO) promoveu elevação na concentração de lactato extracelular; provavelmente, nesse caso, o NO estaria competindo com o sítio de ligação do oxigênio na citocromo oxidase mitocondrial do astrócito, ligando-se reversivelmente a essa enzima e inibindo a respiração mitocondrial e consequentemente promovendo estimulação da glicólise anaeróbica e acúmulo de lactato nos astrócitos (MARTÍN et al., 2017).

1.5 Hipótese

Considerando que: 1) existe o modelo *Astrocyte–Neuron Lactate Shuttle*, o qual postula a existência de um transporte de lactato astrócito-neurônio (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994); 2) o lactato pode funcionar como substrato energético para os neurônios e molécula sinalizadora na regulação da osmolalidade plasmática (SHIMIZU et al., 2007); 3) a atividade do sistema inibitório GABAérgico é aumentada com aplicação de NO no SON (STERN; LUDWIG, 2001) e lactato no SFO (SHIMIZU et al., 2007); 4) os interneurônios GABAérgicos modulam a atividade dos neurônios do SFO, os quais estão relacionados com a modulação da ingestão de água e sódio (MATSUDA et al., 2017); 5) que o lactato liberado por astrócitos do SFO estimula interneurônios GABAérgicos envolvidos com a modulação da ingestão de Na⁺ (HIYAMA; NODA, 2016; MATSUDA et al., 2017; NODA; HYAMA, 2015a; SHIMIZU et al., 2007; WATANABE et al., 2006); 6) e que o NO no SNC promove a produção de lactato em astrócitos (ALMEIDA et al., 2001), é nossa hipótese que o NO na região dos OCVs induz à produção e liberação do lactato astrocítico (ativação do mecanismo ANLS), o qual atuaria ativando interneurônios GABAérgicos da via tônica inibitória envolvida na modulação da ingestão de água e sódio (Figura 2).

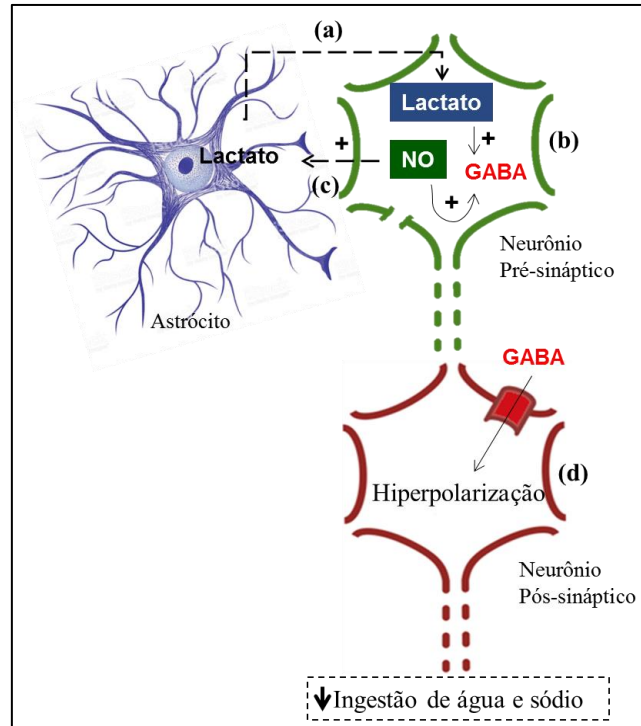


Figura 2: Representação esquemática da interação central entre lactato astrocítico, óxido nítrico (NO) e GABA na modulação da ingestão de água e sódio. (a) Lactato é sintetizado pelos astrócitos e liberado para o meio extracelular por meio do transportador MCT4. (b) Lactato astrocítico é recaptado por neurônios adjacentes, estimulando produção e liberação de GABA. (c) NO promove a liberação de lactato pelos astrócitos e estimula diretamente a produção e liberação de GABA. (d) O GABA inibe neurônios envolvidos com a via tônica de ingestão de água e sódio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a interação central entre o óxido nítrico, lactato e as células da glia (mecanismo ANLS) na modulação comportamental da ingestão de água e sódio em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Avaliar a participação central das células da glia nas respostas comportamentais basais de ingestão de água e sódio, por meio da microinjeção de FCt (inibidor reversível da atividade glial) no VL de ratos;
- 2.2.2 Avaliar a participação central do lactato nas respostas comportamentais basais de ingestão de água e sódio por meio da microinjeção de L-Lactato e α -CHCA (inibidor do transportador de lactato MCT-4 das células da glia) no VL de ratos;
- 2.2.3 Avaliar a participação central das células da glia nas respostas comportamentais de ingestão de água e sódio induzidas pelo L-NAME (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase) por meio da microinjeção prévia de FCt no VL de ratos;
- 2.2.4 Avaliar a participação central do lactato nas respostas comportamentais de ingestão de água e sódio induzida pelo L-NAME, por meio da microinjeção prévia de L-Lactato e α -CHCA no VL de ratos;
- 2.2.5 Analisar a participação central do lactato nas respostas comportamentais de ingestão de água e sódio após privação hídrica de 48h, por meio da microinjeção de α -CHCA no VL de ratos;
- 2.2.6 Mensurar a concentração de lactato presente no SFO de ratos, modelo *ex vivo*, nas seguintes situações: incubação do SFO em 145mM de Na^+ , 145mM de Na^+ + Nitroprussiato de sódio (NPS), 170mM de Na^+ e 170mM de Na^+ + L-NAME.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos ratos *Wistar*, pesando de 270 a 320g, oriundos da Unidade de Produção Animal (UPA-IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba - UFPB. Este local é mantido com temperatura de 21 ± 1 °C e com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes são acesas das 6 às 18 horas), com acesso à água e ração “*ad-libitum*” (Labina®, Purina). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA-CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba sob o número 3013270618, exceto o protocolo relativo ao objetivo 2.2.1, o qual foi previamente aprovado pelo CEUA/UFPB (protocolo n. 133/2015).

3.2 Estereotaxia: implante de cânula-guia em direção ao ventrículo lateral

Utilizamos um aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA) para o implante de cânulas-guia no SNC adaptado à técnica descrita por Michelini e Bonagamba (1988) para o implante das cânulas-guia no ventrículo lateral direito. As cânulas de aço inoxidável (12 mm de comprimento) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 0,7 mm) e fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (75 mg/kg, i.p.) e Xilazina (10 mg/kg, i.p.) (0,2:0,1 v/v, 0,4 ml/100g). A profundidade da anestesia foi verificada pela ausência de resposta reflexa à pinça manual nociva na pata do animal. Em seguida, realizamos a tricotomia dos pelos da região posterior da cabeça e os animais foram fixados no aparelho estereotáxico, onde na sequência foi realizado, com o auxílio de um bisturi, um corte longitudinal na pele e tecido subcutâneo da região da cabeça, para a exibição da calota craniana.

A cânula-guia foi posicionada com base nas coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos e Watson [1986 (AP = -0,7 mm em relação ao bregma; L = -1,5 mm da linha média e DV = -3,9 mm ventral à superfície do osso)]. Realizamos a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. A cânula-guia foi posicionada em direção ao ventrículo lateral e fixada ao crânio com resina acrílica de uso odontológico (Simplex, Rio de Janeiro,

RJ, Brasil), presa por pequenos parafusos de aço-inoxidável que foram preliminarmente inseridos na região occipital do crânio; um mandril foi colocado no interior da cânula-guia e mantido até a data do experimento, para evitar oclusão. Ao final do implante, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico e como medida de profilaxia pós-cirúrgica, injetamos 0,1 ml/100g (intramuscular) de Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (associação de penicilina e estreptomicina, 1,200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e Analgésico injetável ip [intraperitoneal (Banamine 2,2 mg/kg, Schering-Plough, SP, Brasil)] (Figura 3).

3.3 Adaptação à ingestão de sódio

Finalizada a implantação da cânula-guia, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais (Figura 3) com oferta de bebedouros com água e sódio (NaCl 0,3M) e ração “*ad-libitum*”, onde permaneceram inicialmente por um período de 5 dias. Esse período de tempo foi essencial para que os animais se recuperassem da cirurgia, familiarizassem com a localização dos bebedouros de água e sódio na gaiola e se tornassem adaptados à ingestão de sódio. Durante essa fase, foi mensurado diariamente no período entre 13h e 14h o volume de ingestão dos fluidos a fim de analisar a adaptação à ingestão de sódio.



Figura 3: Painei A: Animal posicionado no estereotáxico para o implante de uma cânula guia em direção ao VL direito. Podemos observar o pé de pato, suporte da cânula-guia (seta 1, preta) preso à torre do estereotáxico (seta 2, vermelha). Painei B: Fotografia da gaiola metabólica utilizada durante a execução dos experimentos comportamentais. Podemos observar, posicionados na grade da gaiola os bebedouros, tubos Falcons contendo água e sódio. VL = ventrículo lateral.

3.4 Microinjeções de drogas no ventrículo lateral direito

As drogas foram microinjetadas no ventrículo lateral direito através de uma seringa Hamilton de 1µl (Hamilton, Reno, NV) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha dental (200 µm de diâmetro, Missy) (Figura 4).



Figura 4: Fotografia do momento de microinjeção no VL direito de um rato, em amarelo podemos visualizar o canhão da microinjetora, o qual encontra-se conectado à microseringa por meio de um tubo de polietileno.

Todas as substâncias foram microinjetadas no volume de 0.5µl (REIS et al., 2010). O FCt foi diluído conforme Costa et al. (2013) e PAULSEN et al. (1987), com concentração final de 0,8 µg. O L-NAME e o L-Lactato foram diluídos em solução fisiológica estéril (salina 0,9%) com concentrações finais de 40 µg (SAAD et al., 2004), 2 µg (LAM et al., 2008), respectivamente. O α-CHCA foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) puro a 100mM com concentração final de 3 µg (CHAN et al., 2013). Após a diluição, o pH de todas as soluções foi ajustado para valores próximos a 7,4.

3.5 Coleta da urina e quantificação da osmolalidade

Foi coletada a urina dos animais ao término dos experimentos (concluídas as duas horas de análise comportamental de ingestão de água e sódio) para avaliação do volume e osmolalidade da urina. As amostras foram armazenadas em tubos eppendorf, sendo posteriormente transferidas para um congelador com temperatura de -20 °C até o momento da mensuração da osmolalidade. A osmolalidade urinária foi

avaliada nos seguintes protocolos de microinjeção icv em condições normais de hidratação: Salina + Salina, Salina + L-NAME, FCt + L-NAME, L-Lactato + L-NAME, α -CHCA + L-NAME; e nos protocolos realizados em condições de privação hídrica: salina (24h de desidratação), salina (48h de desidratação) e α -CHCA (48h de desidratação). A osmolalidade da urina (Osmol/kg) foi quantificada utilizando um osmômetro crioscópico automático (Osmomat 030) com base no método de ponto de congelamento. Ao término dos protocolos experimentais, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilazina (0,2:0,1 v/v, 0,4 ml/100g, ip) e preparados para a perfusão.

3.6 Análise histológica

Os animais foram perfundidos transcardiacamente com 10 ml de solução de salina (0,9%) seguida da perfusão com 10 ml de solução formol (10%) tamponada. Em seguida foi realizada a microinjeção no VL direito do corante azul de Evans 2% (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no volume de 0,5 μ l para a determinação do sítio específico da microinjeção. O cérebro foi removido e mantido em recipiente com formol (10%) por 48 horas, posteriormente foi transferido para solução de sacarose (30%) a fim de promover a crioproteção. Os cortes histológicos do cérebro foram realizados no criostato (50 μ m) e montados em lâminas gelatinizadas, sendo prontamente cobertos com lamínulas, corados com panótico rápido (reagente 1: composto por uma solução de triarilmetano a 0,1 e reagente 2: composto por uma solução de xantenos a 0,1%) e por fim analisados através de lupa estereoscópica para identificação do sítio da microinjeção.

3.7 Preparação de modelo *ex vivo* para análise da concentração de lactato no SFO de ratos

Inicialmente os animais foram eutanasiados por decapitação, os cérebros removidos rapidamente (desprezando o bulbo olfatório e cerebelo), posicionados em placa de Petri e submersos em solução Ringer simples possuindo 145 mM de Na⁺, à 37°C. Em seguida, com ajuda de um bisturi foi realizado um corte coronal do cérebro (visão ventral) imediatamente antes de iniciar o quiasma óptico [(Bregma 0,6 mm,

interaural 9,60mm), PAXINOS; WATSON, 2004)] e após o seu término [(Bregma -1,92 mm, interaural 7.08mm), PAXINOS; WATSON, 2004)], de modo que pudesse ser isolada a região contendo o SFO. Posteriormente, a fatia cerebral removida, ainda submersa na solução Ringer, foi posicionada dorsalmente, e um corte na altura do SFO foi realizado utilizando agulha de *punch* para coleta da amostra de tecido. A amostra, contendo o SFO foi imediatamente inserida em tubo eppendorf contendo 10 µl de uma das seguintes soluções: Ringer simples (145mM de Na⁺), Ringer simples (145mM de Na⁺) + doador de NO [NPS 3 mM, (LIU et al., 1997)], Ringer modificado (170 mM de Na⁺) ou Ringer modificado (170 mM de Na⁺) + L-NAME [500 µM, (TONIN et al., 2009)] com incubação por 1h à 37°C. Todas as amostras foram incubadas na presença de 10 µl de TTX para eliminar a influência neuronal [(1 µM, (SHIMIZU et al., 2007)]. A seguir, a amostra de tecido foi cuidadosamente transportada para um outro tubo eppendorf contendo 100 µl de água destilada estéril, e homogeneizada com auxílio de um triturador giratório elétrico, até que não fosse mais possível visualizar tecido sólido. Na sequência, a amostra foi centrifugada (7000 rpm por 10 minutos) e coletado o sobrenadante, o qual foi armazenado em gelo até o momento da realização da dosagem do lactato.

3.8 Dosagem do lactato contido no SFO

O lactato foi analisado através de kit comercial de lactato enzimático (Bioclin, Lactato K084). Para tanto, foi realizada a mistura de 4 partes do Reagente Nº 1 [Tampão (pH 10,0), LDH > 24 KU/L e conservante] com 1 parte do Reagente Nº 2 [NAD > 4 mmol/L, Tampão Citrato 200 mmol/L (pH 3,0) e conservante]. Em seguida, foram marcados 3 tubos de ensaio com as letras B (Branco), P (Padrão) e A (Amostra); no Branco foram pipetados 10µL de água e 1mL de monoreagente; no Padrão, 10µL do Reagente Nº 3 (Lactato 30 mg/dL e conservante) e 1mL de monoreagente; enquanto no tubo Amostra, 10µL da amostra e 1mL de monoreagente. As soluções foram homogeneizadas suavemente, incubadas por 5 minutos a 37°C. A absorbância da amostra foi analisada por meio de um espectrofotômetro em 340 nm, acertando o zero com Branco, sendo lida em no máximo 30 minutos.

Para calcular o lactato, utilizamos o seguinte cálculo:

$$\text{Lactato (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times \text{Concentração do Padrão}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Como fator de calibração, usamos a seguinte fórmula:

Fator de Calibração = $\frac{\text{Concentração do Padrão}}{\text{Absorbância do Padrão}}$

Absorbância do Padrão

mg/dL = Abs. da Amostra x Fator de Calibração

3.9 Drogas

3.9.1 Solução fisiológica estéril (0.9%) – veículo.

3.9.2 Fluorocitrato- FCt (Sal de bário / Sigma Aldrich, F9634).

3.9.3 Cloridrato de cetamina [Anestésico (Quetamina® Laboratório – Vetnil, Brasil)].

3.9.4 Xilazina [Analgésico e Relaxante muscular (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha)].

3.9.5 Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (associação de penicilina e estreptomicina, Fort Dodge, SP, Brasil).

3.9.6 Banamine [(Analgésico) Schering-Plough, SP, Brasil)].

3.9.7 L(+)-lactate (Santa Cruz Biotechnology, sc-220120).

3.9.8 Nomega-Nitro-L-arginine methyl ester (L-Name) (Sigma Aldrich, N5751).

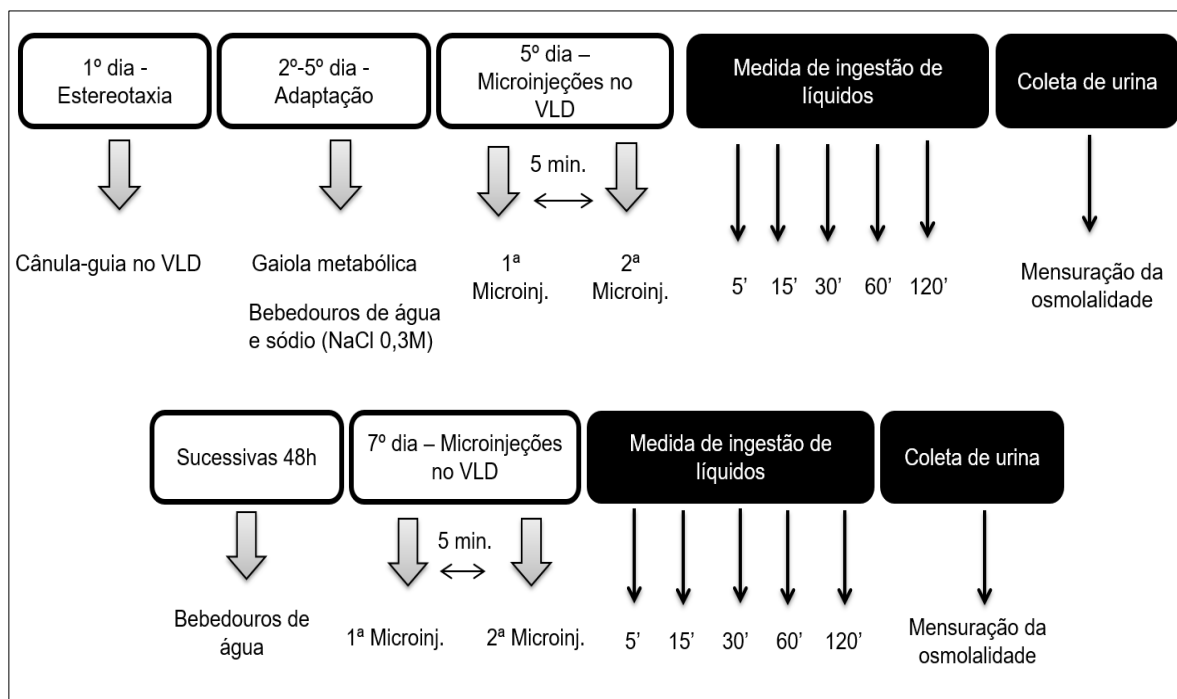
3.9.9 Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) (Santa Cruz Biotechnology, sc-254923).

3.9.10 Sodium Nitroprusside Dihydrate (MP Biomedicals, LL, 29525 Fountain Pkwy, Solon, Ohio).

3.10 Protocolos experimentais

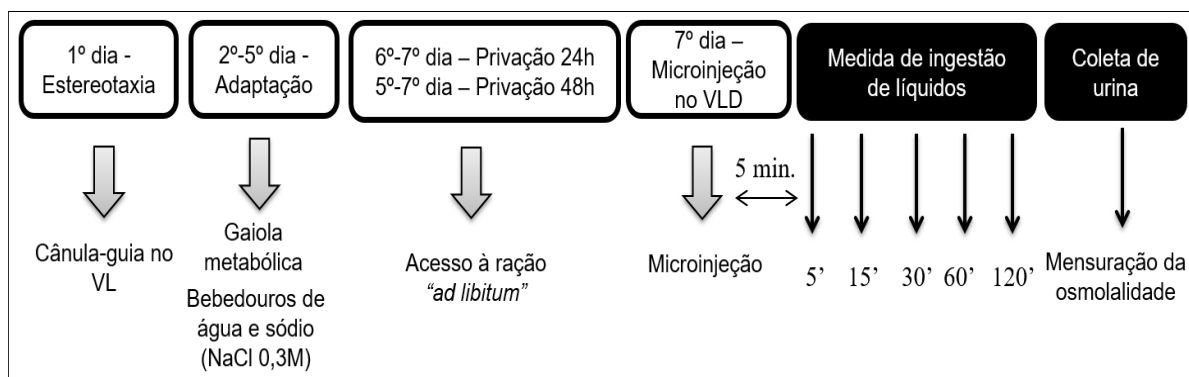
Após a estereotaxia e recuperação do efeito da anestesia, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas contendo além do bebedouro com água e ração “*ad libitum*”, um bebedouro com Na⁺ (NaCl 0,3M), para a adaptação dos animais à ingestão de sódio (Figura 3, painel B). Após 5 dias, iniciamos os protocolos de microinjeção icv. O mesmo grupo de animais foi utilizado para execução de dois protocolos de microinjeção em condição de normohidratação (ASNAR et al., 2013; RONCARI et al., 2014, 2017, 2018), obedecendo ao princípio dos 3R's, com intervalo de 48h entre os protocolos (protocolos realizados no 5º dia e 7º dia após a estereotaxia).

No dia do experimento de microinjeção, o mandril da cânula-guia foi removido cuidadosamente e os experimentos iniciaram-se após 30 min, permitindo então a ambientação dos animais. Em cada protocolo, realizamos a 1ª microinjeção e 5 min. após realizamos a 2ª microinjeção, na sequência avaliamos a ingestão de água e sódio nos tempos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a 2ª microinjeção icv (FLÔR et al., 2018). Durante todos os protocolos, ao final, realizamos a coleta da urina dos animais.



Esquema das fases do protocolo experimental para microinjeção e análise comportamental em animais normohidratados. Legenda = VLD: ventrículo lateral direito.

Os protocolos desenvolvidos em condições de privação hídrica (24h e 48h) foram realizados 7 dias após a canulação do VL direito. Após a adaptação à ingestão de Na⁺, conforme descrito acima, para a privação hídrica bebedouros de água e sódio foram removidos durante 24h ou 48h, mantendo apenas na gaiola metabólica a ração “*ad libitum*”. No dia do experimento, o mandril da cânula-guia foi removido cuidadosamente e os experimentos iniciaram-se após 30 min, permitindo então a ambientação dos animais. Nos protocolos de privação hídrica, realizamos apenas uma microinjeção icv e após 5 minutos retornamos os bebedouros de água e sódio às gaiolas. A medida da ingestão de água e sódio foram realizadas nos tempos 5, 15, 30, 60 e 120 min. após a oferta dos fluidos. Ao final dos protocolos realizamos a coleta da urina.



Esquema das fases do protocolo experimental para microinjeção e análise comportamental em animais sob privação hídrica. Legenda = VLD: ventrículo lateral direito.

3.10.1 Microinjeções icv em ratos submetidos a condições normais de hidratação:

Para avaliarmos a nossa hipótese, realizamos oito protocolos em condições de normohidratação, os quais são descritos na sequência:

No primeiro protocolo realizamos a 1ª microinjeção icv de salina estéril (0,9%) e 2ª microinjeção icv de salina estéril (0,9%). Esse protocolo foi realizado para o controle do volume da microinjeção.

No segundo protocolo, para avaliarmos se o L-Lactato icv altera a ingestão basal de água e sódio em ratos, realizamos a microinjeção icv de salina estéril (0,9%) e de L-Lactato (15nmol/0.5µl, LAM et al., 2008). No terceiro protocolo, para avaliarmos a participação do lactato astrocítico na ingestão basal de água e sódio em ratos, realizamos a microinjeção icv de salina estéril (0,9%) e de α-CHCA (15nmol/0.5µl, CHAN et al., 2013), um inibidor do transportador de lactato astrocítico (MCT-4).

No quarto protocolo para confirmarmos a participação do NO na ingestão basal de água e sódio em ratos, realizamos a microinjeção icv de salina estéril (0,9%) e de L-NAME (0,14pmol/0.5µl, (SAAD et al., 2004), inibidor não específico da enzima NO-sintase. No quinto protocolo, para avaliarmos a participação das células da glia dos OCVs na ingestão basal de água e sódio realizamos a microinjeção icv de salina estéril (0,9%) e de FCt, inibidor reversível da glia (1nmol/0.5µl, PAULSEN et al., 1987). No sexto protocolo, para avaliarmos a interação entre a glia dos OCVs e o NO na ingestão

de água e sódio, realizamos a microinjeção icv de FcT (1nmol/0.5µl, PAULSEN et al., 1987) e após 5 minutos a microinjeção icv de L-NAME (0,14pmol/0.5µl, SAAD et al., 2004).

Na sequência, para avaliarmos a interação entre o lactato e o NO na ingestão de água e sódio induzida pelo L-NAME (7º e o 8º protocolos), realizamos a microinjeção icv de α -CHCA (15nmol/0.5µl, CHAN et al., 2013) seguida pela microinjeção icv de L-NAME (0,14pmol/0.5µl, SAAD et al., 2004). No protocolo seguinte realizamos a microinjeção icv de L-Lactato (15nmol/0.5µl, LAM et al., 2008) seguida pela microinjeção icv de L-NAME (0,14pmol/0.5µl, SAAD et al., 2004).

Em todos os protocolos experimentais, a análise da ingestão cumulativa e não cumulativa de água e sódio foi executada aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a segunda microinjeção.

3.10.2 Microinjeções icv em ratos submetidos à privação hídrica:

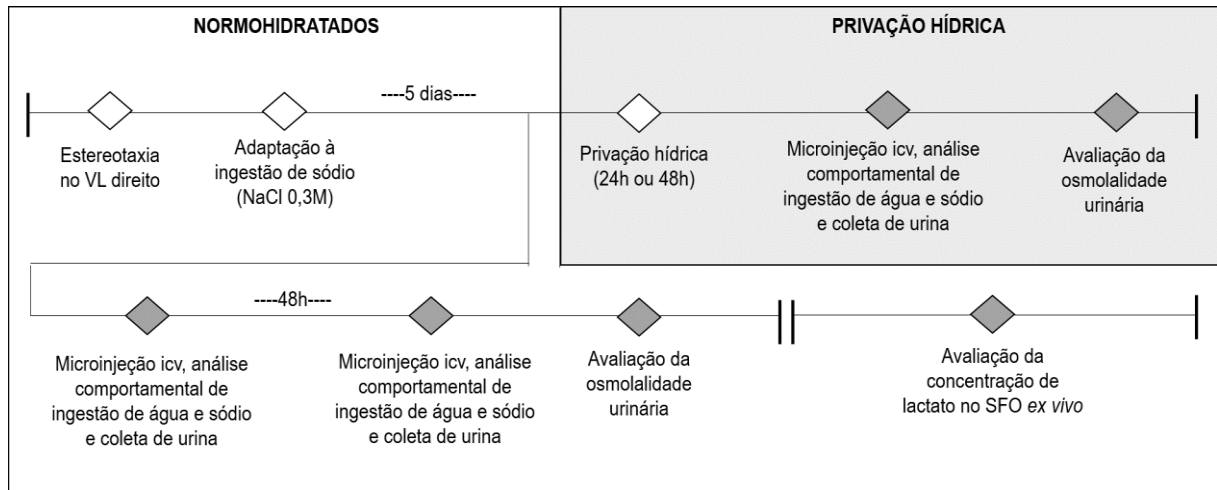
Após a estereotaxia e adaptação à ingestão de água e sódio, iniciamos os protocolos de privação hídrica (PH) por 24 e 48h (conforme descrito acima). Na comparação da ingestão de líquidos após PH observamos que o tempo de 48h foi capaz de promover, inicialmente, uma aversão ao sódio nos animais.

Assim, após 48h de PH realizamos a microinjeção icv de salina estéril (0.9%) ou α -CHCA (15nmol/0.5µl, CHAN et al., 2013), reposicionamos os bebedouros nas gaiolas e avaliamos a ingestão de líquidos. Esse protocolo teve como objetivo avaliar se o lactato astrocítico promove alterações na ingestão de água e sódio em condição de hiperosmolalidade (Na^+) extracelular. A análise da ingestão de água e sódio foi realizada aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a disponibilização dos bebedouros de água e sódio (NaCl 0,3M).

3.10.3 Avaliação da concentração de lactato no SFO de ratos, modelo *ex vivo*:

Após a análise das ingestões de água e sódio, os animais foram eutanasiados por decapitação, o SFO coletado e incubado durante 1h em solução Ringer contendo 145 mM de Na^+ , 145mM de Na^+ + doador de NO [NPS 3 mM, (LIU et al., 1997)], 170 mM de Na^+ , 170 mM de Na^+ + L-NAME [(500µM, (TONIN et al., 2009)], todos na presença de TTX [(1 µM, (SHIMIZU et al., 2007)], conforme detalhado no item 3.7.

Após homogeneização do tecido e centrifugação, o sobrenadante foi coletado para subsequente dosagem do lactato. O objetivo desse protocolo foi avaliar a concentração de lactato no SFO de ratos na condição de aumento da osmolalidade por Na^+ e sob as mesmas circunstâncias na presença de L-NAME.



Linha do tempo resumindo os processos que ocorreram durante os protocolos experimentais. Legenda = VL: ventrículo lateral, SFO: órgão subfornicial.

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como MÉDIA $\pm$ EPM (erro padrão da média) e analisados pelo teste de variância One-way ou Two-way (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas (Tukey, Programa Prisma GraphPad, versão 06). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

Utilizamos 41 ratos *Wistar* com peso entre 270 e 320 g. Logo após a cirurgia para implante da cânula guia no VL direito, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais para adaptação à ingestão de sódio (NaCl 0,3M) durante 5 dias. Podemos observar, na Figura 5, que ao final do período de adaptação (5º dia) os animais encontravam-se adaptados à ingestão de sódio, uma vez que a ingestão de água foi superior à ingestão de sódio ($13,29 \pm 1,10$ vs. $1,68 \pm 0,49$ mL/100g, $n=7$).

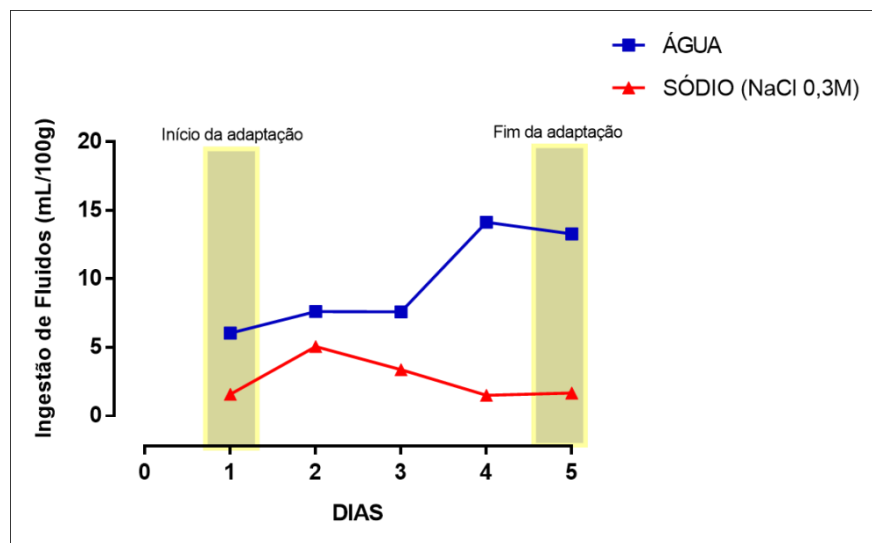


Figura 5: Volume de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M) (mL) durante o período de adaptação à ingestão de sódio.

A Figura 6 mostra a fotomicrografia de uma secção coronal (50 μ m) do cérebro de um rato, representativa de uma histologia positiva. Podemos evidenciar o trajeto da cânula guia em direção ao VL direito.

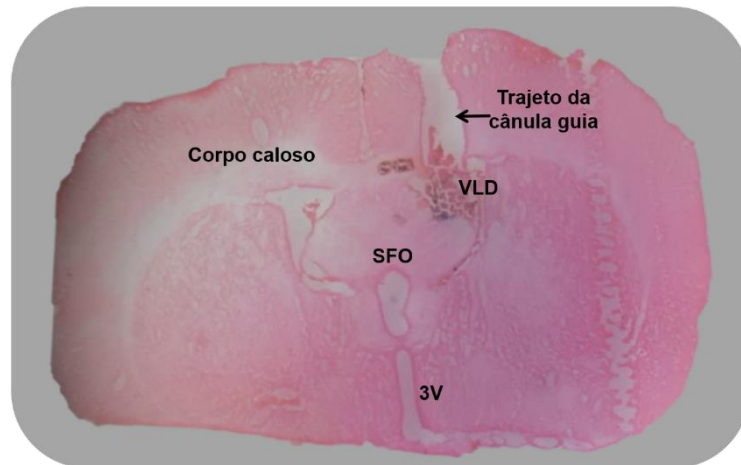


Figura 6: Imagem histológica representativa de um corte coronal do cérebro de um animal evidenciando o trajeto da microinjetora em direção ao VLD. A microinjeção icv pode ser confirmada através da presença do corante de Evans 2% (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no VLD e do trajeto da cânula guia em direção a esse sítio específico. Legenda: SFO = órgão subfornicial, VLD = ventrículo lateral direito, 3V = terceiro ventrículo.

4.1 Respostas comportamentais de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M) à microinjeções icv em ratos:

4.1.1 Microinjeção icv de L-NAME no VL de ratos:

As Figuras 7 e 8 mostram as respostas comportamentais de ingestão de água (Figura 7, painéis A, B e C) ou sódio (Figura 8, painéis A, B e C) induzidas pela microinjeção icv de salina (0,9%) ou L-NAME. Podemos observar que a microinjeção icv de L-NAME promoveu um aumento significativo na ingestão não cumulativa de água aos 60 e 120 minutos (Figura 7, painel A) e cumulativa aos 30, 60 e 120 minutos (Figura 7, painel B), bem como na ingestão total de água ($2,30 \pm 0,18$ vs. $0,06 \pm 0,04$ ml/100g/2h, n=6) (Figura 7, painel C).

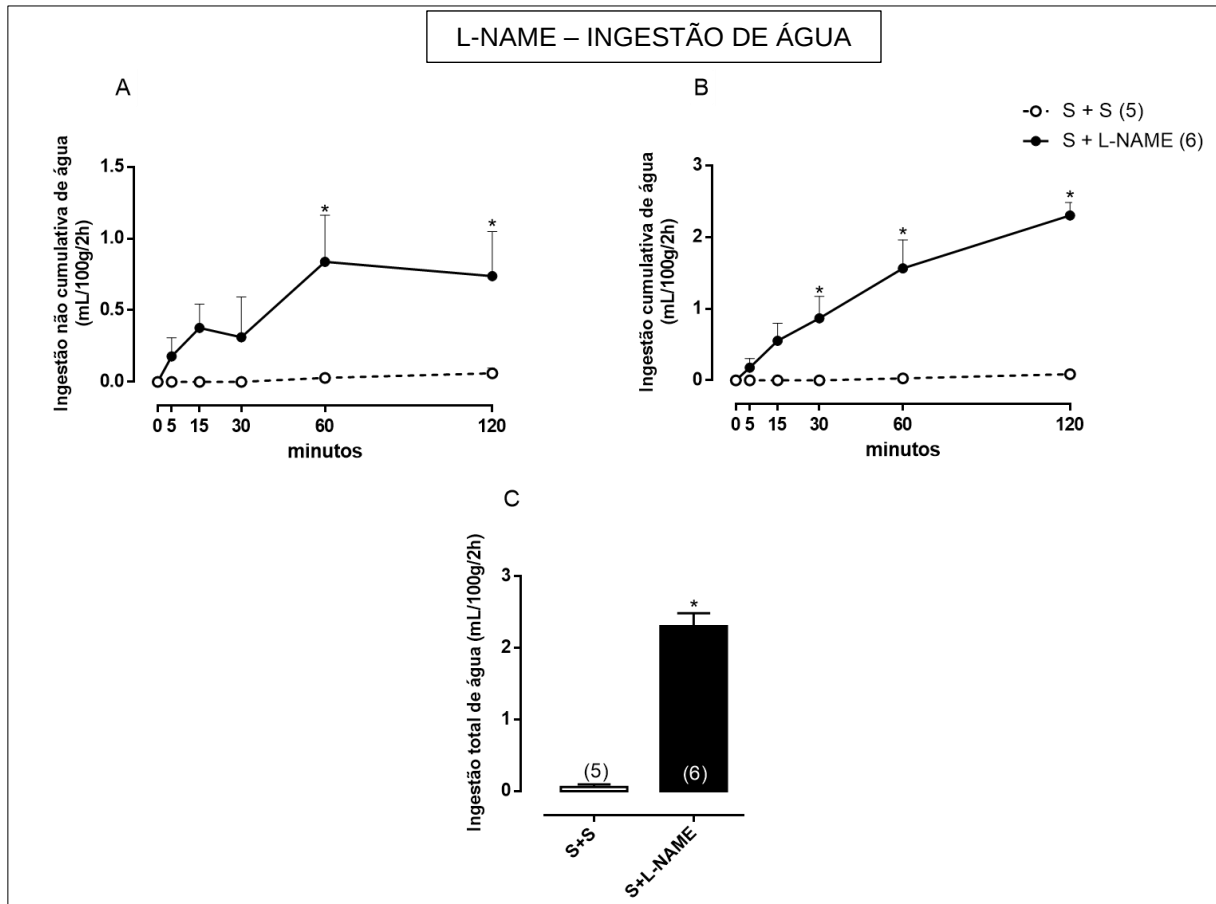


Figura 7: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl) ou L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de água em ratos. Painei A: medida da ingestão não cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painei B: medida da ingestão cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painei C: medida da ingestão total de água (2h). *p<0.05 vs. grupo controle (salina 0,9%). S = salina 0,9%.

Além disso, podemos observar que a microinjeção de L-NAME promoveu um aumento significativo na ingestão não cumulativa de sódio aos 05 e 120 minutos (Figura 8, painei A) e cumulativa aos 05, 15, 30, 60 e 120 minutos (Figura 8, painei B), bem como na ingestão total de sódio ($0,74 \pm 0,05$ vs. $0,03 \pm 0,03$ ml/100g/2h, n=5) (Figura 8, painei C).

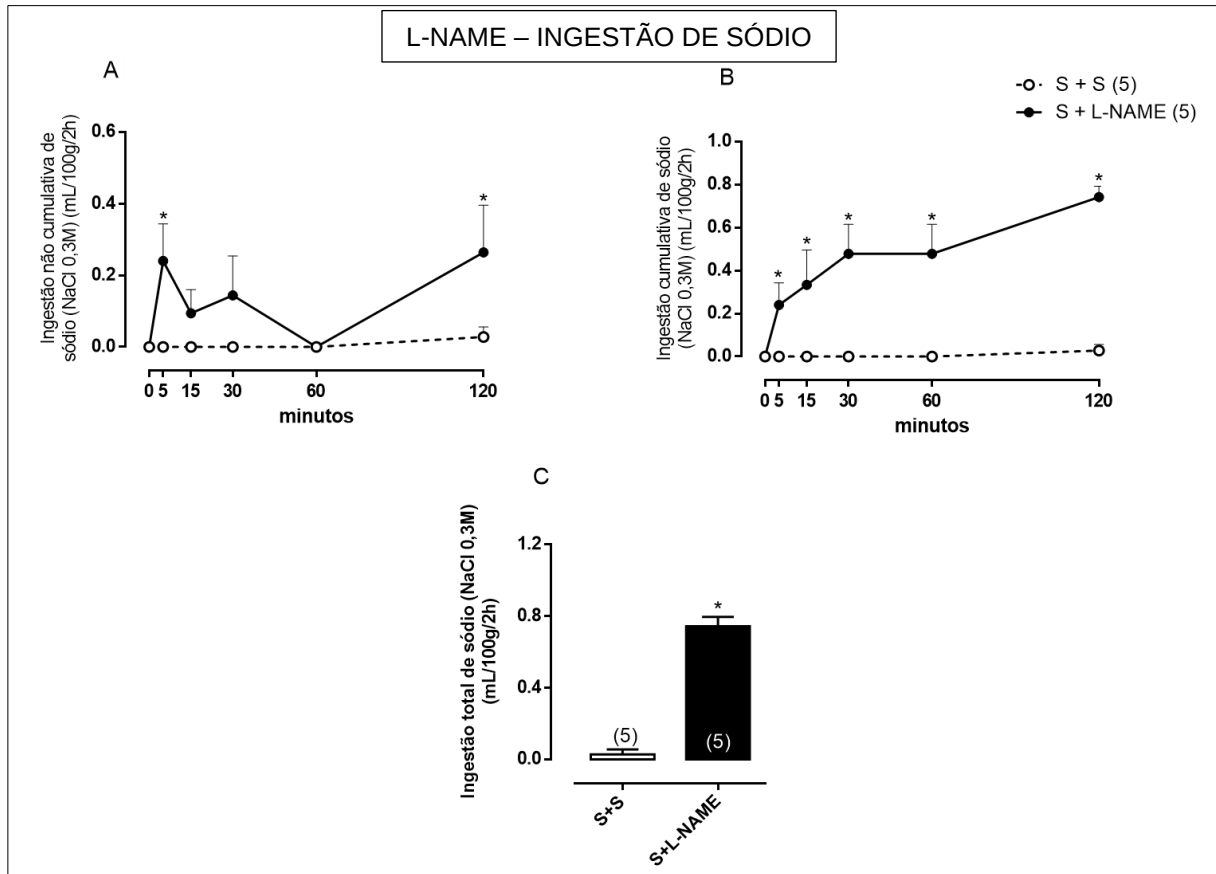


Figura 8: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl) ou L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de sódio (NaCl 0,3M) (2h). *p<0.05 vs. grupo controle (salina 0,9%). S= salina 0,9%.

4.1.2 Microinjeção icv de FCt no VL de ratos:

As Figuras 9 e 10 mostram as respostas comportamentais de ingestão de água (Figura 9, painéis A, B e C) ou sódio (Figura 10, painéis A, B e C) induzida pela microinjeção icv de salina (0,9%) ou FCt. Os resultados mostraram que a microinjeção icv de FCt não alterou a ingestão basal não cumulativa (Figura 9, painel A), cumulativa (Figura 9, painel B) ou ingestão total de água ($0,24 \pm 0,15$ vs. $0,06 \pm 0,04$ ml/100g/2h, n=6) (Figura 9, painel C).

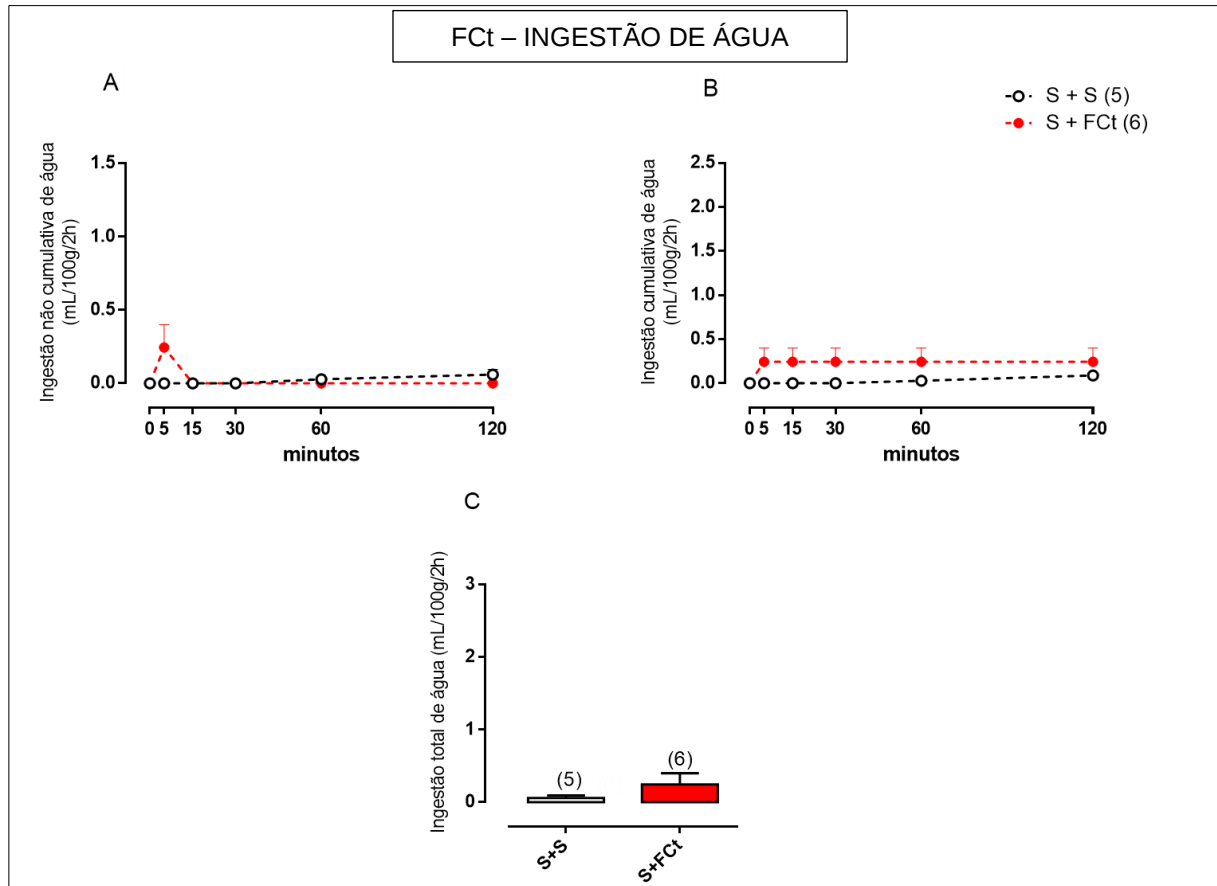


Figura 9: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou FCt (8 µg/0,5µl) sobre a ingestão de água em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de água (2h). S = salina 0,9%.

Além disso, podemos observar que a microinjeção icv de FCt não alterou a ingestão basal não cumulativa (Figura 10, painel A), cumulativa (Figura 10, painel B) ou ingestão total de sódio ($0,06 \pm 0,06$ vs. $0,03 \pm 0,03$ ml/100g/2h, $n=6$) (Figura 10, painel C).

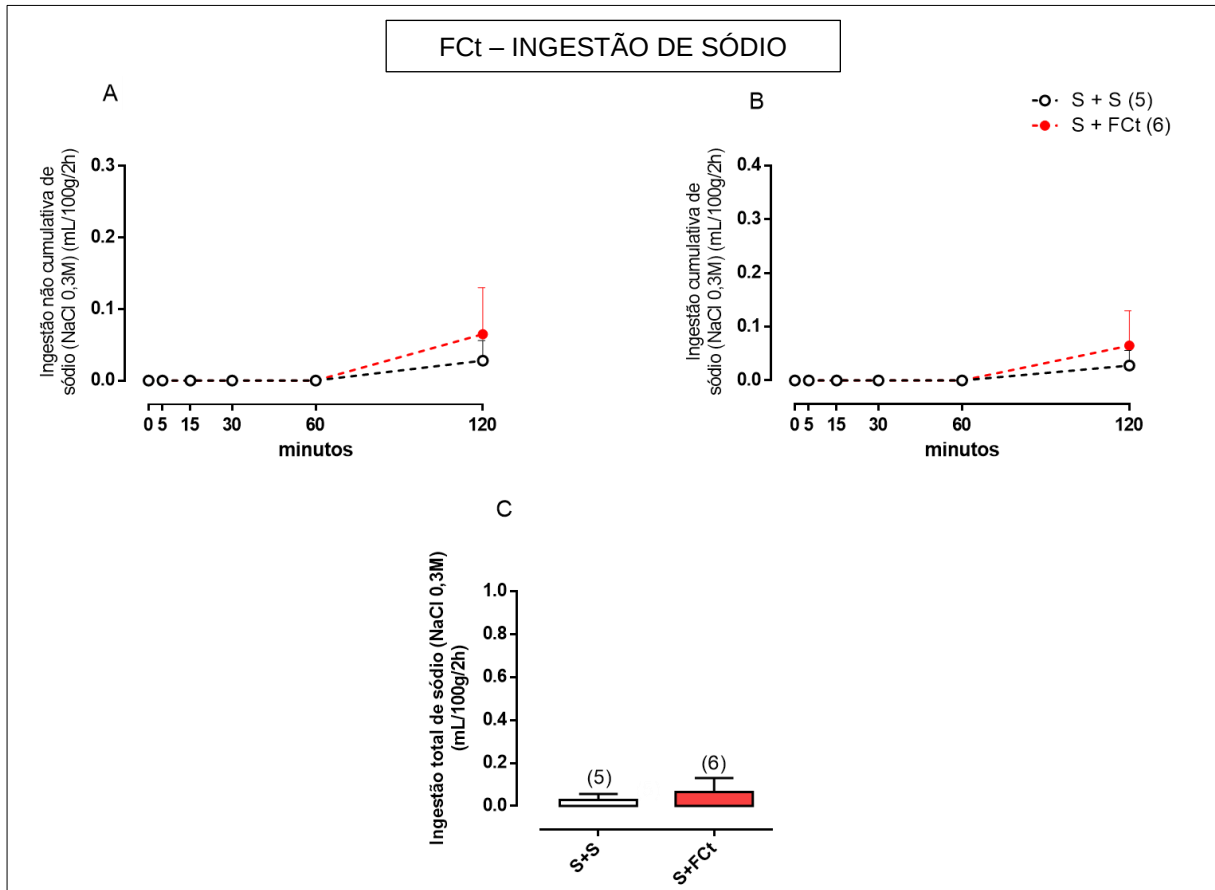


Figura 10: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou FCt (8 µg/0,5µl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de sódio (NaCl 0,3M) (2h). S = salina 0,9%.

4.1.3 Microinjeção icv de FCt seguida de L-NAME no VL de ratos:

As Figuras 11 e 12 mostram as respostas comportamentais de ingestão de água (Figura 11, painéis A, B e C) ou sódio (Figura 12, painéis A, B e C) induzida pela microinjeção icv de salina (0,9%) ou FCt+L-NAME. Os resultados mostraram que a microinjeção icv prévia de FCt reduziu significativamente a ingestão não cumulativa de água aos 60 e 120 minutos (Figura 11, painel A), cumulativa aos 30, 60 e 120 minutos (Figura 11, painel B) e ingestão total de água induzidas pelo L-NAME. ($0,36 \pm 0,10$ vs. $2,30 \pm 0,18$ mL/100g, $n=6$) (Figura 11, painel C). Além disso, podemos observar que a microinjeção icv prévia de FCt reduziu significativamente a ingestão de sódio não cumulativa aos 5 e 120 minutos (Figura 12, painel A) cumulativa aos 5,

15, 30, 60 e 120 minutos (Figura 12, painel B) e ingestão total de sódio induzidas pelo L-NAME ($0,08 \pm 0,08$ vs. $0,74 \pm 0,05$ ml/100g, $n=6$) (Figura 12, painel C).

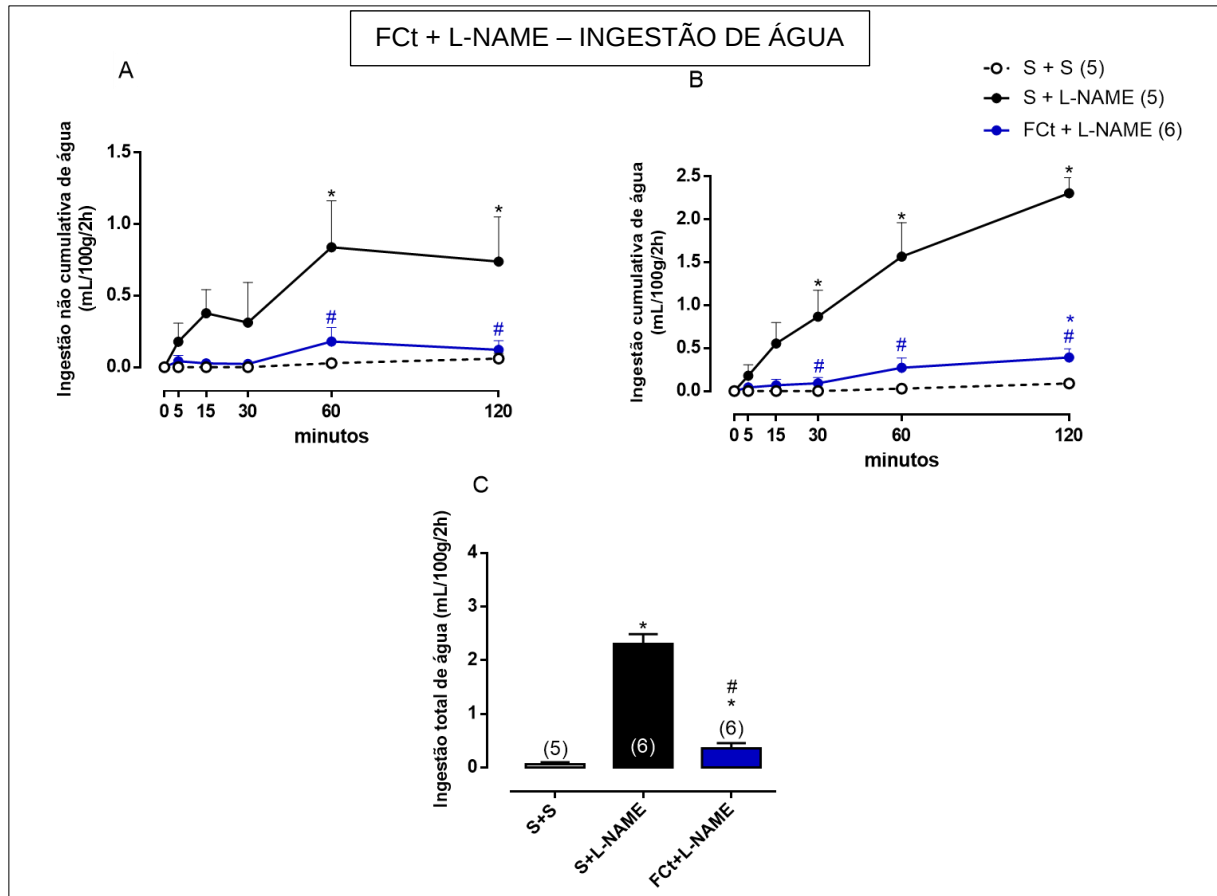


Figura 11: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl) ou microinjeção prévia de FCT (8 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de água em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de água (2h). * $p<0.05$ vs. grupo controle (salina 0,9%), # $p<0.05$ vs. grupo S+L-NAME. S= salina.

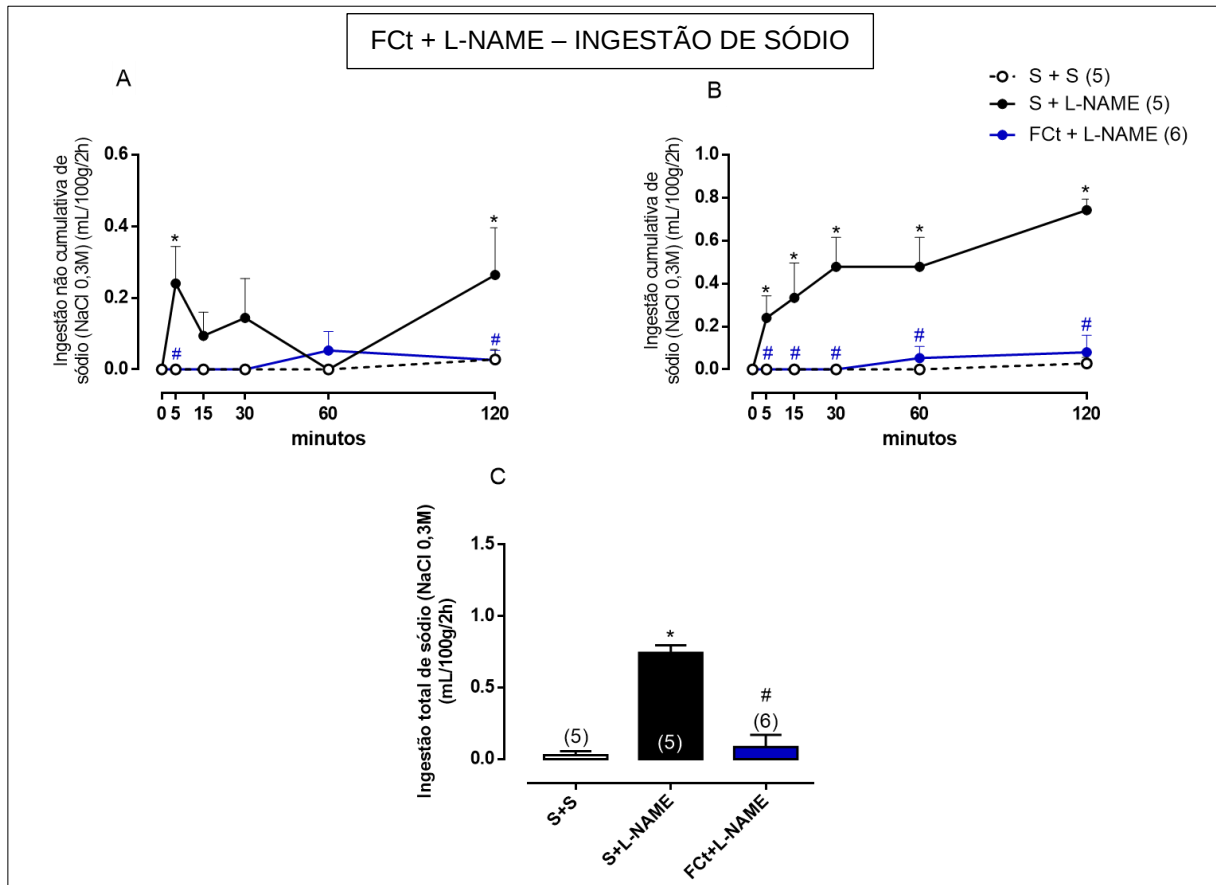


Figura 12: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5µl) ou microinjeção prévia de FCt (8 µg/0,5µl) ao L-NAME (40 µg/0,5µl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de sódio (NaCl 0,3M) (2h). *p<0.05 vs. grupo controle (salina 0,9%), #p<0.05 vs. grupo S+L-NAME. S = salina 0,9%.

4.1.4 Microinjeção icv de L-Lactato e de L-Lactato seguida de L-NAME no VL de ratos:

As Figuras 13 e 14 mostram as respostas comportamentais de ingestão de água (Figura 13, painéis A, B e C) ou sódio (Figuras 14, painéis A, B e C) induzidas pela microinjeção icv de salina (0,9%), L-Lactato ou L-Lactato+L-NAME. Os resultados mostraram que a microinjeção icv de L-Lactato não alterou a ingestão não cumulativa (Figura 13, painel A), cumulativa (Figura 13, painel B) ou total ($0,23 \pm 0,13$ vs. $0,06 \pm 0,04$ mL/100g/2h, n=4) (Figura 13, painel C) de água. Enquanto, a prévia microinjeção icv de L-Lactato aboliu a ingestão não cumulativa de água aos 60 e 120 minutos (Figura 13, painel A), cumulativa aos 30, 60 e 120 minutos (Figura 13, painel B) e ingestão total de água induzidas pelo L-NAME. ($0,08 \pm 0,06$ vs. $2,30 \pm 0,18$ mL/100g/2h, n=6) (Figura 13, painel C). Além disso, podemos observar que a

microinjeção icv de L-Lactato não alterou a ingestão basal não cumulativa (Figura 14, painel A), cumulativa (Figura 14, painel B) e total ($0,0 \pm 0,0$ vs. $0,03 \pm 0,03$ mL/100g/2h, $n=4$) (Figura 14, painel C) de sódio. Enquanto, a prévia microinjeção icv de L-Lactato aboliu a ingestão de sódio não cumulativa aos 05 e 120 minutos (Figura 14, painel A), cumulativa aos 05, 15, 30, 60 e 120 minutos (Figura 14, painel B) e ingestão total de sódio induzidas pelo L-NAME ($0,05 \pm 0,03$ vs. $0,74 \pm 0,05$ mL/100g/2h, $n=5$) (Figura 14, painel C).

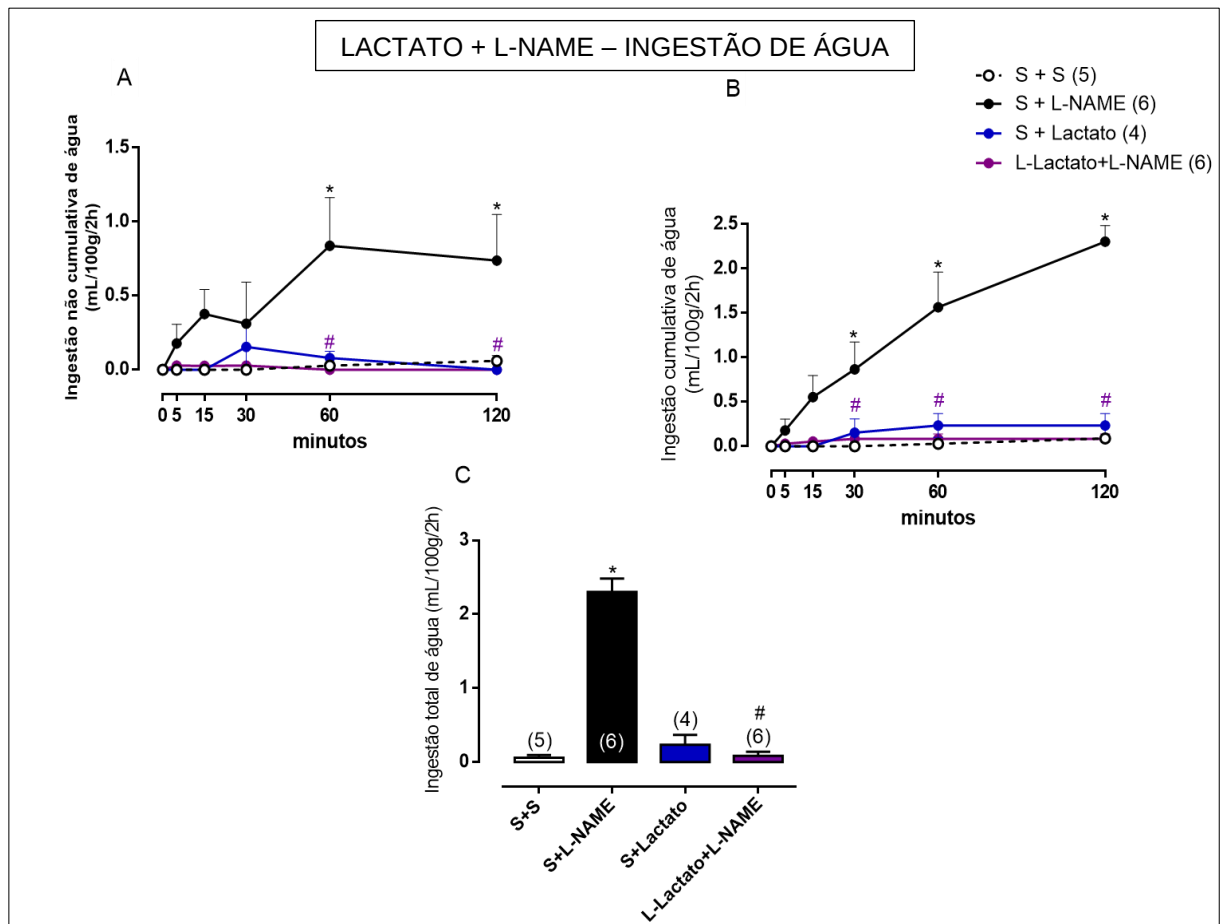


Figura 13: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), L-Lactato (2 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de L-Lactato (2 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de água em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de água (2h). * $p<0.05$ vs. grupo controle (salina 0,9%), # $p<0.05$ vs. grupo S+L-NAME. S = salina 0,9%.

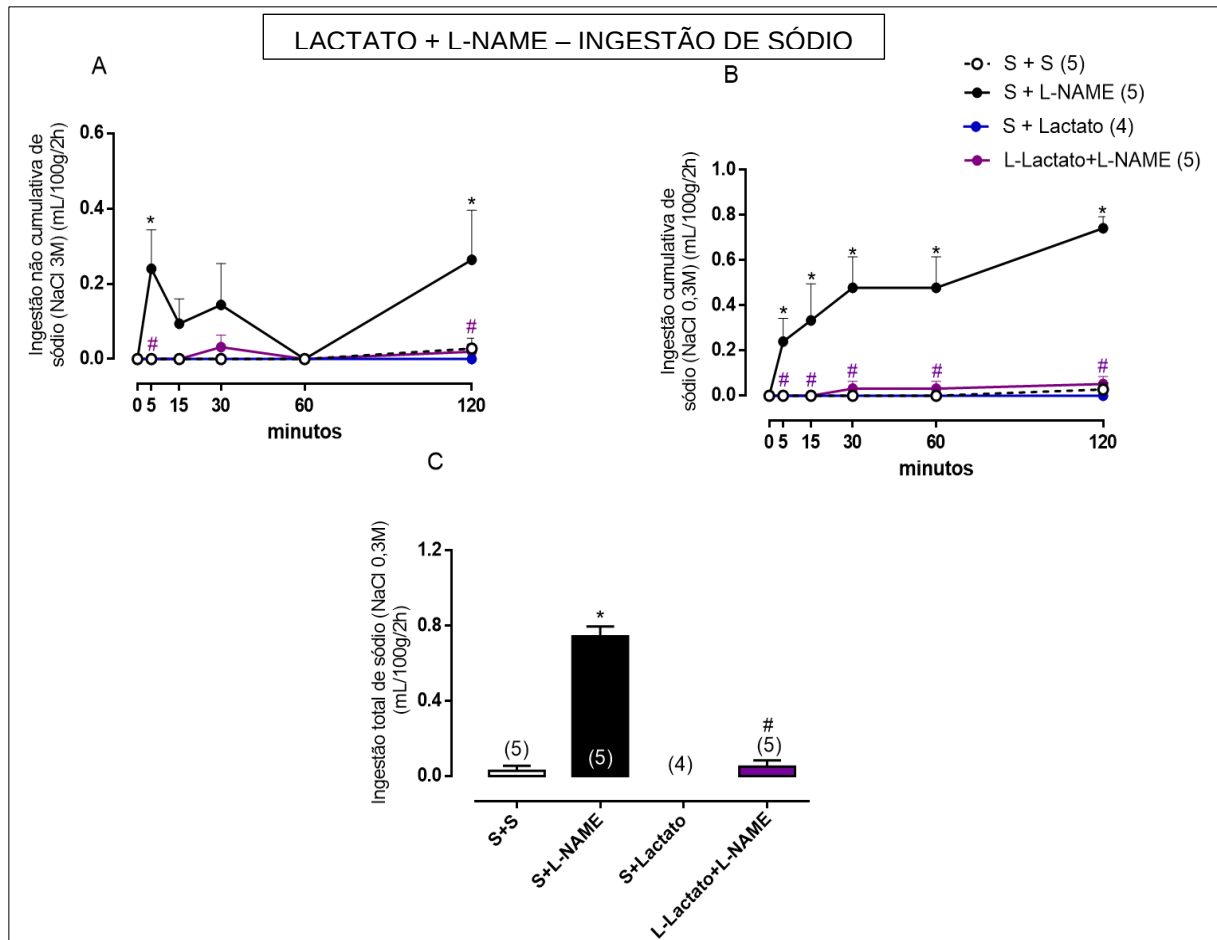


Figura 14: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5 μ l), L-Lactato (2 μ g/0,5 μ l) ou microinjeção prévia de L-Lactato (2 μ g/0,5 μ l) ao L-NAME (40 μ g/0,5 μ l) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de sódio (NaCl 0,3M) (2h). *p<0.05 vs. grupo controle (salina 0,9%), #p<0.05 vs. grupo S+L-NAME. S = salina 0,9%.

4.1.5 Microinjeção icv de α -CHCA e de α -CHCA seguida de L-NAME no VL de ratos:

As Figuras 15 e 16 mostram as respostas comportamentais de ingestão de água (Figuras 15, painéis A, B e C) ou sódio (Figuras 16, painéis A, B e C) induzida pela microinjeção icv de salina (0,9%), α -CHCA ou α -CHCA+L-NAME. Os resultados mostraram que a microinjeção icv de α -CHCA não alterou a ingestão não cumulativa (Figura 15, painel A), cumulativa (Figura 15, painel B) ou ingestão total de água ($0,12 \pm 0,08$ vs. $0,06 \pm 0,04$ ml/100g/2h, n=4) (Figura 15, painel C). Além disso, a prévia microinjeção icv de α -CHCA não alterou a ingestão não cumulativa (Figura 15, painel A), cumulativa (Figura 15, painel B) ou total de água induzidas pelo L-NAME ($2,07 \pm$

0,22 vs. $2,30 \pm 0,18$ ml/100g/2h, n=6) (Figura 15, painel C). Podemos ainda observar que a microinjeção icv de α -CHCA não alterou a ingestão não cumulativa (Figura 16, painel A), cumulativa (Figura 16, painel B) ou ingestão total de sódio ($0,12 \pm 0,08$ vs. $0,03 \pm 0,03$ ml/100g/2h, n=4) (Figura 16, painel C). Além disso, a prévia microinjeção icv de α -CHCA não alterou a ingestão não cumulativa (Figura 16, painel A), cumulativa (Figura 16, painel B) e total de sódio induzidas pelo L-NAME ($0,72 \pm 0,08$ vs. $0,74 \pm 0,05$ ml/100g/2h, n=5) (Figura 16, painel C).

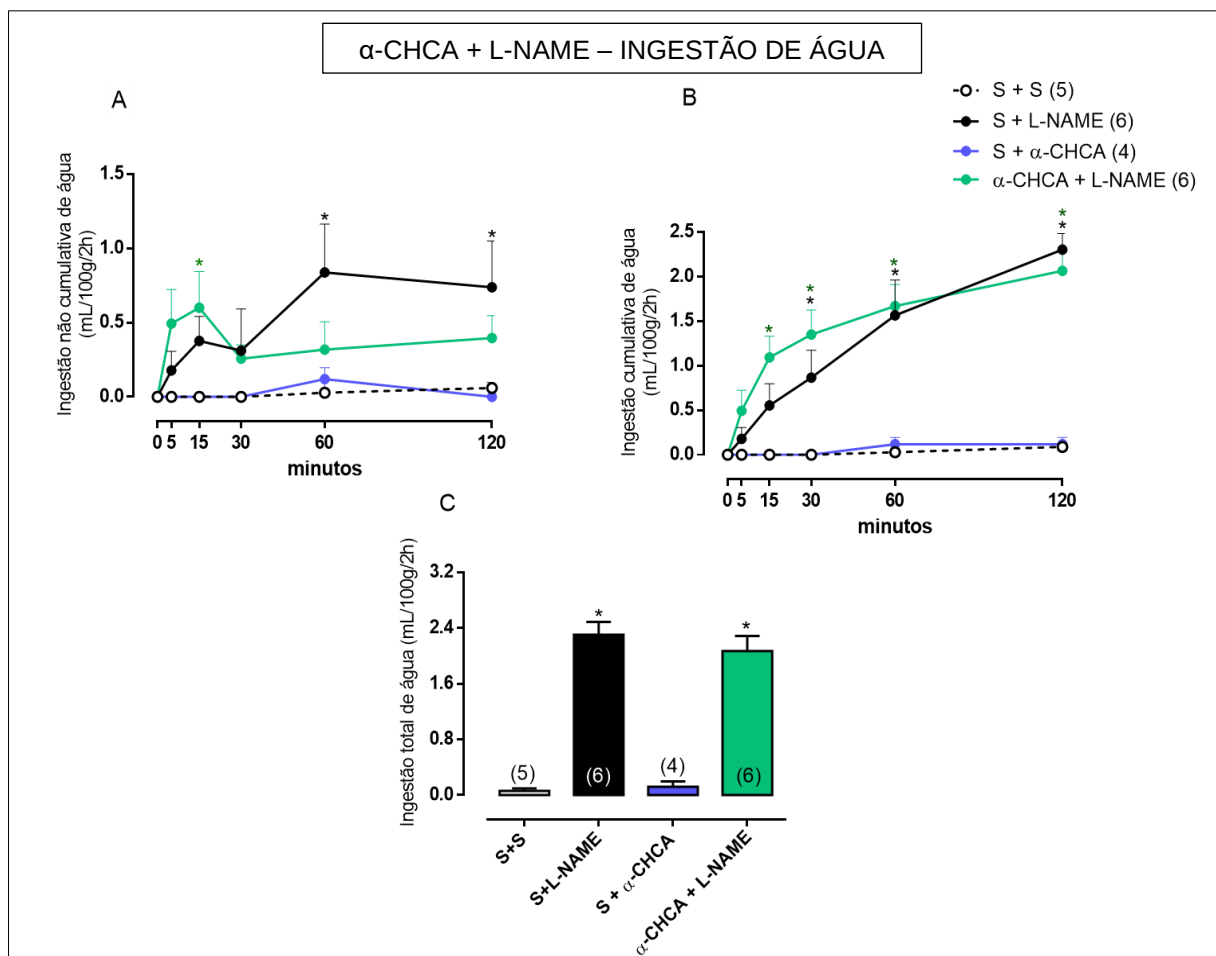


Figura 15: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), α -CHCA (3 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de α -CHCA (3 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de água em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de água, aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de água (2h). *p<0.05 vs. grupo controle (salina 0,9%). S = salina 0,9%.

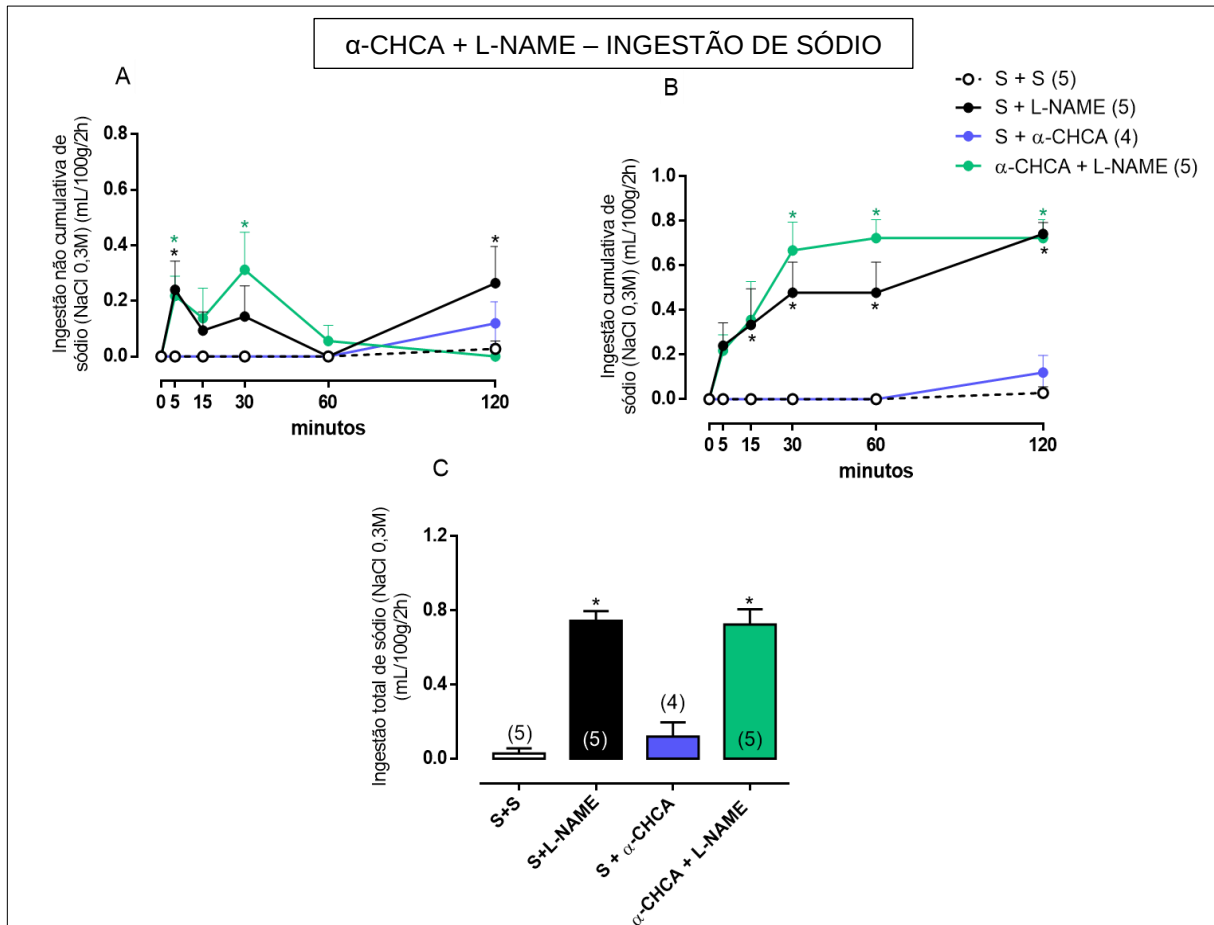


Figura 16: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl), α-CHCA (3 μg/0,5μl) ou microinjeção prévia de α-CHCA (3 μg/0,5μl) ao L-NAME (40 μg/0,5μl) sobre a ingestão de sódio (NaCl 0,3M) em ratos. Painel A: medida da ingestão não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel B: medida da ingestão cumulativa de sódio (NaCl 0,3M), aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após 2ª microinjeção. Painel C: medida da ingestão total de sódio (NaCl 0,3M) (2h). *p<0,05 vs. grupo controle (salina 0,9%). Salina = 0,9%.

4.2 Medida do volume urinário (mL/100g) após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos a condições normais de hidratação:

Realizamos a quantificação do volume urinário dos animais após sucedidos os 120 minutos de análise comportamental de ingestão de líquidos (Figura 17). Os grupos que receberam a microinjeção icv de L-NAME ($0,54 \pm 0,05$ vs. $0,19 \pm 0,10$ mL/100g/2h, n=6) e L-Lactato ($0,58 \pm 0,03$ vs. $0,19 \pm 0,10$ mL/100g/2h, n=4) apresentaram maior volume urinário em comparação ao controle salina 0,9%. Ao contrário, o grupo que recebeu a microinjeção icv de α-CHCA não apresentou

alteração no volume urinário em relação ao controle salina 0,9% ($0,4 \pm 0,06$ vs. $0,19 \pm 0,10$ mL/100g/2h, $n=4$).

A microinjeção de FCt não promoveu alterações significativas no volume urinário ($0,09 \pm 0,05$ vs. $0,19 \pm 0,10$ mL/100g/2h, $n=5$). Por outro lado, a prévia microinjeção de FCt atenuou o aumento no volume urinário induzido pela microinjeção icv de L-NAME ($0,16 \pm 0,02$ vs. $0,54 \pm 0,05$ mL/100g/2h, $n=5$). Além disso, as microinjeções prévias de L-Lactato ($0,38 \pm 0,08$ vs. $0,54 \pm 0,05$ mL/100g/2h, $n=5$) ou α -CHCA ($0,57 \pm 0,11$ vs. $0,54 \pm 0,05$ mL/100g/2h, $n=5$) não promoveram alterações significativas no volume urinário induzido pela microinjeção icv de L-NAME.

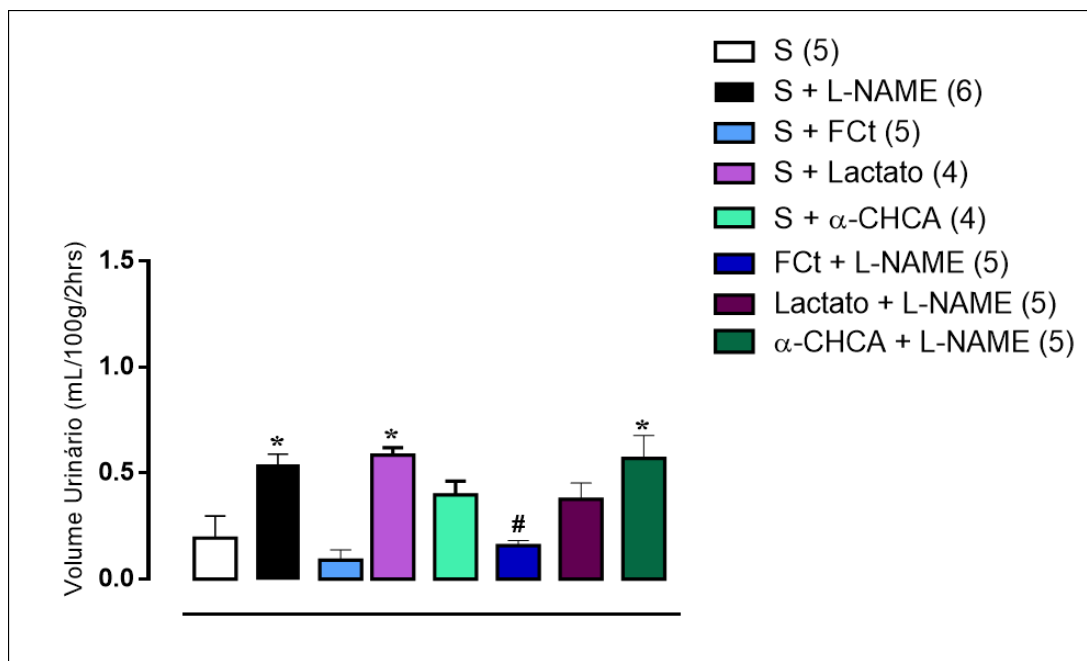


Figura 17: Mensuração do volume urinário dos animais nos diferentes protocolos, após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M). * $p < 0.05$ vs. grupo controle (salina 0,9%), # $p < 0.05$ vs. grupo L-NAME, + $p < 0.05$ vs. grupo S+FCt. S = salina 0,9%.

4.3 Análise da osmolalidade urinária após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos a condições normais de hidratação:

Foi realizada a mensuração da osmolalidade urinária dos animais normohidratados (Figura 18). Os resultados mostraram que o grupo que recebeu a microinjeção de L-NAME apresentou menor osmolalidade urinária em relação ao

grupo controle salina 0,9% ($0,60 \pm 0,09$ vs. $1,17 \pm 0,03$ osmol/Kg, $n=6$), enquanto o grupo que recebeu a microinjeção prévia de FCt seguida de L-NAME apresentou maior osmolalidade urinária ($1,07 \pm 0,07$ vs. $0,60 \pm 0,09$ osmol/Kg, $n=5$) em relação ao grupo L-NAME; já os grupos Lactato + L-NAME ($0,73 \pm 0,10$ vs. $1,17 \pm 0,03$ osmol/Kg, $n=4$) e α -CHCA + L-NAME ($0,36 \pm 0,10$ vs. $1,17 \pm 0,03$ osmol/Kg, $n=4$) apresentaram menor osmolalidade urinária em relação ao grupo controle salina 0,9%.

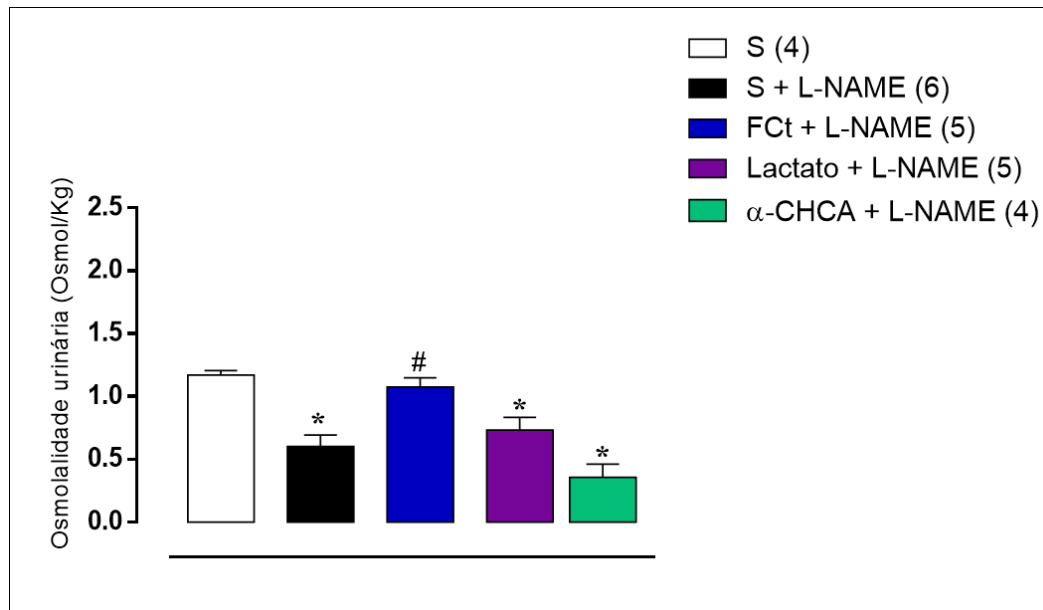


Figura 18: Quantificação da osmolalidade urinária dos animais nos diferentes protocolos, após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M). * $p < 0.05$ vs. salina 0,9%, # $p < 0.05$ vs. L-NAME. S = salina 0,9%.

4.4 Respostas comportamentais de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M) à microinjeções icv em ratos submetidos à privação hídrica (PH):

4.4.1 Microinjeção icv de salina 0,9% em ratos submetidos à PH de 24 ou 48h:

As Figuras 19 e 20 mostram a resposta comportamental de ingestão de água (Figura 19, painéis A, B e C) ou sódio (Figura 20, painéis A, B e C) induzida pela microinjeção icv de salina (0,9%) em ratos submetidos à PH de 24 ou 48h. Os resultados mostraram que tanto a PH de 24h ($4,27 \pm 0,51$ vs. $0,06 \pm 0,04$ ml/100g/2h, $n=8$) quanto PH de 48h ($9,41 \pm 0,50$ vs. $0,06 \pm 0,04$ ml/100g/2h, $n=10$) aumentaram a ingestão total de água (Figura 19, painel C). Ademais, a PH de 48h aumentou a ingestão de água não cumulativa aos 15 e 120 minutos (Figura 19, painel A),

cumulativa aos 15, 30, 60 e 120 minutos (Figura 19, painel B) e total ($9,41 \pm 0,50$ vs. $4,27 \pm 0,51$ mL/100g/2h, $n=10$) (Figura 19, painel C) em comparação à PH de 24h. Além disso, tanto a PH de 24h ($1,21 \pm 0,17$ vs. $0,03 \pm 0,03$ mL/100g/2h, $n=6$) quanto de 48h ($3,28 \pm 0,31$ vs. $0,03 \pm 0,03$ mL/100g/2h, $n=7$) aumentou a ingestão total de sódio (Figura 20, painel C). Ademais, a PH de 48h reduziu a ingestão não cumulativa e cumulativa aos 5 minutos (Figura 20, painéis A e B respectivamente) enquanto aumentou a ingestão não cumulativa aos 30 minutos (Figura 20, painel A), a cumulativa aos 60 e 120 minutos (Figura 18, painel B) e a ingestão total de sódio em comparação à PH de 24h ($3,28 \pm 0,31$ vs. $1,21 \pm 0,17$ mL/100g/2h, $n=7$) (Figura 20, painel C).

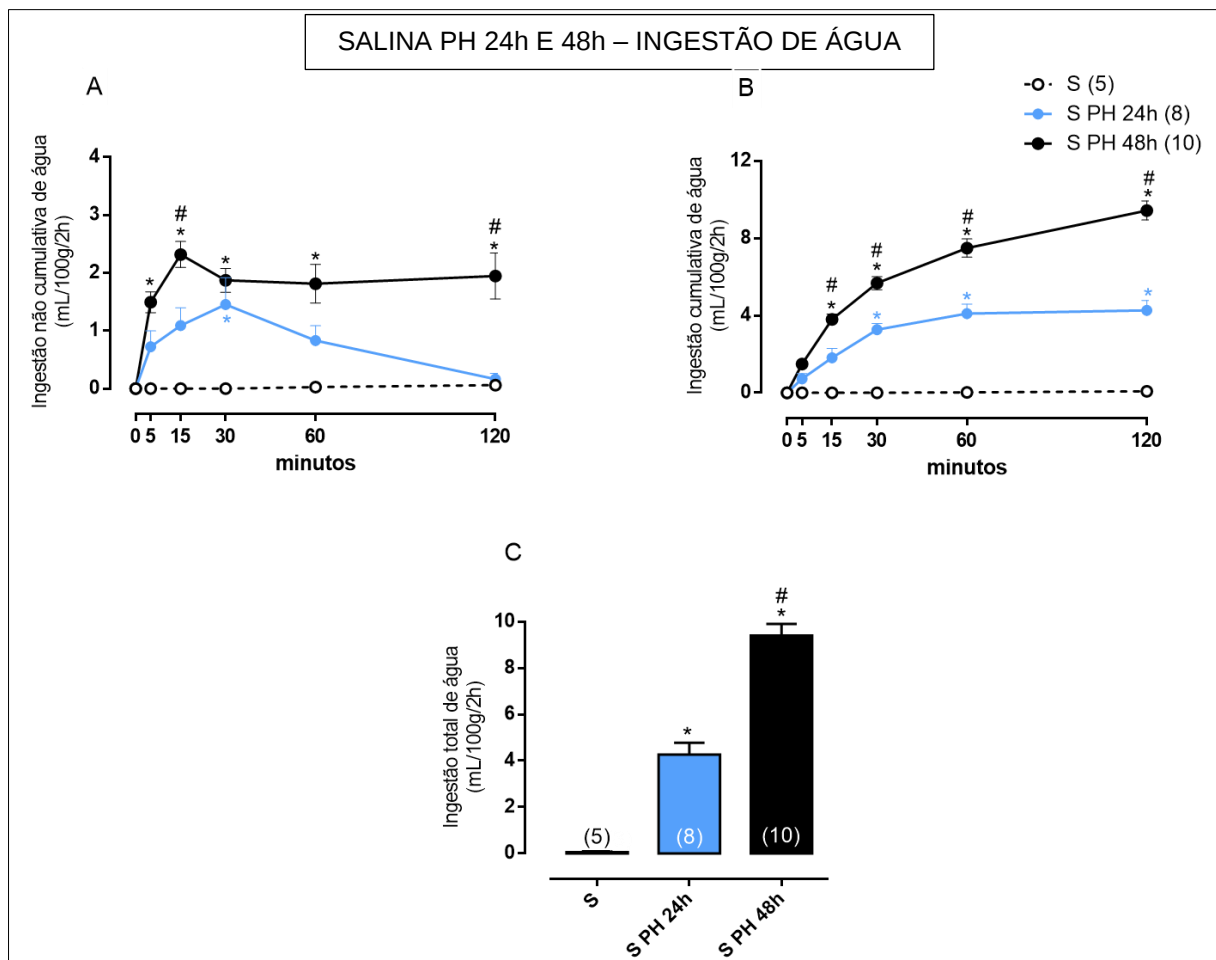


Figura 19: Efeito da microinjeção icv de salina esteril (0,9%/0,5µl) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de água em ratos submetidos à privação hídrica de 24h ou 48h. * $p < 0,05$ vs. salina 0,9%, # $p < 0,05$ vs. salina 0,9% (PH 24h). S = salina 0,9%, PH = privação hídrica.

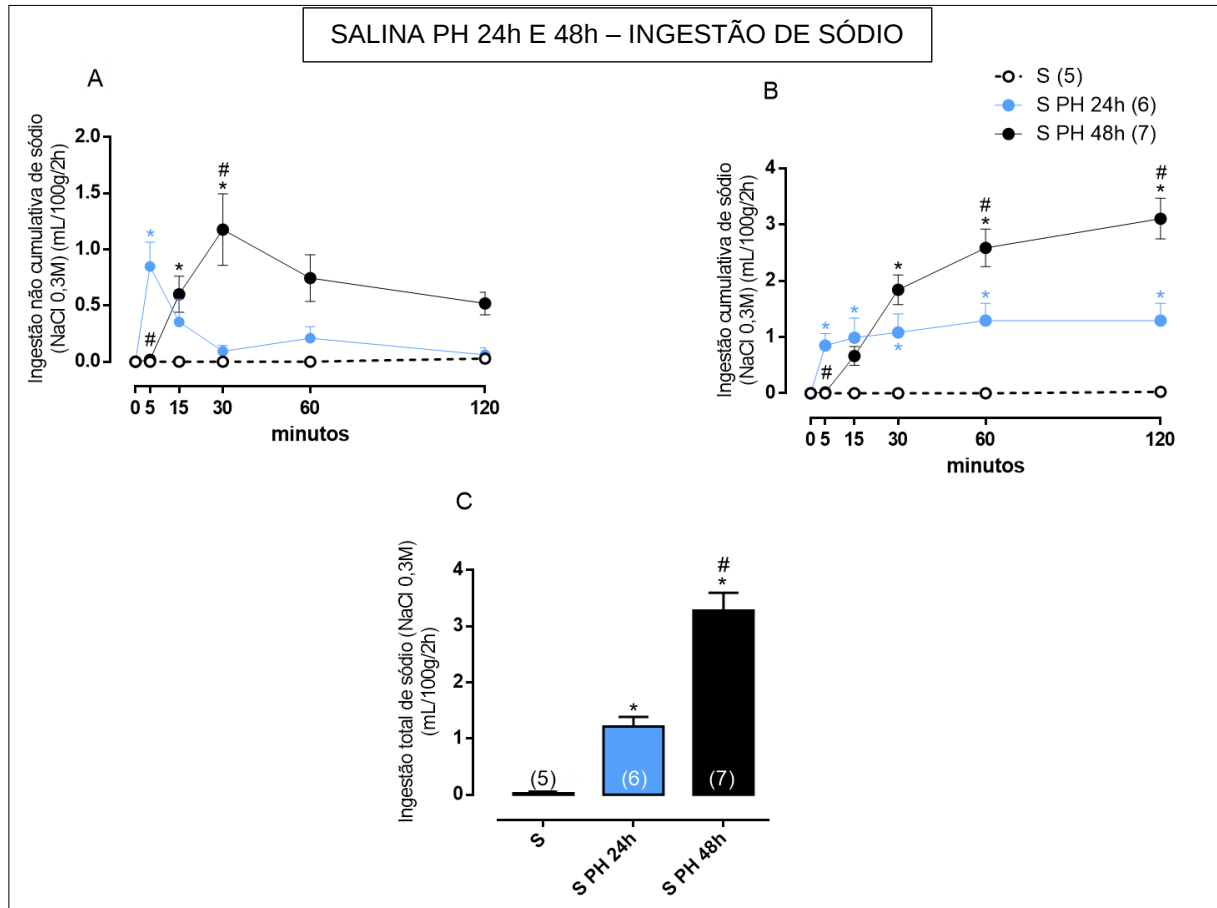


Figura 20: Efeito da microinjeção icv de salina estéril (0,9%/0,5μl) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de sódio (NaCl 0,3M) em ratos submetidos à privação hídrica de 24h ou 48h. * $p < 0.05$ vs. salina 0,9%, # $p < 0.05$ vs. salina 0,9% (PH 24h). S = salina 0,9%, PH = privação hídrica.

4.4.2 Microinjeção icv de α -CHCA em ratos submetidos à PH de 48h:

As Figuras 21 e 22 mostram a resposta comportamental de ingestão de água (Figura 21, painéis A, B e C) ou sódio (Figura 22, painéis A, B e C) induzida pela microinjeção icv de α -CHCA em ratos submetidos a PH de 48h em comparação aos animais normohidratados. Os resultados mostraram que a microinjeção icv de α -CHCA potencializou a ingestão não cumulativa aos 5 e 15 minutos (Figura 21, painel A), cumulativa aos 5, 15, 60 e 120 minutos (Figura 21, painel B) e total de água em relação à microinjeção de salina ($10,04 \pm 0,74$ vs. $8,48 \pm 0,29$ mL/100g/2h, $n=6$) (Figura 21, painel C). Além disso, a microinjeção icv de α -CHCA aumentou a ingestão não cumulativa e cumulativa de sódio aos 5 minutos (Figura 22, painéis A e B respectivamente), bem como a ingestão total de sódio ($3,89 \pm 0,31$ vs. $2,78 \pm 0,20$ mL/100g/2h, $n=8$) (Figura 22, painel C).

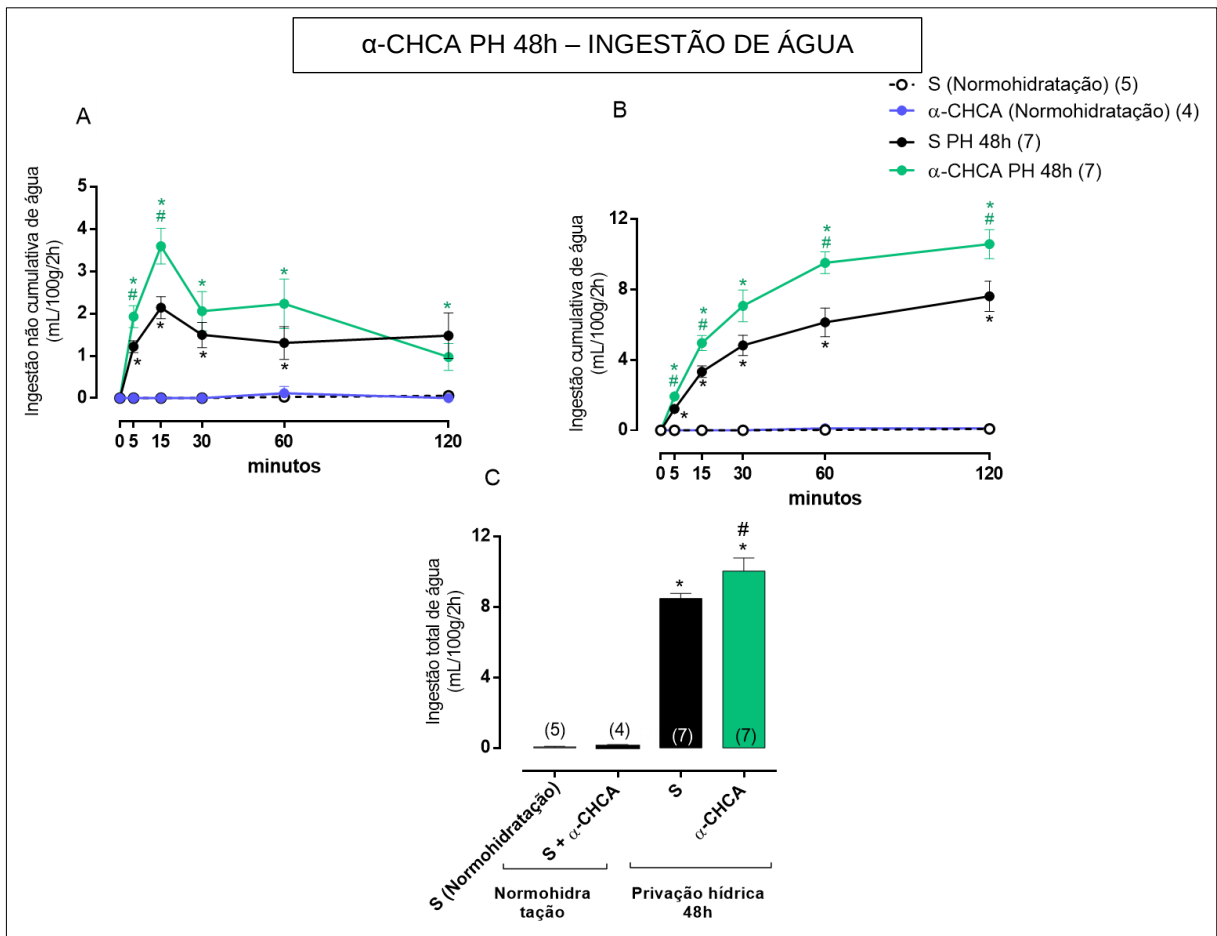


Figura 21: Efeito da microinjeção icv de α -CHCA (3 μ g/0,5 μ l) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de água em ratos submetidos à privação hídrica de 48h. * $p < 0.05$ vs. salina 0,9%, # $p < 0.05$ vs. salina 0,9% (PH 24h). S = salina 0,9%, PH = privação hídrica.

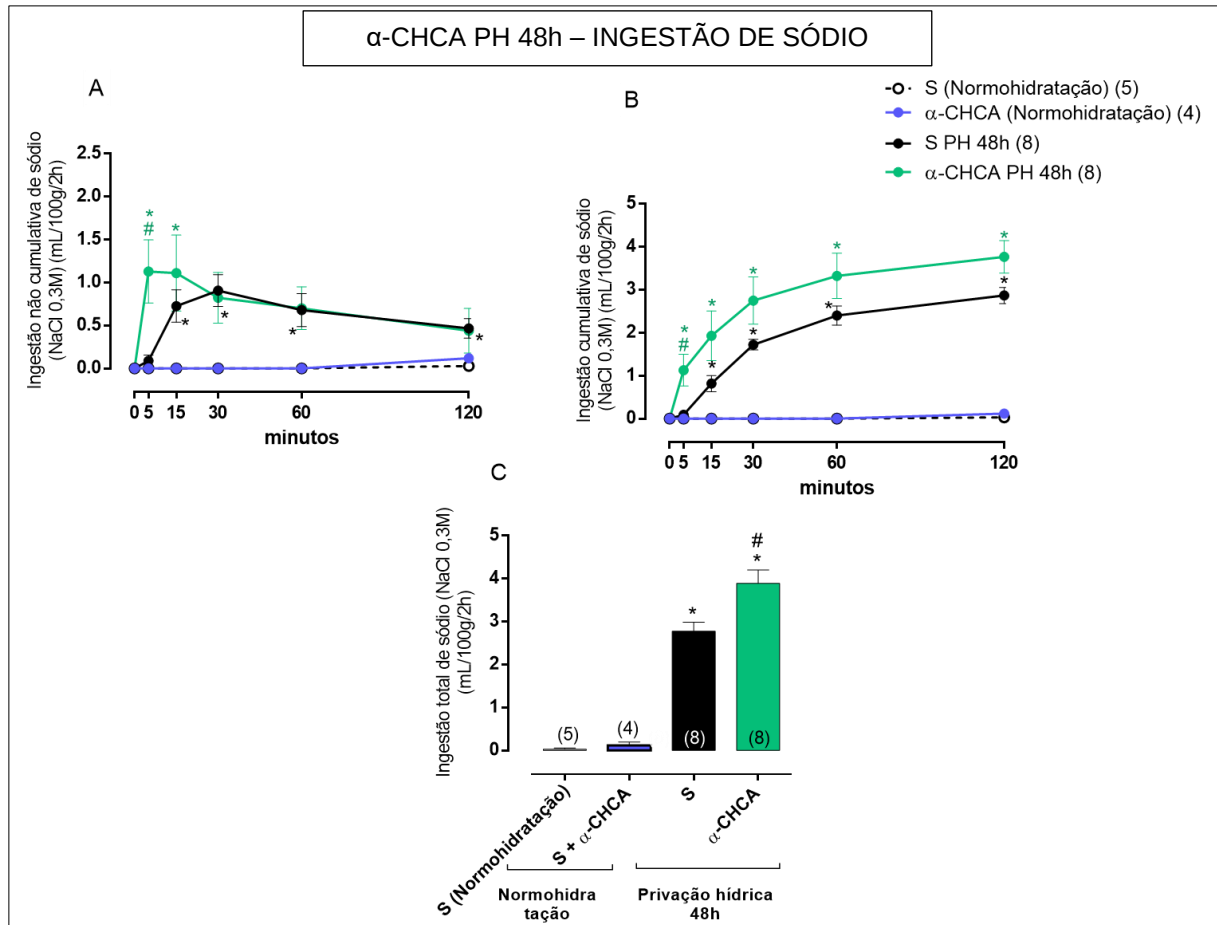


Figura 22: Efeito da microinjeção icv de α -CHCA (3 μ g/0,5 μ l) sobre a ingestão não cumulativa (painel A), cumulativa (painel B) e ingestão total (painel C) de sódio (NaCl 0,3M) em ratos submetidos à privação hídrica de 24h ou 48h. * $p < 0.05$ vs. salina 0,9%, # $p < 0.05$ vs. salina 0,9% (PH 24h). S = salina 0,9%, PH = privação hídrica.

Os dados numéricos (média $\pm$ EPM) das ingestões não cumulativas e cumulativas de todos os protocolos comportamentais realizados encontram-se dispostos nas Tabelas de 1 a 4 (Apêndices A, B, C e D).

4.5 Medida do volume urinário (mL/100g) após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos à PH:

Foi realizada a quantificação do volume urinário dos animais após sucedidos os 120 minutos de análise comportamental (Figura 23). Os resultados mostraram que os animais que foram submetidos à PH 24h não apresentaram diferença significativa no volume urinário em comparação aos normohidratados ($0,23 \pm 0,07$ vs. $0,05 \pm 0,05$ mL/100g/2h, $n=5$), enquanto os grupos submetidos à PH 48h apresentaram maior

volume urinário do que os normohidratados, tanto o que recebeu salina 0,9% ($0,46 \pm 0,09$ vs. $0,05 \pm 0,05$ ml/100g/2h, $n=6$) quanto o que recebeu α -CHCA ($0,46 \pm 0,08$ vs. $0,05 \pm 0,05$ ml/100g/2h, $n=7$). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo α -CHCA PH 48h e seu respectivo controle salina 0,9 PH 48h ($0,46 \pm 0,08$ vs. $0,46 \pm 0,09$ ml/100g/2h, $n=7$).

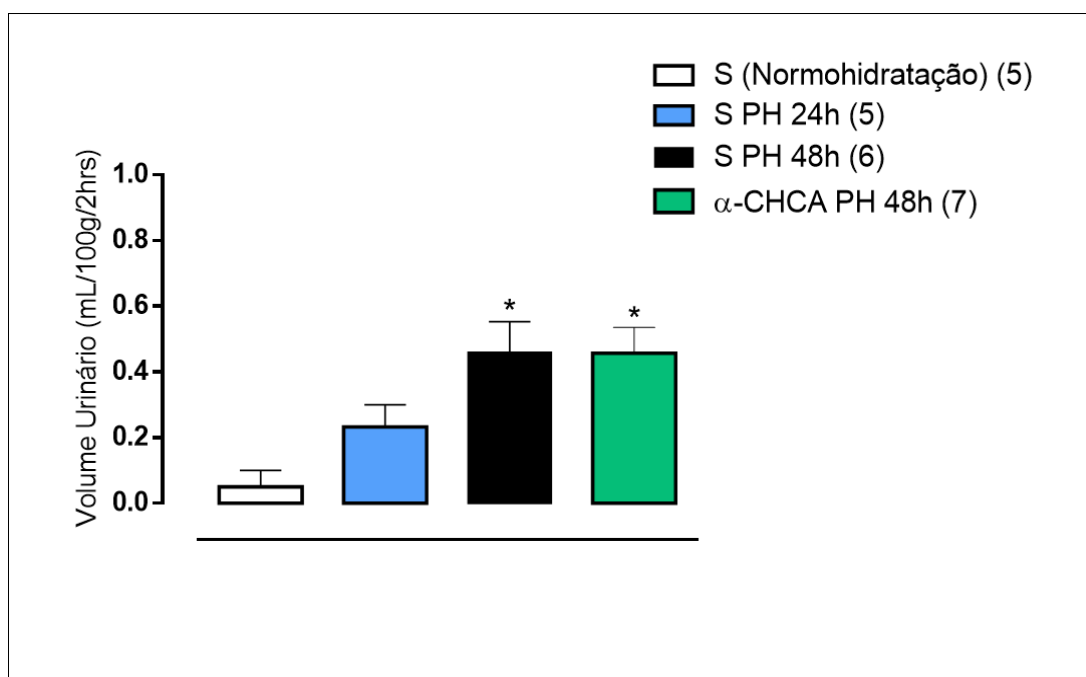


Figura 23: Mensuração do volume urinário dos animais submetidos à privação hídrica, após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M). * $p < 0.05$ vs. grupo salina 0,9%. S = salina 0,9%, PH = privação hídrica.

4.6 Análise da osmolalidade urinária após as microinjeções icv e as análises das respostas comportamentais de ingestão de água e sódio em ratos submetidos à PH:

Foi realizada a análise da osmolalidade urinária dos animais submetidos à PH após 120 min. da reapresentação dos bebedouros contendo água ou sódio (Figura 24). Os resultados mostraram que o grupo submetido à PH 24h não apresentou diferença estatisticamente significativa na osmolalidade urinária em comparação ao grupo normohidratado ($1,12 \pm 0,13$ vs. $1,17 \pm 0,03$ osmol/Kg, $n=5$); em contrapartida, a osmolalidade urinária dos animais PH 48h foi menor tanto no grupo controle salina 0,9% ($0,42 \pm 0,04$ vs. $1,17 \pm 0,03$ osmol/Kg, $n=6$) quanto no grupo α -CHCA ($0,52 \pm 0,03$ vs. $1,17 \pm 0,03$ osmol/Kg, $n=6$) em comparação ao grupo salina 0,9%

normohidratado. Além disso, os animais submetidos à PH 48h apresentaram uma menor osmolalidade urinária tanto no grupo salina 0,9% ($0,42 \pm 0,04$ vs. $1,12 \pm 0,13$ osmol/Kg, $n=6$) quanto no grupo α -CHCA ($0,52 \pm 0,03$ vs. $1,12 \pm 0,13$ osmol/Kg, $n=6$) em comparação ao grupo PH 24h. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo α -CHCA PH 48h e seu controle salina 0,9% PH 48h ($0,52 \pm 0,03$ vs. $0,42 \pm 0,04$ osmol/Kg, $n=6$).

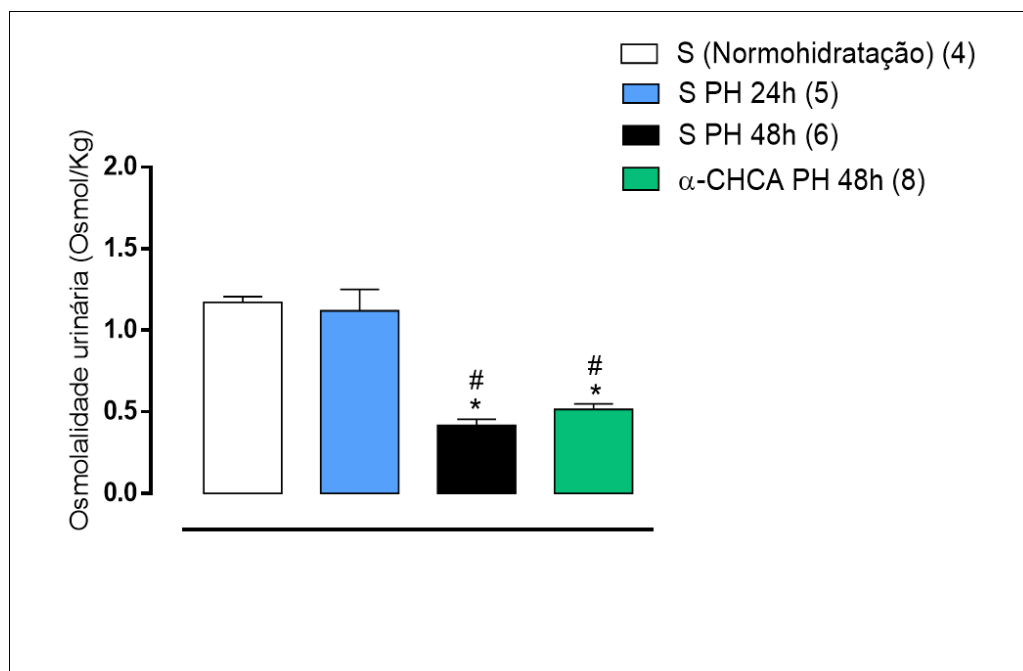


Figura 24: Quantificação da osmolalidade urinária dos animais submetidos à privação hídrica após o período de análise comportamental de ingestão de água e sódio (NaCl 0,3M). * $p < 0.05$ vs. salina 0,9%, # $p < 0.05$ vs. salina 0,9% (PH 24h). S = salina 0,9%, PH = privação hídrica.

4.7 Avaliação da concentração de lactato no SFO de ratos, modelo *ex vivo*:

Realizamos a dosagem do lactato contido no SFO de ratos, através de modelo *ex vivo*, em três situações: meio osmótico normal (145 mM de Na^+), hiperosmótico (170 mM de Na^+) e hiperosmótico na presença de L-NAME (Figura 25). Os resultados mostraram que houve maior concentração de lactato no SFO do grupo submetido ao meio hiperosmótico (170mM Na^+) em comparação ao controle (145mM Na^+) ($1,17 \pm 0,15$ vs. $0,64 \pm 0,18$ mmol/l, $n=7$). Além disso, a concentração de lactato foi maior no grupo 170mM Na^+ + L-NAME em comparação ao grupo controle 145 mM Na^+ ($1,17 \pm 0,22$ vs. $0,64 \pm 0,18$ mmol/l, $n=7$). Em contrapartida, não houve diferença

estatisticamente significativa entre o grupo hiperosmótico (170mM Na⁺) e hiperosmótico na presença do L-NAME (170mM Na⁺ + L-NAME) ($1,17 \pm 0,22$ vs. $1,17 \pm 0,15$ mmol/l, n=7) e entre o grupo normo-osmótico (145mM Na⁺) e normo-osmótico na presença do NPS (145mM Na⁺ + NPS) ($0,65 \pm 0,16$ vs. $0,64 \pm 0,18$ mmol/l, n=5).

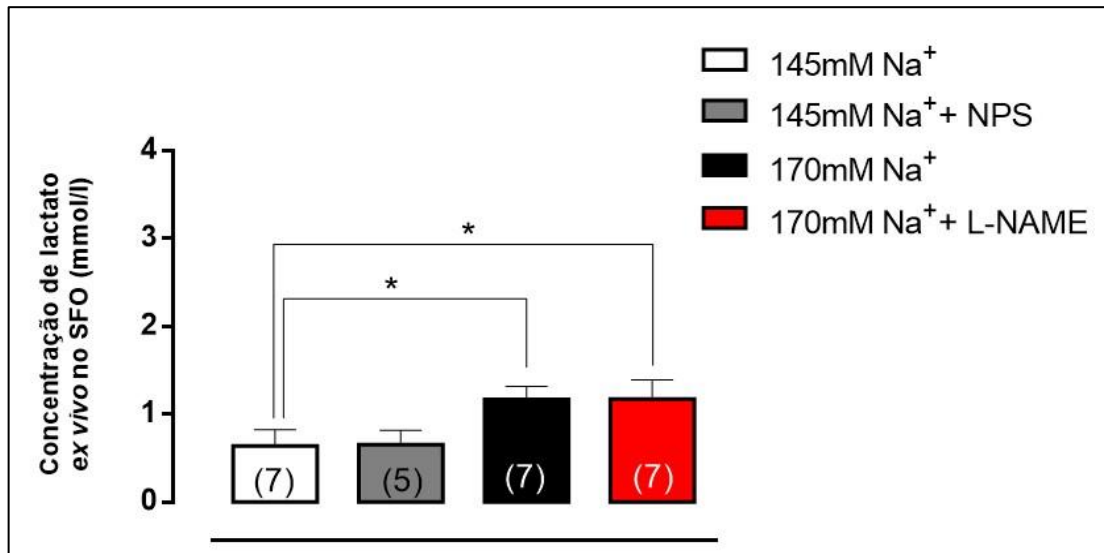


Figura 25: Análise (mmol/L) da concentração de lactato no SFO de ratos, modelo *ex vivo*, submetido a condições osmóticas normais (Na⁺ 145 mM), normais na presença de NPS (3mM), hiperosmóticas (Na⁺ 170 mM) e hiperosmóticas na presença de L-NAME (500 μM). *p<0.05

5 DISCUSSÃO

5.1 Interação entre NO, lactato e células da glia na modulação do comportamento de ingestão de água e sódio:

Nossos resultados mostraram que a microinjeção icv de L-NAME promoveu um aumento na ingestão de água e sódio (Figuras 7 e 8). O L-NAME é uma droga que causa a inibição não específica da enzima NO sintase (NOS), responsável por converter L-arginina em NO, ou seja, o L-NAME reduz a produção endógena do NO. Estudos anteriores já haviam evidenciado que o NO pode atuar como um modulador inibitório no SNC promovendo aumento na atividade de interneurônios GABAérgicos no hipotálamo (STERN; LUDWIG, 2001). Nesse sentido, corroborando com estudos de Reis et al. (2010), nossos resultados sugerem que, o NO atua na região dos OCVs inibindo tonicamente o comportamento de ingestão de água e sódio.

Ao avaliarmos a participação das células da glia na ingestão basal de água e sódio, observamos que a microinjeção icv de FCt (inibidor reversível da atividade da glia) não promoveu alterações significativas no comportamento de ingestão basal de água ou de sódio (Figuras 11 e 12). Esses resultados encontram-se de acordo com estudos anteriores do nosso laboratório (FLÔR et al., 2018) e sugerem que a glia dos OCVs parece não contribuir de forma tônica para a regulação da ingestão de água ou de sódio. Entretanto, observamos que a inibição prévia da atividade das células da glia com o FCt reduziu a resposta de ingestão de água e sódio induzida pelo L-NAME. (Figuras 11 e 12). Esses resultados sugerem que as células da região dos OCVs participam da modulação do comportamento de ingestão de água e sódio, sendo parte integrante da via inibitória NO-GABA.

É conhecido que o FCt bloqueia a enzima aconitase no ciclo de Krebs, o que poderia induzir a um aumento na produção de lactato pelas células da glia (PETERS, 1957). Nesse sentido, a microdiálise de FCt no hipocampo de ratos aumenta a concentração de lactato intersticial (ZIELKE et al., 2007), o que fortalece a nossa hipótese de que o FCt desvia o metabolismo energético astrocítico para a via anaeróbica com produção final de lactato. O lactato em meio extracelular, atuaria ativando os interneurônios GABAérgicos da via inibitória da ingestão de água e sódio (MATSUDA et al., 2017).

Nesse contexto, a fim de avaliar a participação do lactato na modulação comportamental de ingestão basal de água e sódio, nos protocolos seguintes realizamos a microinjeção icv de L-Lactato ou α -CHCA (bloqueador dos canais de lactato astrocítico - MCT4). Os resultados mostraram que a microinjeção de L-Lactato ou α -CHCA não promoveram alterações significativas na ingestão de água e de sódio (Figuras 13-16), sugerindo que o lactato parece não participar tonicamente da modulação comportamental da ingestão desses líquidos.

Há evidências mostrando que o NO inibe reversivelmente a citocromo oxidase mitocondrial em cultura de astrócitos, levando à glicólise anaeróbica e consequente produção de lactato (MARTÍN et al., 2017). O lactato, por sua vez, atuaria promovendo a ativação de interneurônios GABAérgicos do SFO envolvidos com a via inibitória da ingestão de sódio (HIYAMA; NODA, 2016; MATSUDA et al., 2017; SHIMIZU et al., 2007). Não obstante, estudos de Matsuda et al. (2017) observaram em experimento *in vitro*, ao incubarem fatias do SFO de camundongos com solução hiperosmótica (Na^+ 160 mM), um aumento na frequência de disparo de interneurônios GABAérgicos do SFO, os quais atuam diminuindo a atividade de neurônios excitatórios responsáveis pela indução do apetite ao sódio. Além disso, os autores observaram que a aplicação do α -CHCA reduz a ativação dos interneurônios GABAérgicos, sugerindo que o lactato astrocítico participa da modulação inibitória do comportamento de ingestão de sódio.

Os resultados até aqui apresentados e o conhecimento de que os astrócitos no SNC, mesmo em condições de normóxia, produzem e armazenam o lactato (MÄCHLER et al. 2016; PELLERIN e MAGISTRETTI 1994), nos induziram ao seguinte questionamento: será que parte do efeito tônico inibitório do NO sobre a ingestão de água e sódio é modulada pelo lactato astrocítico?. A fim de responder a essa pergunta, nós realizamos dois protocolos comportamentais: 1) microinjeção icv de L-Lactato seguida de L-NAME, onde bloqueamos a produção de NO mas ofertamos lactato exógeno, simulando a liberação de lactato astrocítico; e 2) microinjeção icv de α -CHCA seguida de L-NAME, onde bloqueamos a produção de NO mas reduzimos a liberação de lactato astrocítico. Interessantemente, os resultados mostraram que o L-Lactato icv aboliu a ingestão de água e de sódio (Figuras 13 e 14) induzida por L-NAME. Por outro lado, a microinjeção icv de α -CHCA não promoveu alterações significativas na resposta de indução de ingestão de água ou de sódio induzidas pelo L-NAME (Figuras 15 e 16).

Para explicar nossos resultados, nós sugerimos que o NO na região dos OCVs atuaria inibindo a ingestão de água e de sódio através da ativação direta dos interneurônios GABAérgicos e/ou por meio da síntese de lactato. A microinjeção de L-NAME icv, corrobora com a nossa hipótese, uma vez que, a redução na síntese do NO promoveria redução da atividade dos interneurônios GABAérgicos e síntese do lactato e consequente aumento da ingestão de água e sódio. Não obstante, a microinjeção de L-Lactato atenuou significativamente a ingestão de água e sódio induzidas pelo L-NAME (Figura 26). Nossa hipótese sugere que o lactato seria produzido e liberado por astrócitos da região dos OCVs. Entretanto, a inibição do transportador de lactato astrocítico com o α -CHCA, não promoveu alterações significativas na ingestão de água ou de sódio induzidas pelo L-NAME. Esses resultados sugerem que não há a participação do mecanismo ANLS na via inibitória NO-GABA para a modulação da ingestão de água e sódio.

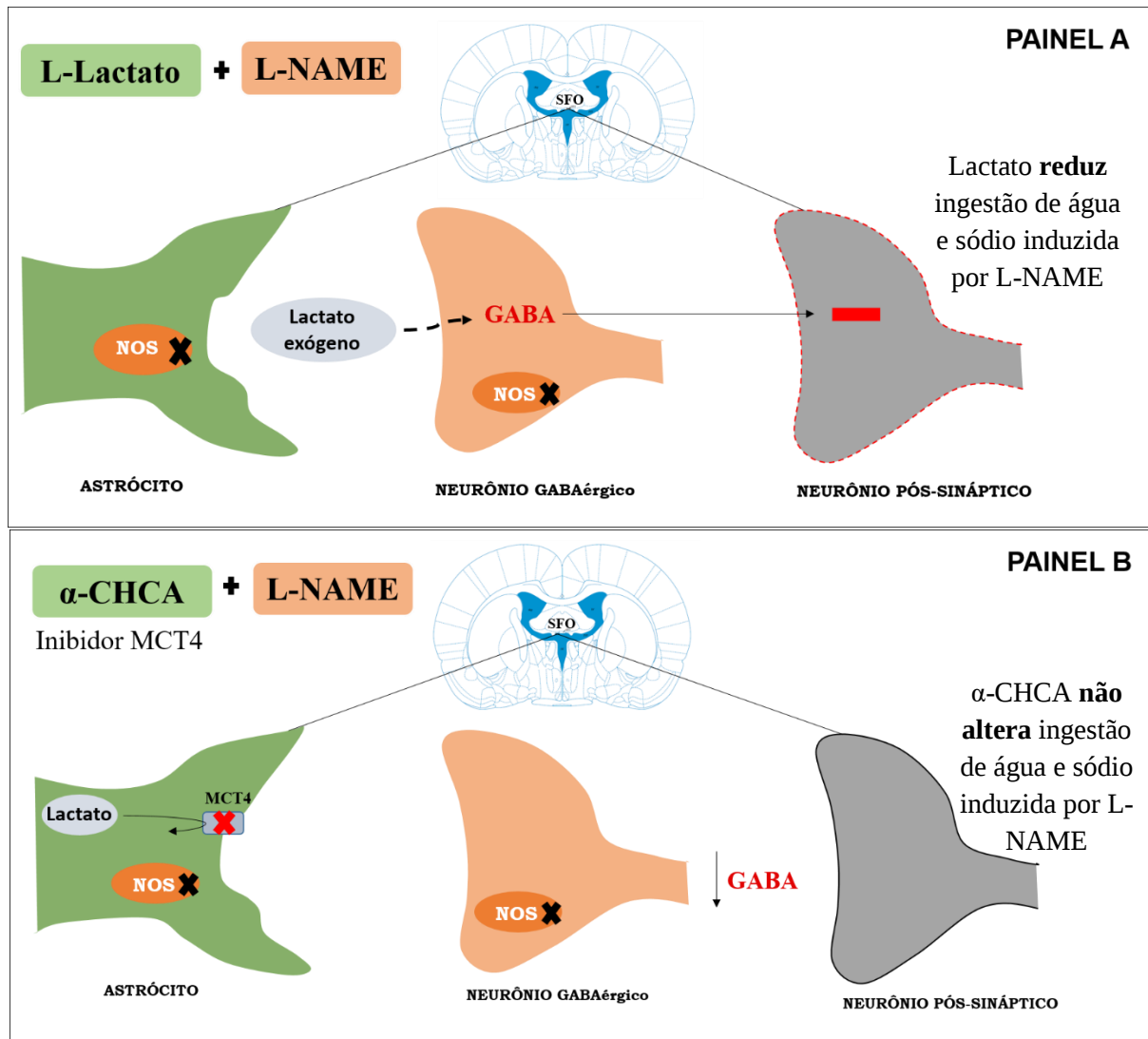


Figura 26: Ilustração mostrando a interação entre NO-GABA e o lactato na região do SFO na modulação da ingestão de água ou sódio. O L-NAME atuaria induzindo o comportamento de ingestão de sódio, tendo em vista que ele inibe a síntese de NO reduzindo a liberação de GABA. Contudo esse efeito é atenuado com a microinjeção prévia de L-Lactato, que aumenta a liberação de GABA e inibe neurônios pós-sinápticos locais envolvidos com a via excitatória da ingestão de sódio e água (PAINEL A). O bloqueio do MCT4 através da microinjeção de α -CHCA impede a saída do lactato astrocítico, o que reduz a liberação de GABA a partir do lactato; porém não encontramos alteração no comportamento de ingestão de água e sódio em relação ao grupo que recebeu somente L-NAME icv (PAINEL B).

Por outro lado, estudo de Shimizu et al. (2007) de *patch clamp* em cultura de células do SFO, mostrou que em meio hipertônico, a aplicação de lactato promoveu aumento na frequência de disparo dos interneurônios GABAérgicos; esse efeito foi reduzido na presença do α -CHCA. Esses resultados sugerem que em meio hipertônico o lactato astrocítico modula a atividade de interneurônios GABAérgicos na região do SFO (SHIMIZU et al., 2007).

5.2 Participação do lactato astrocítico em condições de hipertonicidade do meio extracelular:

Considerando os estudos de Shimizu et al. (2007), para melhor avaliarmos a participação do lactato astrocítico na modulação do balanço hidroeletrolítico, realizamos no protocolo seguinte experimentos com animais submetidos à PH, a qual sabidamente induz a uma contração hiperosmótica (COSTANZO, 2007; DE LUCA et al., 2007; EPSTEIN, 1973). Além disso, cabe ressaltar que diferentes estudos já haviam mostrado que o aumento do Na^+ extracelular induz à ativação dos canais Na_x nos astrócitos do SFO, promovendo um aumento na atividade da Na^+/K^+ -ATPase; o aumento no consumo de ATP astrocítico induz à glicólise anaeróbica e consequente aumento na produção de lactato astrocítico (HIYAMA; NODA, 2016; NODA; HYAMA, 2015a; NODA; HYAMA, 2015b; MCKINLEY et al., 2003).

No protocolo seguinte, avaliamos a participação do lactato astrocítico na ingestão de água e sódio em ratos submetidos à PH. Embora, haja estudos mostrando que a privação hídrica de 48h é adequada para induzir a ingestão de água seguida pela ingestão de sódio (DI NICOLANTONIO, MENDELSON, 1986; MATSUDA et al., 2017; UETA et al., 1995), nós, ao considerarmos as condições climáticas do nosso Estado e o fato de que a PH é também um estímulo estressante, resolvemos iniciar o nosso protocolo com a PH de 24h.

Entretanto, os nossos resultados mostraram que a PH de 24 h não foi suficiente para promover alterações significativas na osmolalidade urinária, bem como redução do apetite ao sódio, resposta característica de animais submetidos à contração hiperosmótica. Não obstante, estudos anteriores mostraram que quanto maior o tempo de duração da PH em roedores, mais intensos são os efeitos metabólicos, de modo que uma desidratação de 48h induz maior perda de peso, menor ingestão de alimento, maior elevação na concentração de sódio plasmático e urinário em comparação à PH de 24h (BEKKEVOLD et al., 2013; HOHENEGGER et al., 1986). Portanto, na sequência submetemos os animais à PH de 48h, a qual promoveu redução da osmolalidade urinária e aumento da ingestão de água seguida pela ingestão de sódio (Figuras 19, 20 e 24).

Estudo de Matsuda et al. (2017) observaram em camundongos submetidos à PH de 48h, um aumento na ingestão de água e sódio; entretanto, a ingestão de sódio foi menor que a ingestão de água. É conhecido que o aumento do Na^+ extracelular

induzido pela PH, promove diminuição do apetite ao sódio (HIYAMA; NODA, 2016; NODA; HYAMA, 2015a; SHIMIZU et al., 2007; SONG; ROUTH, 2005). Em complemento, os estudos de Matsuda et al. (2017) observaram que camundongos submetidos à PH de 48h ingeriram quantidades de água superior à de sódio, mas camundongos que tiveram o silenciamento para Na_x (canais de Na^+ astrocíticos), após a PH, ingeriram quantidades equivalentes de água e sódio, sugerindo a participação dos astrócitos na modulação do comportamento de ingestão de sódio (MATSUDA et al., 2017).

Interessantemente, nossos resultados mostraram que o bloqueio dos transportadores de lactato astrocítico com a microinjeção de α -CHCA potencializou a ingestão de água e sódio induzidas pela PH de 48h (Figuras 21 e 22), sugerindo que o lactato astrocítico participa da regulação comportamental de ingestão de água e sódio em condição de contração hiperosmótica (aumento de Na^+ extracelular).

5.3 Volume e osmolalidade urinária ao final dos protocolos comportamentais de ingestão de água e sódio:

A análise do volume urinário dos animais normohidratados (Figura 17), mostrou que os animais que ingeriram maior quantidade de água e sódio (grupos L-NAME e α -CHCA+L-NAME) apresentaram maior volume de urina em comparação ao controle (salina 0,9%). Por outro lado, animais que receberam L-Lactato icv apresentaram aumento no volume urinário, apesar da ingestão de água e sódio ter sido equivalente à do grupo salina 0,9%. Em contrapartida, Reis et al. (2010) evidenciaram que a microinjeção icv de L-NAME reduziu o volume urinário em ratos.

Quando realizamos a microinjeção de FCt, inibindo a glia, observamos uma redução significativa na ingestão de água e sódio induzida pelo L-NAME. Nesse sentido, nesse grupo houve redução do volume urinário em relação ao grupo L-NAME. Nós observamos que em todos os grupos experimentais, quando houve estímulo para ingestão de fluidos, o volume ingerido de água sempre excedeu o de sódio, e sabe-se que quando há aumento na ingestão de água ocorre redução na tonicidade do plasma e inibição na liberação de vasopressina, fazendo com que o rim excrete maior volume de urina e além do mais, menos concentrada (STANHEWICZ; KENNEY, 2015).

Isso reflete diretamente na osmolalidade urinária, pois verificamos que nos animais em que a ingestão de água e sódio foi maior (grupos L-NAME e α -CHCA+L-NAME) (Figura 18) houve redução na osmolalidade em relação ao grupo controle salina 0.9%, sugerindo uma menor excreção de Na^+ ou maior excreção de água. Estudos realizados em animais evidenciaram que quando a ingestão de sódio aumenta, ocorre maior excreção renal de água em decorrência da elevação da ingestão de água (ERIKSSON, VALTONEN, MÄKELÄ, 1984; FITZSIMONS, 1963).

Ademais, no grupo FCt + L-NAME onde houve inibição da ingestão de água e sódio ocorreu elevação na osmolalidade urinária, sugerindo que há maior excreção de Na^+ ou menor excreção de água, causando menor diluição osmótica da urina. Ao contrário, o grupo Lactato + L-NAME que também apresentou inibição da ingestão de água e sódio exibiu menor osmolalidade urinária em relação ao grupo salina. Supomos que o L-Lactato icv pode atuar no SNC ativando outras vias inibitórias que causam, por exemplo, a inibição da liberação de ocitocina, gerando uma menor excreção renal de Na^+ .

De modo similar ao apresentado pelos animais normohidratados, o volume urinário dos animais desidratados foi maior na proporção em que a ingestão de água e sódio aumentou, sendo superior nos animais PH 48h (grupos salina 0,9% e α -CHCA) em comparação aos normohidratados (salina 0,9%) (Figura 23). Além disso, nesses mesmos grupos submetidos à PH 48h foi verificada menor osmolalidade urinária (Figura 24) em comparação ao grupo salina normohidratado e salina submetidos à PH 24h. Portanto, nós sugerimos que quanto mais intensa for a PH, maior será a quantidade de água ingerida e maior a excreção renal de água causando uma diluição osmótica da urina.

5.4 Concentração de lactato no SFO de ratos em modelo *ex vivo*:

Quando avaliamos a liberação de lactato no SFO de ratos, em modelo *ex vivo*, observamos que o aumento da osmolalidade extracelular com Na^+ 170mM promoveu uma maior liberação de lactato (Figura 25). A presença de L-NAME no meio hiperosmótico não alterou essa resposta. Além disso observamos que o NPS, um doador de NO, não alterou a concentração de lactato em meio osmótico normal (145mM Na^+). Há evidências de que o lactato é produzido pelos astrócitos quando há elevação na concentração de Na^+ no meio extracelular a partir da estimulação da

glicólise anaeróbica astrocítica (HIYAMA; NODA, 2016; NODA; HYAMA, 2015a; NODA; HYAMA, 2015b; MCKINLEY et al., 2003). Isso justifica o aumento de lactato quando houve mudança na osmolalidade do meio, de 145mM para 170 mM. Já com relação ao NO, nossos resultados *ex vivo* mostram que ele parece não ser importante para produção de lactato astrocítico.

Os nossos resultados mostraram que em situação de PH, onde há aumento da osmolalidade extracelular, a microinjeção icv de α -CHCA promove aumento da ingestão de água e sódio. Esses resultados *in vivo* apoiam os nossos resultados *ex vivo*, uma vez que o estímulo hipertônico (170 mM de Na^+) no SFO promoveu aumento na concentração do lactato extracelular. Nesse contexto, sugerimos que em situação de PH, o aumento do Na^+ extracelular promoveria a ativação dos Na_x astrocíticos e consequente indução da produção e liberação de lactato por meio dos transportadores MCT4. Isso promoveria um aumento do lactato extracelular, o qual atuaria modulando a ingestão de água e sódio em situação de contração hiperosmótica (Figura 27).

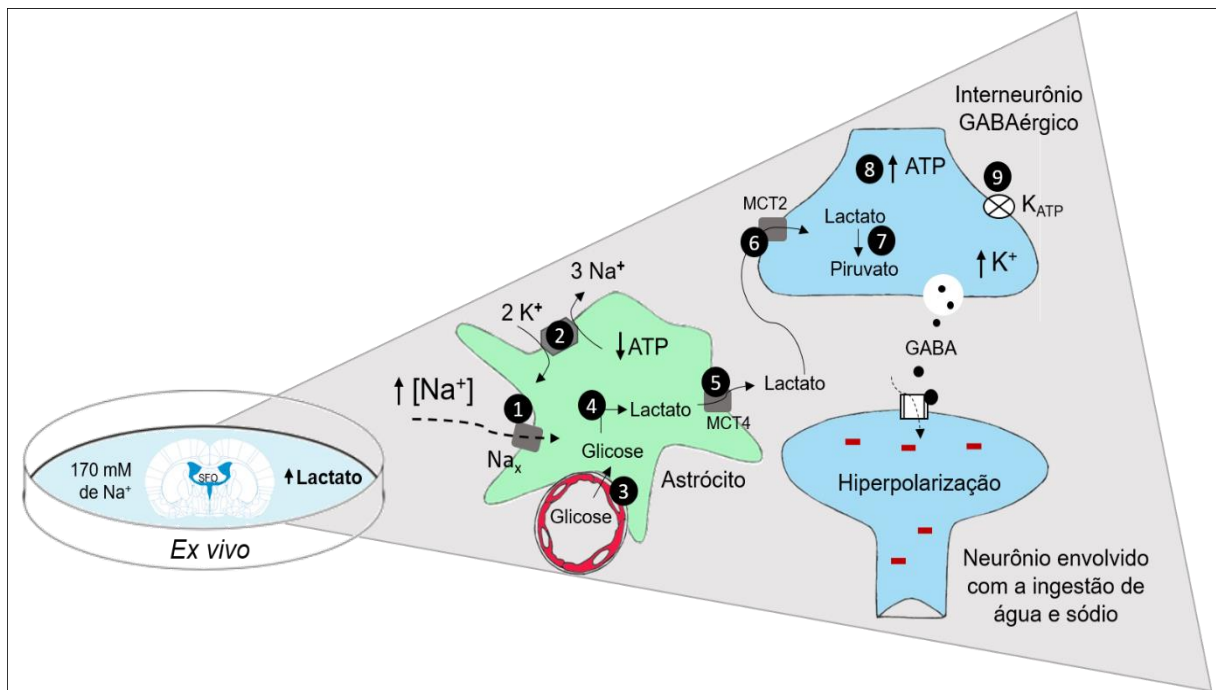


Figura 27: Ilustração dos mecanismos que ocorrem durante incubação do SFO, modelo *ex vivo*, em solução hipertônica de 170 mM de Na^+ . O estímulo hipertônico no SFO aumenta a concentração extracelular de lactato, de modo similar ao que ocorre na privação hídrica, onde: 1: o aumento na concentração extracelular de Na^+ causa a abertura de canais Na_x astrocítico, favorecendo a entrada de Na^+ ; 2: há aumento na atividade da Na^+/K^+ -ATPase, causando consumo de ATP; 3: a glicose sanguínea é captada pelos astrócitos; 4: a glicose no interior dos astrócitos é convertida à piruvato e em seguida, à lactato; 5: o lactato é transportado pelo MCT4 para o exterior do astrócito; 6: o lactato extracelular é transportado pelo MCT2 para o interior de interneurônios GABAérgicos adjacentes; 7: o lactato no interior do interneurônio é transformado em piruvato; 8: o piruvato é metabolizado aumentando a formação de ATP; 9: o ATP causa o fechamento de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), aumentando a concentração de K^+ intracelular que leva à despolarização neuronal e consequente liberação de GABA. O GABA, por sua vez, irá atuar em neurônios relacionados com a ingestão de água e sódio, inibindo-os.

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- L-NAME icv aumenta a ingestão de água e sódio, sugerindo que o NO participa da via inibitória do comportamento de ingestão de água e sódio;
- FCt icv não altera a ingestão basal de água e sódio, sugerindo que a glia não participa tonicamente do controle da ingestão de água e sódio;
- L-Lactato icv não altera a ingestão basal de água e sódio, sugerindo que o lactato não participa tonicamente da modulação da ingestão de água e sódio;
- α -CHCA icv não altera a ingestão basal de água e sódio, sugerindo que o MCT4 não participa tonicamente da modulação da ingestão de água e sódio;
- FCt icv inibe a ingestão de água e sódio induzidas pelo L-NAME, sugerindo uma interação entre NO-Glia na modulação da ingestão de água e sódio;
- L-Lactato icv inibe a ingestão de água e sódio induzida pelo L-NAME, sugerindo uma interação entre NO-Lactato na modulação da ingestão de água e sódio;
- α -CHCA icv não altera a ingestão de água e sódio induzida pelo L-NAME, portanto, parece não haver interação entre lactato astrocítico (mecanismo ANLS) e o NO para a modulação da ingestão de água e sódio;
- α -CHCA icv aumenta a ingestão de água e sódio em animais submetidos à PH 48h, sugerindo que o MCT4 (mecanismo ANLS) participa da modulação da ingestão de água e sódio em condição de contração hiperosmótica;
- A presença de NPS (145 mM Na⁺ + NPS) não alterou a concentração de lactato em situação osmótica normal no SFO de ratos, em modelo *ex vivo*;
- A hiperosmolalidade (170 mM Na⁺) presente no SFO de ratos, modelo *ex vivo*, promoveu elevação na concentração de lactato;
- A presença de L-NAME (170 mM Na⁺ + L-NAME) não alterou a concentração de lactato causada pela hiperosmolalidade no SFO de ratos, em modelo *ex vivo*.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que na região circumventricular há uma interação central entre o NO, as células da glia e o lactato para a modulação da ingestão de água e sódio em animais normohidratados. Além disso, o mecanismo central de transporte de lactato astrócito-neurônio (ANLS) parece estar envolvido na modulação da ingestão de água e sódio em condições de hipertonicidade do meio extracelular.

Este estudo torna-se relevante na medida em que contribui para o esclarecimento de mecanismos relacionados com ingestão de sódio em animais, podendo no futuro servir de base para estudos clínicos envolvendo modulação comportamental em indivíduos com hipertensão arterial, pois, sabemos que o apetite ao sódio contribui para o desenvolvimento de desordens cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 2, p. 76–87, 2011.
- ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 675–677, 2009.
- ALMEIDA, A. et al. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15294–15299, 2001.
- ASNAR, D. S. et al. Involvement of central cholinergic mechanisms on sodium intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience Letters**, v. 534, n. 1, p. 188–192, 2013.
- BITTAR, P. G. et al. Selective Distribution of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Neurons and Astrocytes of Human Brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 1079–1089, 1996.
- BEKKEVOLD, C. M. et al. Dehydration Parameters and Standards for Laboratory Mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci.**, v. 52, n. 3, p. 233–239, 2013.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annual review of biochemistry**, v. 63, p. 175–95, 1994.
- CHAN, O. et al. Lactate-induced release of gaba in the ventromedial hypothalamus contributes to counterregulatory failure in recurrent hypoglycemia and diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4239–4246, 2013.
- COSTA, K. M.; MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H. Acute inhibition of glial cells in the NTS does not affect respiratory and sympathetic activities in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Brain Research**, v. 1496, p. 36–48, 2013.
- COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3ª ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.
- DE LUCA, L. A. et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **American Journal of**

Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 282, n. 2, p. R552–R559, 2002.

DE LUCA, L. A. et al. Water deprivation and the double depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 5, 2007.

DI NICOLANTONIO, R.; MENDELSON, F. A. Plasma renin and angiotensin in dehydrated and rehydrated rats. **The American journal of physiology**, v. 250, n. 5 Pt 2, p. R898-901, maio 1986.

ERIKSSON, L.; VALTONEN, M.; MÄKELÄ, J. Water and electrolyte balance in male mink (*Mustela vison*) on varying dietary NaCl intake. **Acta Physiol Scand Suppl.** v. 537, p. 59-64, 1984.

EPSTEIN, A. N. Epílogo: retrospecto e prognóstico. In: EPSTEIN, A.N.; KISSILEFF, H. R.; STELLAR, E. **A neuropsicologia da sede: novas descobertas e avanços nos conceitos**. Washington: VH Winston e Filhos, p. 315-332, 1973.

FITZSIMONS, J. T. The effects of slow infusions of hypertonic solutions on drinking and drinking thresholds in rats. **The Journal of physiology**, v. 167, p. 344–54, jul. 1963.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, Thirst, and Sodium Appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 583–686, 7 jan. 1998.

FLÔR, A. F. L. et al. Glial cells are involved in ANG-II-induced vasopressin release and sodium intake in awake rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–12, 2018.

GANDHI, G. K. et al. Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 522–36, out. 2009.

GROSS, P. M. et al. The microcirculation of rat circumventricular organs and pituitary gland. **Brain Research Bulletin**, v. 18, n. 1, p. 73–85, 1987.

HALIM, N. D. et al. Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. **Glia**, v. 58, n. 10, p. 1168–76, ago. 2010.

HIYAMA, T. Y.; NODA, M. Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. **Neuroscience research**, v. 113, p. 1–11, dez. 2016.

HOHENEGGER, M. Metabolic Effects of Water Deprivation. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 24, p. 277-282, 1986.

JANZER, R. C.; RAFF, M. C. **Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells** *Nature*, 1987.

KIMELBERG, H. K.; NEDERGAARD, M. Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 338–353, 2010.

LAM, C. K. et al. Central lactate metabolism regulates food intake. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 2, p. E491-6, 2008.

LIU, Q.S.; JIA, Y.S.; JU, G. Nitric oxide inhibits neuronal activity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamic slices. **Brain Res Bull**, v. 43, n. 2, p. 121-125, 1997.

MÄCHLER, P. et al. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 94–102, 2016.

MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. **Neuron**, v. 86, n. 4, p. 883–901, 2015.

MARTÍN, A. S. et al. Nanomolar nitric oxide concentrations quickly and reversibly modulate astrocytic energy metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 22, p. 9432–9438, 2017.

MATSUDA, T. et al. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 230–241, 2017.

MCKINLEY, M. J. et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. **Advances in anatomy, embryology, and cell biology**, v. 172, p. III–XII, 1–122, back cover, 2003.

MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. Baroreceptor reflex modulation by

vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 175-9, fev. 1988.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709–1715, 1989.

MONGEON, R.; VENKATACHALAM, V.; YELLEN, G. Cytosolic NADH-NAD⁺ Redox Visualized in Brain Slices by Two-Photon Fluorescence Lifetime Biosensor Imaging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 10, p. 553–563, 2016.

MOSIENKO, V.; TESCHEMACHER, A. G.; KASPAROV, S. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. January, p. 1–7, 2015.

MÜLLER, M. S.; FOUYSSAC, M.; TAYLOR, C. W. Effective Glucose Uptake by Human Astrocytes Requires Its Sequestration in the Endoplasmic Reticulum by Glucose-6-Phosphatase- β . **Current Biology**, v. 28, n. 21, p. 3481- 3486.e4, 2018.

NODA, M.; HIYAMA, T. Y. Sodium sensing in the brain. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 467, n. 3, p. 465–474, 2015a.

NODA, M.; HIYAMA, T. Y. The Na^x channel: What it is and what it does. **Neuroscientist**, v. 21, n. 4, p. 399–412, 2015b.

PAULSEN, R. E. et al. An Invivo Model for Studying Function Of Brain-Tissue Temporarily Devoid Of Glial-Cell Metabolism - the Use Of Fluorocitrate. **Journal Of Neurochemistry**, v. 48, n. 5, p. 1377–1385, 1987.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set. **English**, p. 209, 2004.

PELLERIN, L. Neuroenergetics: Astrocytes Have a Sweet Spot for Glucose. **Current Biology**, v. 28, n. 21, p. R1258–R1260, 2018.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 1994.

PETERS, R. A. Mechanisms of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cynosum* and related compounds. **Adv. Enzymol.**, v. 18, p. 113-159, 1957.

PIERRE, K.; PELLERIN, L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, n. 1, p. 1–14, 2005.

REIS, W. L. et al. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 903–911, 2007.

REIS, W. L. et al. Central nitrgic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. **Behavioral and Brain Functions**, v. 6, n. 1, p. 64, 2010.

RONALD ZIELKE, H. et al. Effect of fluorocitrate on cerebral oxidation of lactate and glucose in freely moving rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 1, p. 9–16, 2007.

RONCARI, C. F. et al. Angiotensinergic and cholinergic receptors of the subfornical organ mediate sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 262, n. 16, p. 1–8, mar. 2014.

RONCARI, C. F. et al. The lateral parabrachial nucleus and central angiotensinergic mechanisms in the control of sodium intake induced by different stimuli. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p. 17–26, 2017.

RONCARI, C. F. et al. Enhanced angiotensin II induced sodium appetite in renovascular hypertensive rats. **Peptides**, v. 101, p. 82–88, 2018.

SAAD, W. A. et al. Interaction between supraoptic nucleus and septal area in the control of water, sodium intake and arterial blood pressure induced by injection of angiotensin II. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 4, p. 667–674, 2004.

SADA, N. et al. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. **Science**, v. 347, n. 6228, p. 1362–1367, 2015.

SHIMIZU, H. et al. Glial Nax Channels Control Lactate Signaling to Neurons for Brain [Na⁺] Sensing. **Neuron**, v. 54, n. 1, p. 59–72, 2007.

SONG, Z.; ROUTH, V. H. Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 15–22, 2005.

STANHEWICZ, A. E.; KENNEY, W. L. Determinants of water and sodium intake and output. **Nutrition Reviews**, v. 73, p. 73–82, 2015.

STERN, J. E.; LUDWIG, M. NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 6, p. R1815-22, jun. 2001.

TANG, F. et al. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. **Nature communications**, v. 5, p. 3284, 2014.

TONIN, A. M. et al. Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 2, p. 349–360, 2009.

VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. **Astroglial Calcium Signaling and Calcium Waves**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

VERKHRATSKY, A.; STEINHÄUSER, C. Ion channels in glial cells. **Brain Research Reviews**, v. 32, n. 2–3, p. 380–412, 2000.

WATANABE, E. et al. Sodium-level-sensitive sodium channel Na_x is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 3, p. R568–R576, mar. 2006.

WEBER, B.; BARROS, L. F. The astrocyte: Powerhouse and recycling center. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, p. 1–15, 2015.

ZHANG, Y. et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 36, p. 11929–11947, 2014.

APÊNDICE A – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água de animais normohidratados

Tabela 1: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água em animais normohidratados após microinjeção icv.

NORMOHIDRATAÇÃO										
ÁGUA	NÃO CUMULATIVA					CUMULATIVA				
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Salina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03	0,09 ± 0,04
L-NAME	0,18 ± 0,13	0,37 ± 0,16	0,31 ± 0,28	0,7 ± 0,30	0,74 ± 0,31	0,18 ± 0,13	0,55 ± 0,24	0,87 ± 0,31	1,56 ± 0,40	2,30 ± 0,18
FCt	0,24 ± 0,15	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,24 ± 0,15	0,24 ± 0,15	0,24 ± 0,15	0,24 ± 0,15	0,24 ± 0,15
L-Lactato	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,15 ± 0,15	0,08 ± 0,05	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,15 ± 0,15	0,23 ± 0,13	0,23 ± 0,13
α-CHCA	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,12 ± 0,08	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,12 ± 0,08	0,12 ± 0,08
FCt + L-NAME	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,18 ± 0,10	0,12 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,07 ± 0,07	0,09 ± 0,07	0,27 ± 0,11	0,39 ± 0,10
Lactato + L-NAME	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,06	0,08 ± 0,06	0,08 ± 0,06
α-CHCA + L-NAME	0,5 ± 0,23	0,6 ± 0,24	0,26 ± 0,10	0,32 ± 0,19	0,40 ± 0,15	0,5 ± 0,23	1,09 ± 0,24	1,35 ± 0,27	1,67 ± 0,24	2,07 ± 0,22

APÊNDICE B – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio de animais normohidratados

Tabela 2: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M) em animais normohidratados após microinjeção icv.

NORMOHIDRATAÇÃO										
SÓDIO	NÃO CUMULATIVA					CUMULATIVA				
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Salina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03
L-NAME	0,24 ± 0,10	0,09 ± 0,66	0,14 ± 0,11	0,0 ± 0,0	0,26 ± 0,13	0,24 ± 0,10	0,33 ± 0,16	0,48 ± 0,14	0,48 ± 0,14	0,74 ± 0,05
FCt	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,06 ± 0,06	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,06 ± 0,06
L-Lactato	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
α-CHCA	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,12 ± 0,08	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,12 ± 0,08
FCt + L-NAME	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,03
Lactato + L-NAME	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,02 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,03
α-CHCA + L-NAME	0,22 ± 0,07	0,14 ± 0,11	0,31 ± 0,13	0,06 ± 0,06	0,0 ± 0,0	0,22 ± 0,07	0,36 ± 0,17	0,67 ± 0,13	0,72 ± 0,08	0,72 ± 0,08

APÊNDICE C – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água de animais submetidos à PH

Tabela 3: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de água em animais submetidos à PH após microinjeção icv.

PRIVAÇÃO HÍDRICA										
ÁGUA	NÃO CUMULATIVA					CUMULATIVA				
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Salina (Privação 24h)	0,72 ± 0,27	1,09 ± 0,31	1,45 ± 0,46	0,83 ± 0,25	0,16 ± 0,10	0,72 ± 0,27	1,81 ± 0,49	3,27 ± 0,33	4,10 ± 0,50	4,27 ± 0,51
Salina (Privação 48h)	1,22 ± 0,14	2,14 ± 0,26	1,15 ± 0,30	1,31 ± 0,39	1,48 ± 0,54	1,22 ± 0,14	3,33 ± 0,32	4,83 ± 0,58	6,13 ± 0,82	7,61 ± 0,85
α-CHCA (Privação 48h)	1,93 ± 0,26	3,60 ± 0,42	2,05 ± 0,46	2,23 ± 0,59	0,97 ± 0,32	1,93 ± 0,26	4,96 ± 0,43	7,07 ± 0,90	9,52 ± 0,62	10,6 ± 0,83

APÊNDICE D – Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio de animais submetidos à PH

Tabela 4: Dados da ingestão cumulativa e não cumulativa de sódio (NaCl 0,3M) em animais submetidos à PH após microinjeção icv

PRIVAÇÃO HÍDRICA										
SÓDIO	NÃO CUMULATIVA					CUMULATIVA				
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Salina (Privação 24h)	0,85 ± 0,21	0,35 ± 0,20	0,09 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,06 ± 0,06	0,85 ± 0,21	0,10 ± 0,35	1,08 ± 0,33	1,30 ± 0,31	1,30 ± 0,31
Salina (Privação 48h)	0,09 ± 0,07	0,73 ± 0,19	0,91 ± 0,19	0,68 ± 0,19	0,47 ± 0,11	0,09 ± 0,07	0,81 ± 0,19	1,72 ± 0,12	2,4 ± 0,22	2,87 ± 0,19
α-CHCA (Privação 48h)	1,23 ± 0,27	1,11 ± 0,44	0,82 ± 0,30	0,70 ± 0,25	0,44 ± 0,26	1,23 ± 0,27	1,93 ± 0,58	2,75 ± 0,55	3,32 ± 0,53	3,76 ± 0,38