



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES
SEROTONINÉRGICOS 5-HT₃ E 5-HT_{2C} LOCALIZADOS
NA AMÍGDALA NO CONTROLE DA INGESTÃO DE
SAL EM RATOS.**

CARLA PATRÍCIA NOVAIS LUZ

Salvador - Bahia - Brasil

2007



003373



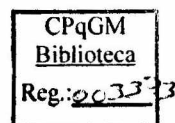
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

***ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES
SEROTONINÉRGICOS 5-HT₃ E 5-HT_{2c} LOCALIZADOS NA
AMÍGDALA NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SAL EM
RATOS.***

Carla Patrícia Novais Luz

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2007





UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

***ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES
SEROTONINÉRGICOS 5-HT₃ E 5-HT_{2c} LOCALIZADOS NA
AMÍGDALA NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SAL EM
RATOS.***

Carla Patrícia Novais Luz

Orientador: Emílio José de Castro e Silva

Tese apresentada ao Colegiado do curso de pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de doutor.

Salvador (Bahia), 2007

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ
Salvador – Bahia

Luz, Carla Patrícia Novais

L979e Estudo do envolvimento dos Receptores serotoninérgicos 5-HT_3 e 5-HT_{2C} localizados na amígdala no controle da ingestão de sal em ratos [manuscrito]. / Carla Patrícia Novais Luz. – 2007.

124f.: il.; 30 cm

Datilografado (fotocópia)

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Emílio José de Castro e Silva, Laboratório de Neurociências

1.Complexo amigdalóide. 2. Serotonina. 3. Apetite por sódio. 4. Receptores 5-HT_3 centrais 5. Receptores 5-HT_{2C} centrais. I.Título.

CDU 615.32: 661.833

"ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT₃ E 5-HT_{2C} LOCALIZADOS NA AMÍGDALA NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SAL EM RATOS".

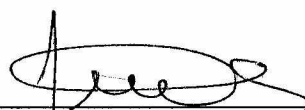
CARLA PATRÍCIA NOVAIS LUZ

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



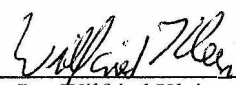
Dr. Maria José Alves da Rocha
Professora Associada
USP



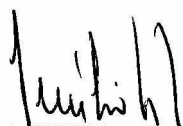
Dr. José Marino Neto
Professor Titular
UFSC



Dr. Irismar Reis de Oliveira
Professor Titular
UFBA



Dr. Wilfried Klein
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Emílio José de Castro e Silva
Professor Titular
UFBA

DEDICATÓRIA

Ao amigo Vanilson Souza, com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores: Emílio José de Castro e Silva e Josmara Bartolomei Fregoneze.

Aos técnicos: Vanilson Souza e José de Souza.

Aos estudantes de iniciação científica: Rodolfo Casimiro, Patrícia Mineiro, Átila Lueska, Diana e Carlos Carvalho.

Aos amigos do laboratório: Hilda, Anderson, Fernando, Rejane, Janeide, Dina, Lília, Karine, Patrícia e Elenilda.

À minha família: Cecília, Conceição, Cláudia e Raimundo.

Aos colegas do Departamento de Ciências Biológicas da UESB.

Aos Amigos: Leandra Gomes, Bruno Ferreira, Aidil Garcez, Filipe Santiago, Eduardo Ciuffi (*in memoriam*), Telma Soares, Lilian Boccardo e Ricardo Jucá.

À Rosália Meires, Rosângela da Cruz Paixão, Taise Coutinho, Iumara Evangelista e Tauar Sampaio.

Aos professores e funcionários do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ.

Abreviaturas	05
Resumo	06
Introdução	07
Revisão da literatura	09
Homeostasia hidrossalina	09
Sistema nervoso central e controle do equilíbrio hidroeletrólítico	15
Aspectos gerais sobre a neurotransmissão serotoninérgica: serotonina e seus receptores	19
Neurotransmissão serotoninérgica e homeostasia hidrossalina	29
Envolvimento do complexo amigdalóide no equilíbrio hidroeletrólítico	35
Hipóteses do trabalho	43
Objetivos	44
Justificativa	45
Artigo 1 - Role of 5-HT ₃ and 5-HT _{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats	46
Artigo 2 - The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: Role of 5-HT ₃ and 5-HT _{2C} receptors	59
Discussão	77
Conclusões	97
Summary	98
Referências bibliográficas	99

3°V	Terceiro ventrículo
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-3-indol acético
5-HT	5-hidroxitriptamina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-di-n-propilaminotetralina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANGII	Angiotensina II
AP	Área postrema
AVP	Arginina-vasopressina
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo do leito da estria terminal
CeA	Amígdala central
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
DOI	(±)2,5-dimetoxi-4-iodofenil-2-aminopropano
GABA	Ácido gama-aminobutírico
i.c.v	Intracerebroventricular
IL-1 β	Interleucina-1 β
i.p	Intraperitoneal
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LiCl	Cloreto de lítio
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
m-CPBG	1-(m-clorofenil) biguanida
m-CPP	1(3-clorofenil) piperazina
MeA	Amígdala medial
MePO	Área preóptica medial
NMDA	N-metil-D-aspartato
NTS	Núcleo do trato solitário
OVLT	Órgão vascularizado da lâmina terminal
p-CPA	p-cloro-fenilalanina
PVN	Núcleo paraventricular
SDZ-SER082	(+)-cis-4.5.7a,8,9,10,11,11a-octahidro-7H-10-metilindol{1,7-{bc}{2,6}nafetitidina
SFO	Órgão subfornical
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT₃ E 5-HT_{2C} LOCALIZADOS NA AMÍGDALA, NO CONTROLE CENTRAL DA INGESTÃO DE SAL EM RATOS. Diferentes áreas do sistema nervoso central estão envolvidas no controle da ingestão de água e sal, formando uma extensa rede neural que permite respostas corretivas viscerais e comportamentais, de forma a manter a homeostasia hidrossalina. Vários estudos têm demonstrado que a ativação de algumas vias neurotransmissoras centrais tais como a serotoninérgica, a colinérgica, a angiotensinérgica, a adrenérgica, a opiatérgica, a glutamatérgica e a GABAérgica, leva a mudanças no comportamento de ingestão de água e sal. No presente trabalho, verificamos a participação dos receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT₃ e 5-HT_{2C} localizados na amígdala medial (MeA) e central (CeA) no controle da ingestão de sal em ratos sódio-depletados. Verificamos que a administração do m-CPBG, agonista dos receptores 5-HT₃, na MeA inibe a ingestão de sal em ratos sódio-depletados. Este efeito antinatriorexigênico do m-CPBG parece ser devido à sua ação nos receptores 5-HT₃, uma vez que o pré-tratamento com a ondansetrona, antagonista específico destes receptores, bloqueia a resposta antinatrioréxica do m-CPBG. A administração da ondansetrona sozinha não foi capaz de alterar a ingestão de sal em ratos sódio-depletados. Além disso, verificamos que a injeção do m-CPP, agonista dos receptores 5-HT_{2C}, na MeA não alterou a ingestão de sal induzida por depleção de sódio. Ao contrário, o tratamento com o SDZ-SER082, antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, inibiu a ingestão de sal quando injetado na MeA. O efeito inibitório do m-CPBG e do SDZ-SER 082 na MeA não parece ser consequência de efeitos aversivos ou de alterações locomotoras produzidas pela administração destas drogas. Na CeA, a administração do m-CPBG também induziu uma redução na ingestão de sal e este efeito também foi bloqueado pelo pré-tratamento com a ondansetrona. A administração de ondansetrona sozinha na CeA não alterou a ingestão de sal em ratos sódio-depletados. Além disso, verificamos que o efeito inibitório na ingestão de sal induzido pela administração do m-CPBG na CeA não está relacionado a efeitos aversivos, deficits locomotores ou ao aumento na pressão arterial. O m-CPP e o SDZ SER 082 não modificaram a ingestão de sal em animais depletados de sódio, quando injetados na CeA. Desta forma, podemos dizer que a estimulação farmacológica dos receptores 5-HT₃ localizados na MeA e CeA induz um significativo efeito antinatriorexigênico em ratos sódio-depletados e que a integridade funcional dos receptores 5-HT_{2C} localizados na MeA é importante para a expressão do apetite por sódio neste modelo experimental.

Palavras-chaves:

1. Complexo amigdalóide; 2. Serotonina; 3. Apetite por sódio; 4. Receptores 5-HT₃ centrais; 5. Receptores 5-HT_{2C} centrais

A manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico é de extrema importância para a constância do meio interno, condição básica para o funcionamento dos diferentes órgãos e sistemas. Os mecanismos homeostáticos envolvem ajustes no volume de água e íons ingeridos e excretados, através de regulações neuroendócrinas e comportamentais. O processo de sede e o comportamento de ingestão de água são desencadeados pela depleção de líquido dos compartimentos intra e extracelular, e regulados por complexo circuito neuronal.

A serotonina é um neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) e está envolvida na regulação neural e/ou humoral de funções importantes como a sede, o apetite específico por sódio, o controle alimentar, o ciclo sono-vigília, o comportamento sexual, a nocicepção, a regulação da pressão arterial e o estresse. Este neurotransmissor realiza as suas funções através da ativação de diferentes tipos de receptores, que são atualmente classificados em sete famílias designadas de 5-HT₁ a 5-HT₇. Como a serotonina, os seus receptores também se encontram distribuídos em diversas áreas do SNC, inclusive em áreas relacionadas com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico, como o complexo amigdalóide, a área septal, o hipotálamo, o núcleo parabraquial, a área postrema, o núcleo do trato solitário e outras (Hoyer et al., 2002).

Alterações no metabolismo da serotonina estão associadas a vários processos patológicos como obesidade, depressão, esquizofrenia, ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo, fobia social, abuso e dependência de drogas, enxaqueca, hipertensão e emese. Por isso, vários estudos têm sido conduzidos no intuito de ampliar o conhecimento das características moleculares, fisiológicas e farmacológicas dos diversos receptores serotoninérgicos.

Embora alguns estudos tenham mostrado que a ação central da serotonina parece desempenhar um papel inibitório no que concerne ao controle da ingestão de água e sal,

ainda se sabe muito pouco sobre o papel dos diferentes tipos de receptores serotoninérgicos na regulação destes parâmetros fisiológicos. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem tentado estabelecer o papel de vários receptores serotoninérgicos no controle central da ingestão de água e sal. De fato, temos mostrado que drogas serotoninérgicas administradas através de injeção intracerebroventricular (i.c.v) inibem a ingestão de água em diversos protocolos experimentais, além de inibir a ingestão de sal induzida por depleção de sódio (De Castro e Silva et al., 1997; Castro et al., 2000; 2002a; 2002b; 2003).

No entanto, a abordagem farmacológica utilizada nestes trabalhos anteriores não nos permitiu identificar os sítios específicos de atuação destas drogas serotoninérgicas, uma vez que em todos eles o acesso ao SNC foi por via intracerebroventricular. Assim, no presente trabalho decidimos investigar o papel de receptores serotoninérgicos localizados em regiões cerebrais específicas envolvidas na homeostase hidrossalina, explorando a participação dos receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2c} localizados na amígdala medial (MeA) e central (CeA) no controle da ingestão de água e sal em ratos sódio depletados.

O complexo amigdalóide é uma estrutura prosencefálica composta por cerca de 13 núcleos que divergem entre si tanto morfológica como fisiologicamente. Os diferentes *núcleos amigdalóides participam do controle de uma série de funções comportamentais e regulatórias, e entre elas, o controle central da ingestão de água e sal* (Sah et al., 2003; Johnson et al., 1999)

Apesar dos vários receptores serotoninérgicos estarem presentes em diferentes núcleos do complexo amigdalóide, ainda não se tem registro a respeito do envolvimento destes no equilíbrio hidrossalino. Por isso, os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para um melhor entendimento do envolvimento destes receptores na homeostase hidrossalina.

HOMEOSTASIA HIDROSSALINA

A água e o sódio são os principais componentes dos fluidos corporais e estão em intercâmbio constante entre os compartimentos intra e extracelular. A regulação destes dois componentes dos fluidos corporais é fundamental para a sobrevivência de muitas espécies existentes, uma vez que estas perdem água e sódio constantemente e têm de fazer ajustes, tanto viscerais como comportamentais, para manter suas variáveis hidroeletrólíticas dentro dos padrões adequados à homeostase (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997). A água constitui cerca de 60% do peso corpóreo, sendo $\frac{2}{3}$ distribuída no compartimento intracelular e $\frac{1}{3}$ no compartimento extracelular. Esta distribuição da água entre os compartimentos intra e extracelular depende do equilíbrio osmótico gerado pela concentração de íons semipermeáveis encontrados nestes dois compartimentos (Verbalis, 2003; Johnson & Thunhorst, 1997). Por outro lado, o sódio representa um constituinte importante do compartimento extracelular sendo o principal determinante da osmolaridade plasmática, bem como do volume extracelular (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Verbalis, 2003; Johnson & Thunhorst, 1997). A composição e a osmolaridade dos fluidos corporais são mantidas em faixas estreitas de variação, permitindo, desta forma, o equilíbrio homeostático. Isto é conseguido, primariamente, pela regulação da ingestão e da excreção urinária de água e eletrólitos.

Alterações nos componentes dos compartimentos intra e extracelular através do ganho ou perda de água e sódio podem alterar o equilíbrio homeostático, que leva a mudanças na distribuição relativa dos fluidos nestes compartimentos (Denton, 1996; Verbalis, 2003). De fato, já se sabe que mudanças na volemia, na

osmolaridade plasmática ou na pressão arterial podem gerar alterações homeostáticas que são, geralmente, corrigidas através da ativação de respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais específicas.

A sede e o apetite específico por sódio são mecanismos regulatórios da homeostase dos fluidos corporais que são essenciais para a sobrevivência das espécies. A perda de fluido intracelular ou extracelular gera um estado motivacional denominado de sede que leva o animal a procurar e consumir água. O apetite específico por sódio é a resposta motivacional para que o animal procure e consuma sódio. (Daniels & Fluharty, 2004; Leshem, 1999; Johnson & Thunhorst, 1997).

A sede pode ser estimulada tanto por desidratação celular causada pelo aumento da osmolaridade do fluido extracelular, quanto por hipovolemia causada pela perda de fluido extracelular (McKinley & Johnson, 2004; Verbalis, 2003). De fato, aumentos mínimos de 1 a 3% da osmolaridade plasmática e redução de cerca de 10% do volume sangüíneo ou da pressão arterial são capazes de induzir sede tanto em ratos como em homens (Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley & Johnson, 2004; Verbalis, 2003; Stricker & Sved, 2000; Johnson & Thunhorst, 1997). Outros fatores independentes de mudanças no volume e na osmolaridade plasmática, como xerostomia e desidratação causada por exposição a ambientes secos, também podem induzir sede. Embora as mudanças na osmolaridade plasmática sejam mais efetivas para induzir a sensação de sede, ainda não é claro se mudanças pequenas da osmolaridade são responsáveis pela ingestão diária de água. Em resumo, o que se sabe é que o metabolismo da água representa um balanço entre a ingestão e a excreção renal de água (Verbalis, 2003).

Osmorreceptores localizados em estruturas periventriculares, altamente vascularizadas e desprovidas de barreira hematoencefálica efetiva, como o órgão

vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o órgão subfornical (SFO) respondem a variações osmóticas e a concentração de sódio, tanto no líquido cefalorraquidiano, quanto no sangue (Stricker & Sved, 2000; Johnson et al., 1999; Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997). A destruição destes osmorreceptores localizados na área anteroventral do 3ºV induz adipsia permanente ou temporária (Johnson et al., 1996; Lind & Johnson, 1983), o que corrobora a idéia de que estas áreas exercem papel importante na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico. A área preóptica medial (MePO), localizada ao longo da lâmina terminal entre o OVLT e SFO, também está envolvida na percepção de variações da osmolaridade plasmática e isto parece ser independente da integridade funcional do OVLT e do SFO, uma vez que lesões da parede anteroventral do 3ºV, destruindo o SFO e o OVLT mas mantendo a MePO intacta reduzem, mas não abolem completamente a ingestão de água induzida osmoticamente (McKinley et al., 1999). Este resultado sugere que neurônios da MePO podem ser osmossensíveis ou, então, que esta recebe *inputs* osmóticos de outras regiões cerebrais como a área postrema (AP) ou de outras áreas periféricas como o sistema hepatoportal. O hipotálamo lateral, o núcleo paraventricular, o núcleo supraóptico e os núcleos da substância cinzenta periaquedutal, áreas centrais que participam do processo de geração da sede, recebem *inputs* neurais das áreas periventriculares acima elencadas (McKinley & Johnson, 2004). Variações mínimas na osmolaridade plasmática estimulam o OVLT que envia projeções para os núcleos paraventricular e supraóptico, aumentando a liberação de vasopressina (AVP) pelo lobo posterior da hipófise. A AVP liberada se liga aos receptores AVP-V₂ localizados nos rins, aumentando a reabsorção de água pelas células principais do ducto coletor, promovendo, desta forma, o seu efeito antidiurético (Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley & Johnson, 2004; Verbalis, 2003; Stricker & Sved, 2000; Johnson & Thunhorst, 1997). A sede induzida por

hiperosmolaridade plasmática também é mediada pela angiotensina II (ANGII) que age em várias áreas cerebrais sensíveis a mudanças da osmolaridade como o QVLT, SFO e MePO. Vários trabalhos têm mostrado que a sede induzida por administração i.c.v de salina hipertônica é bloqueada pela administração prévia de losartan, antagonista dos receptores angiotensinérgicos do tipo AT1 (Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley & Johnson, 2004; Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997). Em situações em que o plasma se torna hipotônico, é observada uma inibição da ingestão de água e da excreção renal de sódio juntamente com aumento da ingestão de sal e da diurese.

Osmorreceptores e receptores periféricos para o sódio também desempenham papel importante no controle da sede induzida por hiperosmolaridade. Estes receptores têm sido demonstrados em terminais neurais aferentes vizinhos aos vasos hepáticos, renais e intestinais, e são capazes de detectar mudanças na concentração de sódio antes mesmo que a osmolaridade plasmática seja alterada. Isto tem sido comprovado em uma série de estudos mostrando que infusões de salina hipertônica tanto no estômago quanto na circulação hepatoportal elevam a sede e a liberação de vasopressina pelo sistema hipotalâmico-hipofisário (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Stricker & Sved, 2000; Johnson & Thunhorst, 1997). Os osmorreceptores periféricos também são bastante importantes nos processos fisiológicos que fazem cessar a ingestão hídrica. É sabido que animais desidratados bebem uma quantidade de água suficiente para reconduzir a osmolaridade plasmática aos seus níveis normais (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Stricker & Sved, 2000). No entanto, estudos com cães e ratos têm mostrado que estes param de ingerir água e diminuem a liberação de AVP antes mesmo que a osmolaridade plasmática se normalize. Esta resposta antecipada de diminuição da ingestão de água é gerada por estímulos pré-absortivos que envolvem a presença de água na

orofaringe, esôfago, estômago ou intestino delgado e estímulos pós-absortivos que são mediados pela ativação dos osmorreceptores no sistema porta-hepático (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Stricker & Sved, 2000; Johnson & Thunhorst, 1997).

Alterações no volume do líquido extracelular influenciam de forma significativa a homeostasia hidrossalina. Diminuição de cerca de 10% do volume sangüíneo ou da pressão arterial desencadeia a ativação de componentes dos sistemas nervoso autonômico e endócrino. Animais hipovolêmicos necessitam de água e sódio para repor o déficit do volume plasmático. Desta forma, a hipovolemia aumenta a ingestão hídrica, promove o apetite específico por sódio, além de reduzir a excreção renal de água e sódio. Os principais sensores envolvidos na detecção da volemia são os receptores vasculares localizados nos átrios cardíacos, grandes veias e circulação pulmonar. Quando tais receptores detectam redução do retorno venoso ao coração, esta informação é conduzida ao sistema nervoso central que ativa a sede, o apetite específico por sódio e reduz a excreção urinária de água e de sódio. Resposta contrária é observada quando estes receptores detectam hipervolemia. A diminuição do débito cardíaco causada pela hipovolemia estimula a atividade simpática que, conseqüentemente, aumenta a freqüência cardíaca e a vasoconstrição permitindo o reestabelecimento dos valores pressóricos normais. A estimulação simpática também aumenta a reabsorção de sódio pelo túbulo proximal, através da ação da noradrenalina nos receptores α 1-adrenérgicos. Do outro lado da circulação, barorreceptores localizados na aorta e na carótida detectam mudanças na pressão sangüínea. A partir dos níveis de pressão detectados por estes receptores, são geradas respostas corretivas associadas a mudanças reflexas da atividade simpática e da secreção hormonal, sobretudo de vasopressina e de renina. Hipotensão arterial leva a um aumento da atividade

simpática com vasoconstricção e aumento do débito cardíaco, enquanto que na situação oposta (um aumento agudo da pressão sanguínea) reduz-se a atividade simpática (Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley & Johnson, 2004; Stricker & Sved, 2000; Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997).

Alterações da volemia ativam vários mecanismos endócrinos, incluindo o aumento da liberação de renina, que, conseqüentemente, aumenta os níveis de angiotensina II circulante, AVP, aldosterona, adrenalina, noradrenalina, ACTH e glicocorticóides. Estes hormônios trabalham conjuntamente com o sistema nervoso autônomo para diminuir a perda urinária de água e sódio, bem como para ajustar a distribuição de água entre os compartimentos intra e extracelular. A angiotensina circulante age nos seus receptores localizados em estruturas cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica, como o SFO, promovendo a ingestão de água e sal. Além disso, a angiotensina II aumenta os níveis de aldosterona que, por sua vez, promoverá a reabsorção renal de sódio. Em situações de hipovolemia, ocorre aumento na liberação de AVP, promovendo efeito antidiurético (Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley & Johnson, 2004; Stricker & Sved, 2000; Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997).

A manutenção do equilíbrio homeostático é de importância vital para a sobrevivência dos animais. Por isso, o entendimento sobre os mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostase dos fluidos corporais é justificável e oportuno.

SISTEMA NERVOSO CENTRAL E BALANÇO HIDROELETROLÍTICO

A ativação e a coordenação das respostas reflexas e comportamentais que mantêm a homeostase dos fluidos corporais requerem ação integrada do sistema nervoso central (SNC). O SNC é informado constantemente sobre a condição do balanço hidrossalino. Embora os reflexos viscerais e comportamentais que mantêm a homeostase dos líquidos corporais sejam diferentes nas suas formas de expressão, eles empregam mecanismos comuns. Os reflexos viscerais e comportamentais relacionados ao equilíbrio hidromineral são ativados por sinais aferentes ao cérebro (Johnson & Thunhorst, 1997).

Fatores circulantes e nervos aferentes informam constantemente ao SNC sobre o *status* dos fluidos corporais. O NTS serve como a principal porta de acesso ao cérebro para a maioria dos *inputs* derivados da periferia e conduzidos pelos IX e X par de nervos cranianos. Em situações onde ocorrem variações na distribuição dos fluidos corporais, uma série de fatores circulantes produzidos periféricamente tem o papel de informar o SNC sobre estas mudanças. Algumas dessas moléculas, como a aldosterona, atravessam a barreira hematoencefálica, enquanto outras, como a angiotensina II e o peptídeo atrial natriurético, que não atravessam a barreira hematoencefálica, agem diretamente nas estruturas periventriculares, que são desprovidas desta barreira, produzindo respostas corretivas (Johnson & Thunhorst, 1997).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de identificar as áreas cerebrais envolvidas, especificamente, nas respostas de saciedade, regulação da osmolaridade plasmática e no controle da ingestão e excreção de água e de eletrólitos. Estudos neuroanatômicos e funcionais têm mostrado que uma série de estruturas cerebrais está implicada com o processamento de informações sistêmicas relacionadas com variações dos fluidos

corporais e da pressão arterial, formando uma extensa rede neural que permite respostas corretivas reflexas e comportamentais, de forma a manter a homeostasia hidrossalina. As mais notáveis entre estas regiões são a área postrema, o núcleo do trato solitário, o núcleo parabraquial, o órgão subfornical, as regiões anteroventrais do terceiro ventrículo, o núcleo paraventricular, o núcleo supraóptico, a amígdala (principalmente os núcleos central e medial), o núcleo do leito da estria terminal, o hipotálamo lateral, a zona incerta, o hipotálamo dorso e ventromedial, o *locus coeruleus* e o complexo motor do vago (Johnson et al., 1999; Johnson & Thunhorst, 1997).

A lâmina terminal é uma estrutura prosencefálica composta pelo SFO, MePO e OVLT. Essas três estruturas contêm neurônios que são sensíveis a mudanças na osmolaridade plasmática bem como no líquido cefalorraquidiano (Antunes-Rodrigues et al., 2004). Além de possuírem conexões diretas com o núcleo paraventricular, as estruturas da lâmina terminal também emitem e recebem projeções dos núcleos da rafe, *locus coeruleus*, núcleo supraóptico, núcleo arqueado, núcleo central da amígdala, núcleo do leito da estria terminal, núcleo parabraquial lateral e do núcleo do trato solitário (Zardetto-Smith & Johnson, 1995). Estas conexões parecem ser importantes na indução de respostas comportamentais, humorais e simpáticas para restaurar o equilíbrio dos fluidos corporais.

Estudos sobre o papel das estruturas cerebrais no controle da homeostasia hidrossalina mostram que as áreas prosencefálicas parecem desempenhar ação predominantemente facilitatória, enquanto que as regiões romboencefálicas exibem atividade inibitória sobre a ingestão de água e sal. Essas regiões agem produzindo um equilíbrio entre suas ações facilitadoras e inibidoras, gerando o controle central do equilíbrio hidroeletrólítico. As principais áreas prosencefálicas são a parede

anteroventral do terceiro ventrículo, o órgão subfornical, a área preóptica, a amígdala e os núcleos paraventricular e supraóptico. As áreas romboencefálicas envolvidas no equilíbrio hidroeletrólítico são o núcleo do trato solitário, a área postrema e o núcleo parabraquial lateral. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar o papel específico de cada uma dessas estruturas envolvidas no controle central do equilíbrio hidrossalino (Fitzsimons, 1998; Johnson & Thunhorst, 1997).

As áreas do SNC envolvidas na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico exercem suas funções através da ativação de diversas vias neurotransmissoras centrais. Atualmente, já é conhecido que a ativação de algumas destas vias tais como a colinérgica, a angiotensinérgica, a adrenérgica, a opiatérgica, a serotoninérgica, a glutamatérgica e a GABAérgica, leva a mudanças no comportamento de ingestão de água e sal.

O controle central da ingestão de água e sal pela ANGII é um dos mais conhecidos na atualidade. Vários estudos mostram que a ANGII tem um potente efeito dipsogênico quando administrada por via periférica ou i.c.v. O efeito central da ANGII deve-se principalmente ao grande número de receptores angiotensinérgicos encontrados nas áreas centrais responsáveis pelo controle hidrossalino. O efeito dipsogênico da ANGII é bloqueado pela administração de losartan, um antagonista específico dos receptores AT1 (Fitzsimons, 1998).

A estimulação colinérgica por injeção central de acetilcolina ou carbacol (agonista colinérgico) causa um aumento significativo na ingestão de água em ratos, mas inibe o apetite por sal (Fitzsimons, 1998). Este efeito é bloqueado pela injeção central de atropina (antagonista colinérgico).

A norepinefrina, um neurotransmissor largamente distribuído no SNC, pode exibir efeitos excitatórios ou inibitórios na ingestão de água. A administração de

agonistas α -adrenérgicos provoca um aumento inicial, seguido por uma supressão do consumo de água. Por outro lado, a injeção de agonistas β -adrenérgicos leva a um aumento acentuado na ingestão de água (Fitzsimons, 1998; Colombari et al., 1989).

Recentemente, foi demonstrado o envolvimento das vias serotoninérgicas centrais no controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Vários estudos mostram que a estimulação serotoninérgica central parece ter um papel inibitório no controle da ingestão de água e sal. Detalhes sobre o papel da serotonina no controle hidrossalino são mais bem discutidos no tópico "Neurotransmissão serotoninérgica e homeostasia hidrossalina".

A ativação das vias GABAérgicas atenua a ingestão de água e sal induzida pela ANGII (Fitzsimons, 1998), conferindo ao GABA um papel inibitório no controle hidrossalino.

O sistema opiatérgico central parece, também, desempenhar um papel modulador no equilíbrio hidroeletrólítico. A administração central de opióides inibe a ingestão de água induzida pela ANGII. Este efeito foi inibido pelo naloxone, um antagonista opiatérgico (Fitzsimons, 1998). Além disso, mostramos recentemente em trabalhos do nosso laboratório que a administração i.c.v de naloxone inibe o efeito antidipsogênico e antinatriorexigênico da IL-1 β em diversos protocolos experimentais (De Castro e Silva et al., 2006; Luz et al., 2006). Estes dados indicam que os efeitos antidipsogênico e antinatriorexigênico da IL-1 β parecem ser modulados por receptores opióides, mostrando que existe interação entre estas duas vias no controle do equilíbrio hidrossalino.

ASPECTOS GERAIS SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA: SEROTONINA E SEUS RECEPTORES

A serotonina (5-HT) é uma amina biogênica encontrada no sistema nervoso central e periférico (SNC e SNP), bem como em tecidos não neuronais do intestino, sistema cardiovascular e sangue (Hoyer et al., 2002). Embora a serotonina esteja presente em diversos alimentos, muito pouco ou quase nada desta é absorvida pelo trato gastrointestinal. Além disso, a serotonina não atravessa a barreira hematoencefálica (Gyermek, 1996). A sua síntese ocorre em células do trato gastrointestinal, as quais produzem aproximadamente 95% da serotonina corporal, e em células do sistema nervoso central através do metabolismo do seu precursor, o aminoácido triptófano, que inicialmente é hidroxilado e finalmente descarboxilado, dando origem à 5-HT (Green, 2006; Gyermek, 1996). Após ser sintetizada, esta é armazenada em vesículas citoplasmáticas, principalmente de células nervosas, células enterocromafins e plaquetas (Gyermek, 1996). A 5-HT é metabolizada pela monoaminaoxidase (MAO), dando origem ao seu metabólito, o 5-HIAA.

No SNC a 5-HT atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador, regulando uma série de funções distintas. Os neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central são encontrados nos núcleos dorsal e medial da rafe, localizados no tronco encefálico (Dubovsky & Thomas, 1995; Foguet et al., 1992). Os núcleos da rafe são formados por neurônios com limites citoarquitetônicos pobremente definidos que formam populações neuronais heterogêneas, com diferentes características de projeções, morfológicas e neuroquímicas (Hornung, 2003). Estes neurônios encontram-se agrupados em nove núcleos, designados de B1 a B9, que se distribuem ao longo de toda a extensão do tronco encefálico. De acordo com a sua distribuição e projeções, os conjuntos de neurônios serotoninérgicos podem ser *divididos em dois grupos: o grupo rostral (B5 a B9), localizado no mesencéfalo e na*

região rostral da ponte, que leva suas principais projeções para regiões prosencefálicas distribuindo, desta forma, neurônios serotoninérgicos para a maioria das regiões cerebrais. Já o grupo caudal (B1 a B4), se estende da ponte até a porção caudal do bulbo e envia suas principais projeções para a porção caudal do tronco encefálico e para a medula espinhal (Hornung, 2003; Foguet et al., 1992; Jacobs & Azmitia, 1992).

Com o isolamento da 5-HT por Rapport, em 1948, uma série incessante de pesquisas vem sendo realizada com o intuito de melhorar o entendimento sobre a participação desta em diversos processos fisiológicos e patológicos. De fato, a 5-HT tem sido implicada no controle de uma variedade de funções centrais, incluindo regulação da temperatura, humor, percepção da dor, apetite, ciclo sono-vigília, aprendizado e memória e outras. Além disso, acredita-se que alterações no metabolismo da 5-HT estejam associadas a vários processos patológicos como obesidade, depressão, esquizofrenia, ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo, fobia social, abuso e dependência de drogas, enxaqueca, hipertensão e emese (Hoyer et al., 2002; Markstein et al., 1999; Moulignier, 1994). Esta grande variedade de efeitos serotoninérgicos se deve à ampla distribuição dos seus neurônios no SNC.

As ações desempenhadas pela 5-HT no SNC são mediadas pela sua interação com os seus receptores específicos. Desde a classificação inicial dos dois primeiros receptores serotoninérgicos por Gaddum e Picarelli, novos receptores foram descobertos e classificados de acordo com as suas características estruturais, operacionais e transduccionais (Hoyer et al., 2002). Atualmente, os receptores serotoninérgicos estão agrupados em 7 famílias, classificadas de 5-HT₁ a 5-HT₇, que abrangem cerca de 14 subtipos diferentes de receptores (Green, 2006; Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Uphouse, 1997; Gyermek, 1996). Como a 5-HT,

os receptores serotoninérgicos encontram-se distribuídos em várias regiões do SNC. É sugerido que esta multiplicidade de receptores possa ser resultado de um processo evolutivo do sistema serotoninérgico (Gerhardt & Van Heerikhuizen, 1997; Uphouse, 1997; Hoyer et al., 1994). Além disso, já se sabe que diferenças na localização dos receptores serotoninérgicos possibilitam que a 5-HT participe de múltiplas funções, com receptores diferentes, algumas vezes, participando na regulação da mesma função (Uphouse, 1997; Dubovsky & Thomas, 1995).

Quanto às suas características transducionais, pode-se dizer que a maioria dos receptores serotoninérgicos, caracterizados até o momento, são proteínas de membrana acopladas à proteína G, com exceção dos receptores 5-HT₃, que são ligados a canais iônicos (Green, 2006; Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999). O mecanismo de ação dos receptores acoplados à proteína G ocorre através da ativação desta, desencadeando um sistema de segundos mensageiros diversos, responsável pela transdução de sinal da 5-HT para a maquinaria celular. As respostas celulares desencadeadas pela ligação da 5-HT aos seus receptores metabotrópicos são relativamente lentas. Contudo, quando esta se liga aos receptores 5-HT₃ acoplados a canais iônicos, as respostas celulares são relativamente rápidas (Green, 2006; Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Gyermek, 1996).

Os receptores serotoninérgicos ligados à proteína G podem ser subdivididos de acordo com suas funções bioquímicas, podendo influenciar a atividade tanto da enzima adenilato ciclase como a da fosfolipase C, as quais produzem segundos mensageiros. Os receptores 5-HT₁ são caracterizados por inibirem a atividade da adenilato ciclase, enquanto os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ atuam estimulando a atividade desta enzima. A estimulação do sistema da fosfolipase C é característica da atividade dos receptores 5-HT₂. O mecanismo de acoplamento

bioquímico dos receptores 5-HT₅ ainda carece de esclarecimento (Bockaert & Pin, 1998).

A família 5-HT₁ dos receptores serotoninérgicos é formada, atualmente, por 5 subtipos diferentes, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-ht_{1E} e 5-ht_{1F}, que se acoplam negativamente à adenilato ciclase via proteína G (Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999, Saxena, 1995). Estes receptores são encontrados em diversas regiões do SNC, incluindo os núcleos da rafe, o hipocampo, os gânglios da base, o tálamo, o córtex frontal e o hipotálamo (Lanfumeey & Hamon, 2004; Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Bruinvels et al., 1994; Pazos & Palácios, 1985). Os receptores dos subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} podem agir tanto como autorreceptores, reduzindo a síntese e a liberação de serotonina, ou como heterorreceptores, controlando a liberação de outros neurotransmissores como o glutamato, o GABA, a acetilcolina, a dopamina e a noradrenalina (Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Pauwels, 1997, Bockaert & Pin, 1998). Fisiologicamente, estes três subtipos de receptores parecem estar atuando em um número de efeitos fisiológicos e comportamentais como a regulação neuroendócrina do ACTH (Malmkvist et al., 2003; Jorgensen et al., 2002), o comportamento alimentar (De Vry et al., 2003; Gur et al., 2003; De Vry & Schreiber, 2000), a regulação da temperatura (Lin et al., 2001; Oerther, 2000), o controle da pressão sanguínea e frequência cardíaca (Moran et al., 1998; Dabire et al., 1987), a ereção peniana (Hayes & Adaikan, 2002; Maeda et al., 1994) e outros. Na prática médica, a manipulação destes receptores por drogas agonistas e antagonistas tem sido útil como alvo terapêutico no controle de algumas patologias como os transtornos de ansiedade, a depressão, a enxaqueca e a obesidade (Hoyer et al., 2002). A ausência de drogas específicas e seletivas para os receptores 5-ht_{1E} e 5-ht_{1F} *dificulta o esclarecimento sobre as funções destes no SNC (Hoyer et al., 2002).*

A família dos receptores 5-HT₂ é formada por três subtipos diferentes, o 5-HT_{2A}, o 5-HT_{2B} e o 5-HT_{2C} que são acoplados positivamente à fosfolipase C e fosfolipase A₂, mobilizando cálcio intracelular (Van Oekelen et al., 2003; Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Bockaert & Pin, 1998; Saxena, 1995) e apresentam uma considerável similaridade, tanto estrutural como farmacológica (Knight et al., 2004). Os subtipos 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} são encontrados em diversas áreas do SNC como o córtex, o hipocampo, o hipotálamo, o núcleo acumbente, o cerebelo, a amígdala, os gânglios da base e o tálamo (Leysen, 2004; Van Oekelen et al., 2003; Hoyer et al., 2002; Van de Kar et al., 2001; Barnes & Sharp, 1999), enquanto que os receptores 5-HT_{2B} estão restritos a poucas regiões como a amígdala medial, o cerebelo, o septo lateral e o hipotálamo (Hoyer et al., 2002; Duxon et al., 1997). Além disso, os receptores do subtipo 5-HT_{2C} são encontrados, especialmente, em grande quantidade no plexo coróide (Leysen, 2004; Van Oekelen et al., 2003; Hoyer et al., 2002; Van de Kar et al., 2001, Barnes & Sharp, 1999). Embora exista um grande número de antagonistas específicos para os diferentes subtipos de receptores 5-HT₂, ainda há bastante controvérsia no que se refere à seletividade dos compostos agonistas descritos até o momento. Esta falta de compostos agonistas seletivos e específicos para estes receptores tem prejudicado a definição dos papéis fisiológicos resultantes da ativação destes. No entanto, alguns estudos têm mostrado que a ativação destes receptores no SNC pode interferir com a secreção de hormônios como ACTH, corticosterona, ocitocina, renina e prolactina (Van de Kar et al., 2001; Bagdy et al., 1992), no controle alimentar (Foster-Schubert & Cummings, 2006; Nonogaki et al., 2006), na locomoção (Landry & Guertin, 2004), na ansiedade (Hackler et al., 2006; Leite-Panissi et al., 2006; De Mello Cruz et al., 2005; Wood, 2003) e na ereção peniana (Bagdy et al., 1992). Drogas serotoninérgicas que atuam nos receptores da família

5-HT₂ têm sido bastante utilizadas na prática médica para o controle de uma série de distúrbios do SNC, tais como ansiedade, depressão, esquizofrenia, enxaqueca, insônia e obesidade (Giorgetti & Tecott, 2004; Bickerdike, 2003; Akiyoshi et al., 1996; Baxter et al., 1995).

Diferente dos outros receptores serotoninérgicos, os receptores 5-HT₃ fazem parte da superfamília de canais iônicos ligante-dependentes, juntamente com os receptores nicotínicos para acetilcolina, os receptores GABA A e GABA C e os receptores para a glicina (Faerber et al., 2007; Joshi et al., 2006; Melis et al., 2006; Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Gaster & King, 1997; Saxena, 1995; Boess & Martin, 1994). O receptor 5-HT₃ é uma proteína pentamérica, com cada subunidade composta de três domínios, um extracelular, um transmembrana e um intracelular (Melis et al., 2006; Joshi et al., 2006; Hayrapetyan et al., 2005; Maricq et al., 1991). Até o momento já foram clonadas 5 subunidades do receptor 5-HT₃, que são classificadas de A a E (Reeves & Lummis, 2006; Melis et al., 2006; Hayrapetyan et al., 2005), embora apenas duas, as subunidades A e B, pareçam estar presentes nos receptores 5-HT₃ funcionais (Maricq et al., 1991; Niesler et al., 2003). Os receptores 5-HT₃ funcionais podem ser formados exclusivamente por 5 subunidades do tipo A (homoméricos), ou pela combinação das subunidades dos tipos A e B (heteroméricos) (Reeves & Lummis, 2006; Maricq et al., 1991). A presença da subunidade B nos receptores heteroméricos confere propriedades biofísicas e farmacológicas diferentes das observadas nos receptores homoméricos (Morales & Wang, 2002). A ativação dos receptores 5-HT₃ leva a uma rápida despolarização celular através da abertura de canais de cátions não específicos que permite a entrada de íons Na⁺ e Ca⁺⁺ e a saída de íons K⁺ (Hoyer et al., 2002). Estes receptores são encontrados em várias regiões do SNC tais como hipocampo, núcleo do trato solitário, área postrema, amígdala, núcleo dorsomotor do vago e

córtex cerebral (Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Morales et al., 1998). O papel fisiológico destes receptores permanece elusivo. Contudo, o uso de antagonistas destes receptores já está bem estabelecido no tratamento de emese induzida por rádio/quimioterapia ou pós-operatória. Além disso, drogas que atuam nos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ têm sido utilizadas em uma série de distúrbios psiquiátricos, dependência de drogas, nocicepção e obesidade (Faerber et al., 2007; Krzywkowski, 2006; Farber et al., 2004; Morales & Wang, 2002; Gyermek, 1995).

Os receptores 5-HT₄ são acoplados à proteína G e se ligam positivamente à adenilato ciclase, elevando os níveis intracelulares de AMPc (Saxena, 1995; Uphouse, 1997; Barnes & Sharp, 1999; Hoyer et al., 2002). Até o momento, dez isoformas dos receptores 5-HT₄ (A-J) foram identificadas em três espécies diferentes de animais, ratos, cobaias e macacos, possuindo características farmacológicas bastante similares (Alex & Pehek, 2007; Vilaro et al., 2005). No SNC estes receptores têm uma distribuição heterogênea e similar nestas espécies animais, com maior índice de expressão em regiões pertencentes aos sistemas límbico e nigroestriatal. (Alex & Pehek, 2007; Vilaro et al., 2005; Waeber et al., 1996; Patel et al., 1995). O conhecimento sobre as respostas fisiológicas induzidas pela ativação dos receptores 5-HT₄ centrais ainda é escasso, mas já se sabe que estes parecem modular a liberação de vários neurotransmissores como, acetilcolina, dopamina, GABA e serotonina (Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999). Além disso, os receptores 5-HT₄ têm sido bastante relacionados com o processo de aprendizado e memória. Atualmente, a manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₄ localizados no SNC, por agonistas específicos, tem sido uma grande esperança para o tratamento de doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer (Cho & Hu, 2007; Green, 2006; Micale et al., 2006).

A família dos receptores 5-HT₅ é composta por dois subtipos diferentes, designados de 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B} (Nelson, 2004; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002). Estes receptores estão acoplados à proteína G e já existem registros de que o subtipo 5-HT_{5A} parece se ligar negativamente à adenilato ciclase (Nelson, 2004; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002; Carson et al., 1996). No SNC os receptores 5-HT_{5A} são encontrados no hipocampo, no hipotálamo, na amígdala, no estriado, no tálamo, no cerebelo e no córtex, enquanto os receptores 5-HT_{5B} são encontrados no hipocampo, habenula e núcleo dorsal da rafe (Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002; Oliver et al., 2000; Pasqualetti et al., 1998; Matthes et al., 1993). Embora estes receptores já tenham sido identificados em espécies diferentes de animais como ratos e camundongos, as respostas fisiológicas destes ainda não são claras e as características farmacológicas ainda não foram esclarecidas. Com base na localização dos receptores 5-HT_{5A} no SNC, é proposto que estes possam estar envolvidos em múltiplas funções da serotonina como a regulação dos estados afetivos, cognição, ansiedade, percepção sensorial e funções neuroendócrinas (Oliver et al., 2000).

O receptor 5-HT₆ é acoplado à proteína G e se liga positivamente à adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc intracelular (Mitchell & Neumaier, 2005; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002; Barnes & Sharp, 1999). No SNC, estudos imuno-histoquímicos têm mostrado alto índice de expressão destes receptores em áreas como o estriado, núcleo acumbente, tubérculo olfatório e córtex, enquanto que em áreas como a amígdala, hipotálamo, tálamo, cerebelo e hipocampo, estes são expressos moderadamente (Mitchell & Neumaier, 2005; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002). A depleção da inervação serotoninérgica não afeta a expressão de receptores 5-HT₆, sugerindo que estes não estejam localizados pré-sinápticamente (Gerard et al., 1996). Alguns estudos têm mostrado que

antagonistas dos receptores 5-HT₆ aumentam a atividade colinérgica central podendo, desta forma, interferir em funções fisiológicas exercidas pela neurotransmissão colinérgica. Esses achados são importantes, principalmente, no que diz respeito ao possível uso clínico de antagonistas 5-HT₆ como drogas potenciais em estados patológicos em que a neurotransmissão colinérgica esteja alterada como depressão, déficit de memória e ansiedade (Mitchell & Neumaier, 2005; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002). Além disso, a alta afinidade de drogas antipsicóticas por estes receptores mostra que os mesmos podem ser importantes no controle de transtornos como a esquizofrenia (Li et al., 2007; Meltzer, 1999). A liberação de outros neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, GABA e glutamato também pode ser modulada pelos receptores 5-HT₆ (Mitchell & Neumaier, 2005). Grande interesse tem sido dispensado aos receptores 5-HT₆, uma vez que estes parecem estar envolvidos em uma série de distúrbios neurológicos como o mal de Alzheimer, ansiedade, depressão, esquizofrenia e déficit de aprendizado.

Da família dos receptores serotoninérgicos, o receptor 5-HT₇ é o mais recentemente identificado. Como os receptores 5-HT₄ e 5-HT₆, o receptor 5-HT₇ também é acoplado positivamente à proteína G, aumentando os níveis de AMPc intracelular. No SNC estão presentes em alta densidade no hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, córtex e núcleo dorsal da rafe (Thomas & Hagan, 2004; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002). Quatro isoformas diferentes do receptor 5-HT₇ são expressas em roedores e humanos. No entanto, até o momento, estas isoformas não parecem divergir no seu perfil farmacológico, de transdução de sinal ou na sua distribuição (Hoyer et al., 2002). Os receptores 5-HT₇ centrais parecem exercer importante papel fisiológico na termorregulação e no ritmo circadiano (Glass et al., 2003; Guscott et al., 2003). Além disso, estes receptores estão presentes nos neurônios glutamatérgicos da rafe podendo, desta forma, interferir na atividade de

neurônios serotoninérgicos (Harsing et al., 2004). Estudos farmacológicos têm mostrado que estes receptores podem ter importante função no controle de transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, depressão, alterações do ciclo sono-vigília e enxaqueca (Thomas & Hagan, 2004; Hoyer et al., 2002; Wesolowska, 2002).

NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA E HOMEOSTASIA HIDROSSALINA

A 5-HT tem sido extensivamente implicada em uma gama de funções fisiológicas e comportamentais, incluindo o controle do comportamento ingestivo. A maioria dos estudos sobre o envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica neste comportamento diz respeito, principalmente, ao comportamento de ingestão alimentar. Estudos farmacológicos têm mostrado que drogas que estimulam, direta ou indiretamente, a atividade pós-sináptica da 5-HT diminuem o consumo alimentar em diversas espécies de mamíferos. Por outro lado, drogas que bloqueiam os receptores pós-sinápticos da 5-HT ou diminuem a neurotransmissão serotoninérgica, através da ativação de autorreceptores, aumentam o consumo alimentar. De um modo geral, a 5-HT parece exercer um papel inibitório no comportamento de ingestão alimentar e por isso diversas drogas serotoninérgicas têm sido atualmente utilizadas no controle da obesidade (Halford et al., 2005; Bickerdike, 2003).

Embora o interesse pelo papel da 5-HT no controle central do equilíbrio hidrossalino tenha aumentado nos últimos anos, seu envolvimento na ingestão de água e no apetite específico por sódio ainda necessita de maiores esclarecimentos. Contudo, a literatura existente parece indicar que a circuitaria serotoninérgica central exerce um papel inibitório importante no controle da ingestão de água e de sal.

O envolvimento da 5-HT no controle central do equilíbrio hidroeletrólítico tem sido estudado desde a década de 70, quando Tangaprégasson et al. (1974) demonstraram que lesões dos núcleos dorsal e medial da rafe aumentam a ingestão de água e a excreção de sódio em ratos. Já na década de 90, Reis et al. (1994) mostraram que a destruição dos neurônios serotoninérgicos por lesões do

núcleo dorsal da rafe ou injeção ventricular de p-CPA, um depletor de serotonina, produzem um efeito antinatriurético, além de aumentar a ingestão de água em ratos. O mesmo grupo, ainda utilizando do método de depleção serotoninérgica pela p-CPA, mostrou que este procedimento aumenta o apetite por sódio induzido por depleção deste íon ou por estimulação beta-adrenérgica (Lima et al., 2004). Kita et al. (1998) também mostraram que a depleção de serotonina e dopamina por administração de altas doses de metanfetamina inibe a ingestão de água de uma forma transitória em ratos. Mais recentemente, foi observado que lesão química do núcleo dorsal da rafe aumenta a ingestão de água e de sal em diferentes protocolos experimentais (Cavalcante-Lima et al., 2005; Olivares et al., 2003). Estes resultados sugerem que a integridade da neurotransmissão serotoninérgica é imprescindível para o controle central da homeostasia hidrossalina e que esta parece exercer um tônus inibitório na ingestão de água e de sal.

Vários outros estudos também têm sido realizados com o intuito de esclarecer o envolvimento dos diversos receptores serotoninérgicos na manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico. Reis et al. (1992; 1990a; 1990b; 1989) demonstraram que a injeção intracerebroventricular (i.c.v) de MK-212, um agonista não específico para os receptores 5-HT₂, inibe a ingestão de água induzida por uma série de estímulos dipsogênicos, além de induzir uma resposta antinatriurética. Por outro lado, Gentili et al. (1991) demonstraram que a injeção de quetanserina, um antagonista inespecífico 5-HT₂, inibe o apetite por sal induzido por DOCA e por depleção de sódio. Outros trabalhos têm mostrado que, além dos receptores 5-HT₂, outros receptores serotoninérgicos também parecem estar envolvidos no controle central da ingestão de água e sal. De Castro e Silva et al. (1997) mostraram que a ativação farmacológica dos receptores 5-HT_{1D} inibe de forma significativa a ingestão de água induzida pela estimulação colinérgica, angiotensinérgica e adrenérgica

central. Também foi mostrado que os receptores 5-HT₄ parecem exercer um papel distinto sobre o controle da ingestão de água, uma vez que o bloqueio dos mesmos potencializa o efeito dipsogênico da ANGII, mas inibe o mesmo efeito induzido pela estimulação colinérgica central (Castro et al., 2000). Mais recentemente, foi mostrado que a ativação farmacológica central dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT₃ inibe a ingestão de água induzida por diferentes estímulos fisiológicos, bem como a ingestão de salina hipertônica em animais sódio-depletados (Castro et al., 2002a; 2002b; 2003). Estes resultados mostram que os diferentes receptores serotoninérgicos centrais parecem exercer papel importante na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico.

Alguns estudos também têm sido realizados na tentativa de esclarecer o papel das possíveis áreas centrais envolvidas com o mecanismo serotoninérgico de controle da homeostasia hidrossalina. Lu et al. (1992) demonstraram que lesões bilaterais do *locus coeruleous* (LC) abolem o efeito dipsogênico da administração intraperitoneal de ritanserina no modelo de polidipsia induzida, sugerindo, desta forma, que os efeitos dos receptores 5-HT₂ neste modelo experimental dependem da integridade do LC. Uma série de estudos também tem mostrado que neurônios serotoninérgicos localizados no núcleo parabraquial lateral (LPBN) parecem exercer um papel inibitório importante no controle da homeostasia hidrossalina. A administração bilateral de metissergida, antagonista não seletivo dos receptores 5-HT₁₋₂, no LPBN aumenta de forma significativa a ingestão de salina hipertônica e de água em um número de protocolos indutores de sede e do apetite por sal como angiotensina i.c.v, administração sistêmica de furosemida + captopril, depleção de sódio, privação hídrica, hiperosmolaridade, injeção sistêmica de DOCA e de isoproterenol (De Luca Jr et al., 2003; De Gobbi et al., 2000; Menani et al., 2000; Menani et al., 1998a; Menani et al., 1996; Menani & Johnson, 1995). Este efeito

estimulatório da administração de metissergida no LPBN parece ser mediado, em parte, pelos receptores angiotensinérgicos do tipo AT1 localizados no órgão subfornical (SFO), uma vez que o bloqueio destes receptores pelo losartan, antagonista dos receptores AT1, inibe a ação estimulatória da metissergida na ingestão de sal (Menani et al., 1998b; Colombari et al., 1996). Além disso, os mesmos autores têm mostrado a presença de mecanismos inibitórios importantes envolvendo serotonina e outros neurotransmissores como colecistocinina (CCK), acetilcolina e relaxina no controle da ingestão de água e sal no LPBN (Fratucci De Gobbi et al., 2001; Menani et al., 2002; Menani et al., 2004). Os receptores 5-HT_{1A} localizados no LPBN também parecem participar do controle da ingestão de água e sal. O agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, quando injetado no LPBN aumenta a ingestão de água e sal induzida pela administração associada de furosemida + captopril e pela depleção de sódio, enquanto que a 5-HT injetada sozinha ou combinada com 8-OH-DPAT inibe a ingestão de sal (De Gobbi et al., 2005). Respostas renais e hormonais induzidas por variações do volume sanguíneo parecem ser também controladas pelos neurônios serotoninérgicos do LPBN. Margatho et al. demonstraram que a metissergida injetada no LPBN diminui o volume urinário, a excreção de sódio e de potássio e a concentração plasmática do ANP e da ocitocina, enquanto que o DOI, agonista 5-HT_{2A-2C}, aumenta todos estes parâmetros no modelo experimental de expansão do volume sanguíneo (Margatho et al., 2007).

Os efeitos inibitórios das vias serotoninérgicas do LPBN sobre a homeostasia hidrossalina também foram demonstrados em um recente estudo de microdiálise. Neste estudo verificou-se que os níveis de 5-HT e do seu metabólito, o 5-HIAA, aumentaram no LPBN em animais depletados de fluidos que tiveram acesso a água e a salina concentrada. Enquanto que os níveis dessas substâncias no LPBN diminuíram quando os animais não tiveram acesso aos bebedouros de água e sal,

mas aumentaram depois que os mesmos animais tiveram acesso permitido aos bebedouros (Tanaka et al., 2004). Estes dados em conjunto com os dados obtidos com administração de drogas serotoninérgicas no LPBN, sugerem a existência de um mecanismo serotoninérgico inibitório no LPBN sobre a ingestão de água e sal.

A serotonina central também parece estar envolvida no controle do comportamento ingestivo em aves. Alguns estudos têm mostrado que a administração central de 5-HT e do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, aumenta a ingestão de água em pombos submetidos a diferentes protocolos experimentais, além de inibir a ingestão alimentar (Da Silva et al., 2004; Brun et al., 2001; Steffens et al., 1997).

Periféricamente a serotonina também parece exercer um papel importante no controle da ingestão de água e no apetite específico por sódio. Inicialmente, Neil & Cooper (1989) demonstraram que a administração periférica de drogas que estimulam, direta ou indiretamente, a transmissão serotoninérgica inibe a ingestão de salina hipertônica em ratos privados de água. Em seguida, foi observado que a administração periférica de quipazina, m-CPP, d-fenfluramina e MK-212 inibe a ingestão de água e de salina hipertônica em ratos (Valencia-Flores et al., 1990; Cooper & Ciccocioppo, 1993; Cooper & Barber, 1993), enquanto que a administração de agonistas dos receptores 5-HT₁, que promovem redução da atividade serotoninérgica central, aumenta a ingestão de água e de salina hipertônica (Simansky, 1991; Cooper & Ciccocioppo, 1993). Rouah-Rosilio et al. (1994) mostraram que a administração de dexfenfluramina, um potencializador da transmissão serotoninérgica, inibe a ingestão de salina hipertônica em ratos depletados de sódio (natriorexia), bem como em ratos repletos deste íon (natriofilia). Por outro lado, a metergolina, um antagonista serotoninérgico não específico, aumenta a ingestão livre e induzida de sal. A dexfenfluramina também inibe a

ingestão de água além de aumentar a osmolaridade plasmática e os níveis de expressão da arginina-vasopressina no hipotálamo em um modelo animal de anorexia (Hillebrand et al., 2006). Testes de comportamento ingestivo têm também mostrado que a administração de diferentes agonistas 5-HT₁ e 5-HT₂ inibem a ingestão de água em animais privados ou não de alimento (Schreiber et al., 2000; Lee et al., 2002). Badauê-Passos et al. (2003) mostraram que em animais hipo e eutireoidianos o m-CPP, agonista 5-HT_{2C}, a fluoxetina e a fenfluramina inibem o apetite específico por sódio e a ingestão de água em diferentes protocolos experimentais. Finalmente, Hogg & Dalvi (2004) mostraram que o uso conjunto de fluoxetina com antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} acelera e aumenta o efeito antidipsogênico desta em um modelo experimental de polidipsia induzida.

Os dados acima apresentados indicam claramente que a 5-HT central parece desempenhar uma função inibitória tanto sobre a ingestão hídrica quanto sobre o apetite específico por sódio. No entanto, trabalhos adicionais são necessários visando ao esclarecimento dos diversos sítios centrais destas ações serotoninérgicas, assim como dos diversos subtipos de receptores serotoninérgicos nelas envolvidos.

ENVOLVIMENTO DO COMPLEXO AMIGDALÓIDE NO EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO

O complexo amigdalóide está localizado no lobo temporal mediano e é composto por cerca de 13 subnúcleos distintos estruturalmente que possuem comunicação entre eles e com áreas não-amigdalóides adjacentes e são diferenciados com base nas suas conexões, citoarquitetura e histoquímica (Sah et al., 2003). Estes subnúcleos estão divididos em três principais grupos: 1- o núcleo basolateral, que consiste dos subnúcleos basal, lateral e acessório basal; 2- o núcleo corticomedial, composto pelos núcleos do trato olfatório lateral, leito do trato olfatório acessório, cortical anterior e posterior e córtex periamigdalóide; e, por último, 3- o núcleo centromedial, também chamado de amígdala estendida, que é formado pelos núcleos central, medial, porção amigdalóide do leito da estria terminal e pela região caudo-dorsal da substância inominata (De Olmos et al., 2004; Sah et al., 2003; McDonald, 1998; Swanson & Petrovich, 1998).

As diversas conexões aferentes e eferentes do complexo amigdalóide têm sido extensivamente mostradas em uma série de estudos. Estes têm mostrado que o complexo amigdalóide recebe *inputs* de múltiplas regiões cerebrais, além de enviar projeções para diversas regiões do SNC, que incluem áreas corticais e subcorticais. As projeções que chegam à amígdala são classificadas de duas formas, aquelas provenientes de estruturas córtico-talâmicas e aquelas oriundas de estruturas hipotalâmicas e do tronco cerebral. As primeiras são responsáveis por emitir informações de áreas sensoriais e de estruturas relacionadas com o sistema de memórias, enquanto que as outras transmitem informações de regiões envolvidas no controle de diferentes comportamentos e do sistema autonômico. Na verdade, já se sabe que todas as modalidades sensoriais (olfatória, somatosensorial, gustatória e visceral, auditiva e visual) enviam *inputs* para os diferentes núcleos amigdalóides. Além disso, os núcleos central, medial e lateral

recebem *inputs* substanciais do hipotálamo, enquanto que o tronco encefálico envia seus *inputs* principalmente para o núcleo central da amígdala (De Olmos et al., 2004; Sah et al., 2003; Pitkänen, 2000; McDonald, 1998).

Projeções amigdalóides também se espriam para diversas regiões do córtex, do hipotálamo e do tronco cerebral. O córtex sensorial, por exemplo, recebe em geral projeções amigdalóides dos núcleos corticomédial e basolateral. O complexo basolateral também emite projeções importantes para o sistema de memória do lobo temporal mediano, hipocampo e córtex perirrinal, bem como para o núcleo acumbente, o córtex pré-frontal e o tálamo. A região lateral do núcleo central da amígdala emite projeções para o hipotálamo, para o núcleo do leito da estria terminal, e vários núcleos do tronco encefálico como o núcleo parabraquial, os núcleos da substância cinzenta periaquedutal e o núcleo do trato solitário. Já as subdivisões medial e capsular da amígdala central inervam principalmente regiões dorsolaterais e caudolaterais do hipotálamo. Além dessas projeções diretas com o hipotálamo, a amígdala central também envia projeções para o núcleo da estria terminal que por sua vez emite projeções para o hipotálamo. Quanto ao núcleo medial da amígdala, pode-se dizer que este envia projeções para a zona neuroendócrina do hipotálamo como o núcleo paraventricular, além de emitir projeções, juntamente com outros núcleos amigdalóides relacionados ao sistema olfatório, para o núcleo ventromedial hipotalâmico (De Olmos et al., 2004; Sah et al., 2003; Pitkänen, 2000; McDonald, 1998).

Além da comunicação que existe entre os núcleos amigdalóides e outras áreas do SNC, estes também mantêm conexões extensivas intra e internucleares. Estudos anatômicos têm mostrado a presença de grandes árvores dendríticas em alguns núcleos amigdalóides, além de mostrarem que neurônios com corpos celulares localizados em uma subdivisão nuclear podem ter dendritos que se

extendem para outras divisões. Isto permite que informações que chegam à amígdala passem por um processamento local antes que a resposta apropriada seja dada. No entanto, o impacto fisiológico dessas conexões locais e suas implicações para o processamento de informações ainda necessitam de maiores esclarecimentos (McDonald, 1998; Pitkänen, 2000; Sah et al., 2003; De Olmos et al., 2004).

A amígdala possui uma inervação monoaminérgica rica e heterogênea, e *inputs* serotoninérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos são moderadamente densos, enquanto que a inervação adrenérgica é esparsa. As inervações monoaminérgicas encontram-se mais densamente localizadas na amígdala central, onde são encontradas inervações para as monoaminas acima citadas, e na amígdala basal. Os outros núcleos amigdalóides recebem *inputs* monoaminérgicos de uma forma mais variável (Fallon & Ciofi, 1992). Na amígdala também são encontradas uma variedade de células e fibras contendo neuropeptídeos cerebrais que são distribuídos de forma diversa em todos os núcleos amigdalóides. Os principais neuropeptídeos encontrados no complexo amigdalóide são a angiotensina, o peptídeo atrial natriurético, a ocitocina, o peptídeo vasoativo intestinal, a colecistocinina, a somatostatina, a neurotensina, a encefalina, o neuropeptídeo Y, a vasopressina, e o hormônio liberador de corticotropina (Roberts, 1992; De Olmos et al., 2004). Os aminoácidos GABA e glutamato são encontrados colocalizados em muitos dos neurônios peptidérgicos citados anteriormente (De Olmos et al., 2004). Além disso, já é conhecido que as projeções extrínsecas da amígdala extendida são predominantemente GABAérgicas, enquanto que as conexões extrínsecas do restante dos núcleos do complexo amigdalóide são presumivelmente glutamatérgicas (Swanson & Petrovich, 1998).

As projeções serotoninérgicas dos núcleos amigdalóides são originadas, principalmente, dos grupamentos celulares B7 e B5 localizados na rafe dorsal e medial, respectivamente (Bobillier et al., 1979; Parent et al., 1981). Estes axônios serotoninérgicos são espalhados e encontram-se bastante concentrados na maioria dos núcleos amigdalóides como o núcleo basal, o núcleo medial da amígdala central, o núcleo medial e o núcleo lateral. Por outro lado, regiões amigdalóides como o trato olfatório acessório, a região lateral da amígdala central e o núcleo cortical posterior apresentam baixa densidade destas fibras (Fallon & Ciofi, 1992). Além das fibras serotoninérgicas, representantes das sete famílias de receptores serotoninérgicos encontram-se distribuídos de uma forma variada por todas as regiões do complexo amigdalóide, mostrando a importância do conteúdo serotoninérgico no controle de diversas funções amigdalóides (Hoyer et al., 2002).

Os núcleos amigdalóides estão implicados no controle de uma variedade de funções comportamentais e regulatórias como emoção e memória, comportamentos sociais como reprodução e agressão, e regulação dos sistemas neuroendócrino e autonômico (Sah et al., 2003; De Olmos et al., 2004) constituindo, desta forma, uma ligação essencial entre áreas sensoriais e límbicas de regiões cerebrais corticais e subcorticais, como o hipotálamo, tronco encefálico e estriado, que são responsáveis por mediar respostas emocionais e motivacionais. Além disso, o complexo amigdalóide tem sido implicado em uma variedade de distúrbios neurais como a esquizofrenia, a demência, a epilepsia, a depressão, o estresse pós-traumático e outros (Brunet-Gouet & Decety, 2006; Kalia, 2005; Kanner, 2004; Rauch et al., 2006).

A amígdala recebe e envia projeções para uma variedade de estruturas centrais relacionadas com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico como o hipotálamo, o núcleo parabraquial, o núcleo do trato solitário, a área postrema, o

órgão subfornical, a área septal e outras. Esta comunicação recíproca entre a amígdala e estas estruturas, reforça o conceito de que os diferentes núcleos amigdalóides participam da regulação central do equilíbrio hidroeletrolítico (Price et al., 1987; Johnson & Thunhorst, 1997; Johnson et al., 1999). De fato, já se sabe que o complexo amigdalóide está envolvido na rede neural de coordenação tanto de reflexos autonômicos e endócrinos quanto de comportamentos motivados para procura e consumo de substâncias contendo sódio (Johnson et al., 1999).

Uma série de estudos com lesões extensas e estimulação elétrica de núcleos amigdalóides foram pioneiros em mostrar o envolvimento do complexo amigdalóide no controle hidrossalino. Gentil et al. (1968) mostraram que lesões bilaterais do núcleo corticomedial da amígdala aumentam a ingestão de solução salina hipertônica e de água, enquanto que lesões envolvendo as áreas laterais e mediais diminuem. Mostrando, desta forma, que os núcleos corticomediais parecem exercer um papel inibitório, enquanto que os núcleos laterais e mediais exercem papel estimulatório no controle da ingestão de água e sal. Em 1971, estes dados foram corroborados em um trabalho mostrando que a estimulação elétrica da área cortical diminui a ingestão de água e sal, enquanto que a estimulação da área basolateral tem efeito contrário (Gentil et al., 1971). Embora os núcleos corticomediais e basolaterais desempenhem funções diferentes no controle da ingestão de água e sal, lesões eletrolíticas de todo o complexo amigdalóide diminuem drasticamente a ingestão destes fluidos (Cox et al., 1978), além de inibirem a ingestão de água induzida por 2-desoxi-D-glicose (Tordoff et al., 1982). Também foi mostrado que alterações na ingestão de sal induzidas por lesões em diferentes áreas da amígdala deixam de existir quando o hipotálamo ou a área septal são lesionados. Enquanto isto, nos casos onde a lesão hipotalâmica ou da área septal acontece antes das áreas amigdalóides serem lesionadas nenhuma alteração é observada na ingestão

de solução salina induzida por lesão do hipotálamo ou da área septal (Saad et al., 1972; 1981). Estes resultados mostram que a integridade funcional do complexo amigdalóide é necessária para a regulação hidroeletrólítica e que este depende de estruturas hipotalâmicas e septais intactas para exercer suas funções nestes parâmetros fisiológicos. Além disso, Saad et al. (1994) também mostraram que lesões químicas de corpos celulares localizados na área corticomedia da amígdala aumentam a ingestão de água e sal. Isto indica que além das fibras de passagens, corpos celulares desta região amigdalóide participam do controle da ingestão de água e sal.

Estudos mais recentes têm mostrado que lesões de núcleos específicos da amígdala como os núcleos BLA, MeA e CeA também podem interferir no equilíbrio hidroeletrólítico. Inicialmente foi demonstrado que a ablação da amígdala basolateral reduz o apetite por sódio induzido por DOCA (Nachman & Ashe, 1974). Posteriormente, uma série de estudos demonstraram que lesões da MeA inibem o apetite específico por sódio induzido por mineralocorticóides, mas não por sódio-depleção (Nitabach et al., 1989; Schulkin et al., 1989; Zhang et al., 1993). Além disso, também foi observado que a injeção do antimitótico colchicina na MeA inibe a ingestão de sal induzida por formalina (Zolovick, 1980). Sabe-se também que lesões da CeA atenuam a ingestão livre de sódio e inibem de forma significativa o apetite por sal induzido por DOCA, sódio-depleção, ioimbina sistêmica e administração central de ANGII (Galaverna et al., 1992; Zardetto-Smith et al., 1994). Como na CeA, lesões do BNST (Núcleo do leito da estria terminal) também atenuam o apetite por sal induzido por vários métodos (Zardetto-Smith et al., 1994; Reilly et al., 1994). Estes resultados mostram que os distintos núcleos amigdalóides podem exercer papéis particulares no controle central da ingestão de água e sal.

Até o presente momento, são poucos os trabalhos que mostram o envolvimento de neurotransmissores localizados no complexo amigdalóide no controle hidroeletrolítico. A administração de morfina (agonista dopaminérgico) ou de espiperidol (antagonista dopaminérgico) na CeA aumenta a ingestão de sal sem interferir com ingestão de água. No entanto, quando administradas conjuntamente, estas drogas não interferem com a ingestão destes fluidos (Mogenson & Wu, 1982). As taquicininas presentes no BNST também parecem estar envolvidas no controle da ingestão de sal, uma vez que a administração de eledoisina neste núcleo provoca um potente efeito antinatriurético em animais depletados de sódio (Pompei et al., 1991). Saad et al. (1994) mostraram que a estimulação colinérgica do complexo amigdalóide diminui a ingestão de água e sal em ratos privados de água. Os mineralocorticóides, localizados na amígdala, também parecem exercer papel importante no equilíbrio hidrossalino, uma vez que o uso de sondas antisense contra mineralocorticóides reduz a ingestão de sódio induzida por DOCA, mas não tem efeito sobre a ingestão de sódio induzida por adrenalectomia (Sakai et al., 1996, 2000).

Mais recentemente, foi mostrado em estudo com técnica de marcação axonal que a CeA está conectada a um grupo de neurônios sensíveis à aldosterona no NTS, tendo o LPBN como uma estação intermediária. Esta via pode ser um dos circuitos neuroanatômicos para explicar a modulação da ingestão de sal pela CeA (Geerling & Loewy, 2006).

Esses dados em conjunto indicam que o complexo amigdalóide desempenha função importante tanto sobre a ingestão hídrica quanto sobre o apetite específico por sódio. No entanto, trabalhos adicionais ainda são necessários para esclarecer os mecanismos utilizados pela amígdala no controle do equilíbrio hidroeletrolítico.

Hipóteses Nulas

1. A ativação dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala medial e na amígdala central não altera o apetite específico por sódio induzido por depleção deste íon em ratos.

2. A ativação dos receptores 5-HT_{2C} localizados na amígdala medial e na amígdala central não altera o apetite específico por sódio induzido por depleção deste íon em ratos.

Hipóteses Testes: para verificar o papel dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala medial sobre o controle do apetite por sódio.

H1. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados na amígdala medial estimula o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

H2. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados na amígdala medial inibe o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

Hipóteses Testes: para verificar o papel dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala central sobre o controle do apetite por sódio.

H3. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados na amígdala central estimula o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

H4. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados na amígdala central inibe o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

Hipóteses Testes: para verificar o papel dos receptores 5-HT_{2C} localizados na amígdala medial sobre o controle do apetite por sódio.

H5. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C} localizados na amígdala medial estimula o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

H6. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C} localizados na amígdala medial inibe o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

Hipóteses Testes: para verificar o papel dos receptores 5-HT_{2C} localizados na amígdala central sobre o controle do apetite por sódio.

H7. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C} localizados na amígdala central estimula o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

H8. A ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C} localizados na amígdala central inibe o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon.

OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos localizados na amígdala sobre o controle central da ingestão de sal em ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudar o papel dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala medial sobre a ingestão de sal em ratos sódio-depletados.
- 2- Estudar o papel dos receptores 5HT_{2C} localizados na amígdala medial sobre a ingestão de sal em ratos sódio-depletados.
- 3- Estudar o papel dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala central sobre a ingestão de sal em ratos sódio-depletados.
- 4- Estudar o papel dos receptores 5HT_{2C} localizados na amígdala central sobre a ingestão de sal em ratos sódio-depletados.

A serotonina é um dos reguladores da saciedade alimentar e, certamente, os efeitos que este neurotransmissor central exerce sobre a ingestão de água e sal é parte do controle dos comportamentos ingestivos em geral.

Do ponto de vista fisiológico, farmacológico, toxicológico e clínico, o esclarecimento da participação serotoninérgica central no controle da ingestão de água e sal é de fundamental importância.

Do ponto de vista farmacológico, a circuitaria serotoninérgica central é alvo de uma série de fármacos destinados ao controle de diversos transtornos psiquiátricos, como a depressão e a ansiedade. Além disso, drogas serotoninérgicas estão sendo usadas rotineiramente como anoréxicos.

No que se refere à toxicologia, uma série de drogas de uso ilegal como a cocaína, anfetaminas e neurotóxicos seletivos como MDMA (ecstasy) afetam a neurotransmissão serotoninérgica central.

Portanto, o esclarecimento das ações serotoninérgicas centrais sobre estes parâmetros de vital importância para o equilíbrio hidroeletrolítico, como a ingestão de água e sal, é justificado e oportuno.

Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Research* 1099: 121-132, 2006.



Research Report

Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats

Carla Luz^a, Anderson Souza^b, Rodolfo Reis^b,
Josmara Bartolomei Fregoneze^b, Emilio de Castro e Silva^{b,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 23 April 2006

Available online 12 June 2006

Keywords:

m-CPP

Serotonin

5-HT_{2C} receptor

m-CPBG

5-HT₃ receptor

Salt intake

ABSTRACT

In the present study, we investigated the role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala (MeA) in the control of water and salt intake in sodium-depleted rats. Pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located in the medial amygdala by the selective 5-HT₃ receptor agonist m-CPBG significantly reduced salt intake in sodium-depleted rats, an effect that is reverted by pretreatment with the selective 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron. In addition, the injection of ondansetron alone into the medial amygdala had no effect on salt intake in sodium-depleted and in sodium-repleted rats. Pharmacological stimulation of 5-HT_{2C} receptors located in the medial amygdala by the selective 5-HT_{2C} receptor agonist m-CPP failed to modify salt intake in sodium-depleted rats, whereas the blockade of these receptors by the selective 5-HT_{2C} receptor antagonist SDZ SER 082 significantly reduced salt intake in this same group of animals. These results lead to the conclusion that the pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located within the MeA inhibits salt intake in sodium-depleted rats and that, in this same brain region, the functional integrity of 5-HT_{2C} receptors is required to achieve the full expression of sodium appetite in sodium-depleted rats.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Food and water intake are behavioral processes simultaneously regulated by a wide array of anatomically distinct brain areas operating a myriad of neurotransmitters, including serotonin. The massive amount of research on the central serotonergic control of food intake has definitely confirmed a major role of this indolamine in the regulation of the hunger/satiety balance (Halford et al., 2005; Meguid et al., 2000; Simanski, 1996). Less attention has been given to the role of central serotonin in the control of water and salt intake,

leading us to concentrate our efforts on elucidating the mechanisms of action of this important serotonergic function.

Previous studies carried out by our group, in which we have used the laboratory rat in several experimental protocols, led us to conclude that different subtypes of central serotonin receptors seem to participate in the intricate control of water and salt intake. Indeed, in a previous paper, our results showed that the pharmacological activation of central 5-HT_{1D} receptors leads to a significant inhibition of water intake induced by central cholinergic, angiotensinergic and adrenergic stimulation (De Castro e Silva et al., 1997). Moreover, we

* Corresponding author. Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 40110-100 Salvador-BA, Brazil. Fax: +55 71 3337 0591.

E-mail address: emilio@ufba.br (E. de Castro e Silva).

have shown that central 5-HT₄ receptors exert a dualist role on the control of water intake, potentiating angiotensin-II-induced drinking and inhibiting thirst induced by central cholinergic activation (Castro et al., 2000). We have also shown that the 5-HT₂ receptor family appears to participate in thirst and sodium appetite regulation. In fact, the pharmacological activation of central 5-HT_{2C} receptors inhibits water intake elicited by different thirst-inducing physiological stimuli (Castro et al., 2002a) and decreases sodium appetite in sodium-depleted rats (Castro et al., 2003). Additionally, we have also established that the central activation of 5-HT₃ receptors significantly diminishes water intake in experimental protocols in which different physiological stimuli are used to promote thirst (dehydration, hypovolemia and hyperosmolarity) and following central angiotensinergic and cholinergic activation (Castro et al., 2002b). Finally, we have shown that the activation of central 5-HT₃ receptors inhibits salt intake in sodium-depleted rats (Castro et al., 2003).

In all of these previous studies, we have used pharmacological approaches in which selective serotonergic drugs were injected directly into the third ventricle and we analyzed their effects on water or salt intake. This allowed us to study the effects promoted by serotonergic stimulation or inhibition when the various pharmacological agents interact with many of the brain areas located in the vicinities of the ventricular system. It was not feasible to study the roles played by serotonin in any particular central site with this initial protocol. However, with the methodology used in the present study, we were able to investigate the putative roles played by specific serotonergic circuitries in the control of water and salt intake.

A complex interactive network of inhibitory and stimulatory inputs, involving different brain neurotransmitters and areas, controls water and salt intake (Johnson and Thunhorst, 1997). The amygdaloid complex, a region in which several serotonin receptor subtypes coexist (Hoyer et al., 2002), plays a crucial role in the control of water and salt intake. In fact, this structure, which is connected with both the prosencephalic and rhombencephalic areas involved in the control of hydrosaline balance, sends inputs to the higher integrative areas that induce the motor patterns related to the acquisition of water and sodium (Johnson et al., 1999).

As far as we know, the role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the MeA in the mechanisms controlling salt intake has yet clarified. Therefore, in the present study, we investigated the role of these receptors in water and salt intake in rats submitted to sodium depletion.

2. Results

The characteristic site of bilateral injections into the medial amygdala is shown in Fig. 1. Table 1 shows the results obtained with animals that received misplaced injections of *m*-CPBG and ondansetron. Table 2 presents the results obtained with animals that received misplaced injections of *m*-CPP and SDZ SER 082. The analysis of the data summarized in both Tables 1 and 2 indicates that no effect was observable when the drugs were injected into sites located outside the medial amygdala.

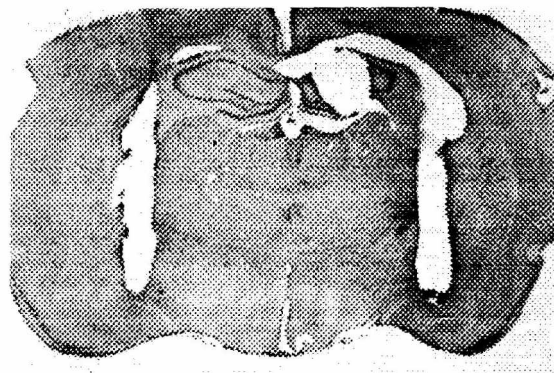


Fig. 1 – Photomicrograph of a coronal section showing the typical position of the cannula within the MeA.

Fig. 2A shows the effect of bilateral MeA injections of the selective 5-HT₃ receptor agonist *m*-CPBG, at different doses (40, 80 and 160 nmol), on salt intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated significant treatment and time main effects and significant treatment \times time interaction [$F(4,31) = 34.31$; $P < 0.0001$; $F(5,20) = 43.70$, $P < 0.0001$; $F(20,155) = 5.34$, $P < 0.0001$, respectively]. As expected, salt intake increased significantly in control, sodium-depleted animals receiving MeA injections of isotonic saline solution when compared with animals not submitted to sodium depletion also receiving injections of saline into the MeA. At the lowest dose used (40 nmol), the central administration of *m*-CPBG failed to modify the high salt intake observed in sodium-depleted rats. At the intermediate dose of 80 nmol, the central administration of *m*-CPBG significantly reduced salt intake in sodium-depleted animals in the first 45 min of the experiment. At the highest dose used, *m*-CPBG inhibited salt intake in sodium-depleted rats for the duration of the experiment.

Fig. 2B shows the effect of bilateral MeA injections of the selective 5-HT₃ receptor agonist *m*-CPBG, at different doses (40, 80 and 160 nmol), on water intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated no significant treatment and time main effects and no significant treatment \times time interaction [$F(4,31) = 1.63$; $P = 0.1914$; $F(5,20) = 1.74$, $P = 0.1290$; $F(20,155) = 1.09$, $P = 0.3667$, respectively]. As expected, water intake was negligible in sodium-depleted rats and remained unaltered by any of the treatments.

Fig. 3A displays the effect of the pretreatment with the selective 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron (160 nmol) on the antinatriorexic response induced by MeA injections of *m*-CPBG (160 nmol) in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated significant treatment and time main effects and significant treatment \times time interaction [$F(3,27) = 45.49$; $P < 0.0001$; $F(5,15) = 32.67$, $P < 0.0001$; $F(15,135) = 5.34$, $P < 0.0001$, respectively]. After two consecutive MeA injections of saline solution, sodium-depleted rats (sodium-depleted saline + saline) drank significantly more hypertonic saline than normonatremic controls also receiving central injections of saline (saline + saline). A significant decrease in salt intake similar to that observed in the previous experimental set was seen in sodium-depleted animals receiving injections of *m*-CPBG (160 nmol) but pretreated with saline (sodium-depleted saline + *m*-CPBG) into the amygdala. On

Table 1 - Cumulative water and salt intakes (ml/100 g body weight) in sodium-depleted animals receiving injections of *m*-CPBG and ondansetron, at various doses, in rats bearing cannulas in sites surrounding the MeA

Time Treatment	Intakes	15	30	45	60	90	120	ANOVA	
								Water	Salt
Saline (9)	Water	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	Factor A — drug F(3,30) = 1.57; P = 0.2182	Factor A — drug F(3,30) = 1.13; P = 0.3520
	Salt	3.1 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.8 ± 0.5	5.1 ± 0.5	5.6 ± 0.3	5.8 ± 0.3		
<i>m</i> -CPBG 160 nmol (8)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	Factor B — time F(5,15) = 8.45; P < 0.0001	Factor B — time F(5,15) = 82.57; P < 0.0001
	Salt	1.8 ± 0.6	3.3 ± 0.6	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.4	5.1 ± 0.5	5.3 ± 0.6		
<i>m</i> -CPBG 80 nmol (8)	Water	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	Factor A × Factor B F(15,150) = 2.31; P = 0.0056	Factor A × Factor B F(15,150) = 1.65; P = 0.0683
	Salt	1.8 ± 0.4	4.2 ± 0.4	5.1 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.8 ± 0.4	6.1 ± 0.3		
<i>m</i> -CPBG 40 nmol (9)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor A — drug F(3,19) = 0.490; P = 0.6937	Factor A — drug F(3,19) = 1.27; P = 0.3126
	Salt	2.4 ± 0.5	3.9 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.8 ± 0.3		
Saline (6)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	Factor B — time F(5,15) = 2.315; P = 0.0495	Factor B — time F(5,15) = 59.39; P < 0.0001
	Salt	1.3 ± 0.4	3.8 ± 0.6	4.5 ± 0.5	4.8 ± 0.5	5.2 ± 0.4	5.9 ± 0.1		
Ond 160 nmol (4)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor A × Factor B F(15,95) = 0.393; P = 0.9780	Factor A × Factor B F(15,95) = 1.96; P = 0.0262
	Salt	3.0 ± 0.3	4.7 ± 0.5	4.9 ± 0.5	5.0 ± 0.5	5.2 ± 0.4	5.2 ± 0.4		
Ond 80 nmol (9)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	Factor A × Factor B F(15,135) = 1.74, P = 0.0502, respectively]	Factor A × Factor B F(15,135) = 1.74, P = 0.0502, respectively]
	Salt	1.6 ± 0.4	2.9 ± 0.5	3.6 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.8 ± 0.4		
Ond 40 nmol (4)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	Factor A × Factor B F(15,95) = 0.393; P = 0.9780	Factor A × Factor B F(15,95) = 1.96; P = 0.0262
	Salt	1.8 ± 0.8	3.5 ± 0.6	3.9 ± 0.5	3.9 ± 0.5	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3		

Results are shown as mean ± SEM. There were no statistically significant differences among the groups. The number of animals used in each experimental set is indicated in the parenthesis.

the other hand, there was a significant blockade in the antinatriorexic effect of *m*-CPBG in animals receiving *m*-CPBG (160 nmol) but pretreated with 160 nmol of ondansetron (sodium-depleted ondansetron + *m*-CPBG).

Fig. 3B shows the effect of pretreatment with ondansetron (160 nmol) on water intake after injections of *m*-CPBG (160 nmol) into the amygdala in sodium-depleted rats.

Analysis of variance indicated no significant treatment main effects and no significant treatment × time interaction [F(3,27) = 2.03; P = 0.1327; F(5,15) = 3.54, P = 0.0048; F(15,135) = 1.74, P = 0.0502, respectively]. Here, as in the previous experiment, water intake was negligible in sodium-depleted rats and remained unchanged by any of the treatments.

Table 2 - Cumulative salt and water intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals receiving injections of *m*-GPP and SDZ SER 082, at various doses, in rats bearing cannulas in sites surrounding the MeA

Time Treatment	Intakes	15	30	45	60	90	120	ANOVA	
								Water	Salt
Saline (7)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor A — drug F(3,27) = 0.775; P = 0.5179	Factor A — drug F(3,27) = 0.575; P = 0.3662
	Salt	2.2 ± 0.5	3.4 ± 0.2	4.4 ± 0.5	4.9 ± 0.6	5.5 ± 0.4	5.6 ± 0.4		
<i>m</i> -CPP 160 nmol (8)	Water	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	Factor B — time F(5,15) = 2.221; P = 0.0557	Factor B — time F(5,15) = 71.976; P < 0.0001
	Salt	2.3 ± 0.5	3.6 ± 0.4	4.2 ± 0.4	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.3		
<i>m</i> -CPP 80 nmol (8)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor A × Factor B F(15,135) = 1.005; P = 0.4534	Factor A × Factor B F(15,135) = 0.0446; P = 0.9621
	Salt	2.6 ± 0.7	4.0 ± 0.7	4.2 ± 0.7	4.9 ± 0.4	5.3 ± 0.4	5.5 ± 0.5		
<i>m</i> -CPP 40 nmol (8)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor A — drug F(3,16) = 2.35; P = 0.1113	Factor A — drug F(3,16) = 0.819; P = 0.5020
	Salt	1.6 ± 0.4	3.1 ± 0.3	3.9 ± 0.4	4.4 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.8 ± 0.3		
Saline (7)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor B — time F(5,15) = 1.28; P = 0.2808	Factor B — time F(5,15) = 55.925; P < 0.0001
	Salt	1.5 ± 0.7	3.1 ± 0.8	3.8 ± 0.6	4.1 ± 0.5	4.1 ± 0.5	4.5 ± 0.4		
SDZ SER 160 nmol (8)	Water	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	Factor A × Factor B F(15,80) = 1.42; P = 0.1574	Factor A × Factor B F(15,80) = 0.958; P = 0.5066
	Salt	0.8 ± 0.4	2.6 ± 0.5	3.8 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.3		
SDZ SER 80 nmol (8)	Water	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	Factor A × Factor B F(15,80) = 1.42; P = 0.1574	Factor A × Factor B F(15,80) = 0.958; P = 0.5066
	Salt	0.8 ± 0.8	2.2 ± 1.0	3.1 ± 0.9	3.3 ± 0.9	3.9 ± 0.6	4.2 ± 0.4		
SDZ SER 40 nmol (8)	Water	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	Factor A × Factor B F(15,80) = 1.42; P = 0.1574	Factor A × Factor B F(15,80) = 0.958; P = 0.5066
	Salt	1.9 ± 1.4	4.6 ± 0.1	5.0 ± 0.5	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.3		

Results are shown as mean ± SEM. There were no statistically significant differences among the groups. The number of animals used in each experimental set is indicated in the parenthesis.

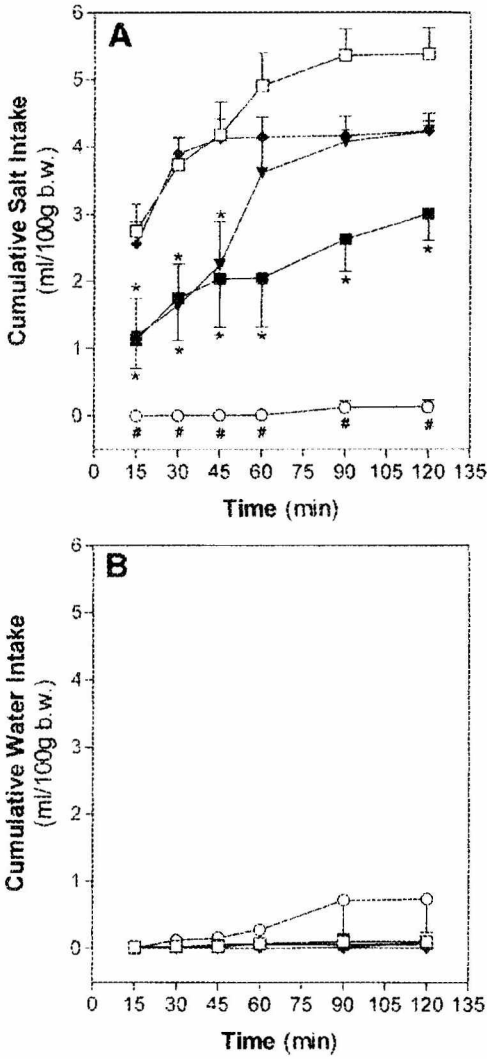


Fig. 2 - Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of *m*-CPBG, at various doses, into the MeA. The following groups are presented: saline (□; *n* = 07); *m*-CPBG 40 nmol/rat (◆; *n* = 07); *m*-CPBG 80 nmol/rat (▼; *n* = 07); *m*-CPBG 160 nmol/rat (■; *n* = 06). An additional control group of animals not submitted to sodium depletion and receiving injections of saline into the MeA is also shown (○; *n* = 09). Data are presented as mean ± SEM. Asterisks indicate a statistically significant difference (two-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; *P* < 0.05) when the distinct groups of animals are compared to control sodium-depleted animals receiving injections of saline into the MeA. # indicates a statistically significant difference when the group of rats not submitted to sodium depletion is compared to sodium depletion animals receiving saline. Each curve in the graph has been obtained from a naive group of animals.

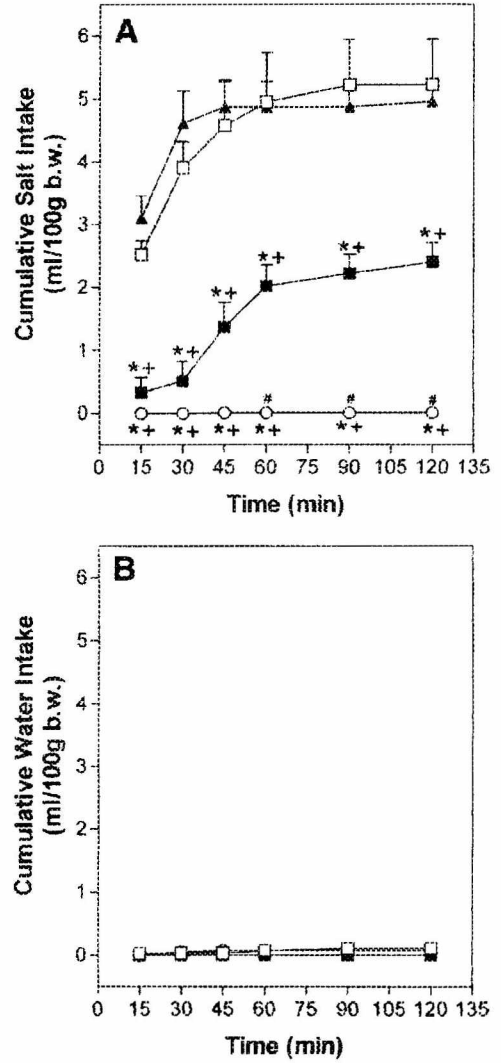


Fig. 3 - Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of *m*-CPBG (160 nmol) or saline into the MeA but pretreated with injections of ondansetron (160 nmol) or saline into the MeA. The following groups are presented: saline + saline (□; *n* = 07); saline + *m*-CPBG (■; *n* = 09); ondansetron + *m*-CPBG (▲; *n* = 7). An additional control group of animals not submitted to sodium depletion and receiving MeA injections of saline is also shown (○; *n* = 08). Data are presented as mean ± SEM. Asterisks indicate a statistically significant difference (two-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; *P* < 0.05) when the distinct groups of animals are compared to control sodium-depleted animals (saline). # indicates a statistically significant difference when the group of rats not submitted to sodium depletion is compared to sodium-depleted rats receiving saline + *m*-CPBG. + indicates a statistically significant difference when the groups of rats not submitted to sodium depletion receiving saline as treatment and as pretreatment and submitted to sodium depletion receiving *m*-CPBG but pretreated with saline are compared to the other groups. Each curve in the graph has been obtained from a naive group of animals.

Fig. 4A shows the effect of bilateral MeA injections of ondansetron alone (40, 80 and 160 nmol) on salt intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated significant treatment main effects and significant treatment × time interaction [*F*(4,29) = 53.07; *P* < 0.0001; *F*(5,20) = 47.98, *P* < 0.0001;

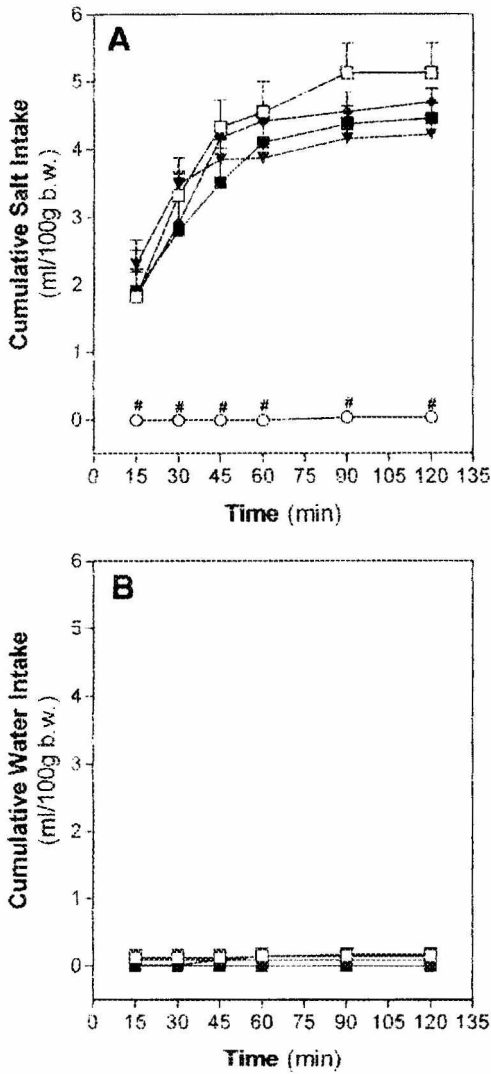


Fig. 4 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of ondansetron, at various doses, into the MeA. The following groups are presented: saline (\square ; $n = 06$); ondansetron 40 nmol/rat (\blacklozenge ; $n = 06$); ondansetron 80 nmol/rat (\blacktriangledown ; $n = 06$); ondansetron 160 nmol/rat (\blacksquare ; $n = 07$). An additional control group of animals not submitted to sodium depletion and receiving injections of saline into the MeA is also shown (\circ ; $n = 09$). Data are presented as mean \pm SEM. # indicates a statistically significant difference (two-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $P < 0.05$) when the group of animals not submitted to sodium depletion is compared to all other groups. Each curve in the graph has been obtained from a naive group of animals.

$F(20,145) = 4.54$, $P < 0.0001$, respectively]. Here, as in the previous experimental sets, there was a significantly greater salt intake in sodium-depleted rats receiving bilateral MeA injections of isotonic saline solution when compared to normonatremic rats also receiving central administration of isotonic saline solution. At all doses used, ondansetron failed to modify the high salt intake exhibited by sodium-depleted rats.

Fig. 4B shows the effect of treatment with ondansetron alone at various doses (40, 80 and 160 nmol) on water intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated no significant treatment main effects but a significant treatment \times time interaction [$F(4,29) = 0.74$; $P = 0.5691$; $F(5,20) = 5.37$, $P = 0.0001$; $F(20,145) = 3.36$, $P < 0.0001$, respectively]. Here, as in the previous experiment, water intake was negligible in sodium-depleted rats and remained unaltered by any of the treatments.

Fig. 5A shows the effect of bilateral MeA injections of the selective 5-HT_{2C} receptor agonist *m*-CPP, at different doses (40, 80 and 160 nmol), on salt intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated significant treatment and time main effects and significant treatment \times time interaction [$F(4,29) = 64.90$; $P < 0.0001$; $F(5,20) = 50.82$, $P < 0.0001$; $F(20,145) = 5.30$, $P < 0.0001$, respectively]. As expected, salt intake increased significantly in sodium-depleted control animals receiving MeA injections of isotonic saline solution when compared with animals not submitted to sodium depletion also receiving injections of saline into the MeA. Bilateral injections of the selective 5-HT_{2C} receptor agonist *m*-CPP into the MeA failed to modify the high salt intake presented by sodium-depleted rats at any of the doses used.

Fig. 5B shows the effect of bilateral MeA injections of the selective 5-HT_{2C} receptor agonist *m*-CPP, at different doses (40, 80 and 160 nmol), on water intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated no significant treatment and time main effects and no significant treatment \times time interaction [$F(4,29) = 0.877$; $P = 0.4895$; $F(5,20) = 2.325$, $P = 0.0458$; $F(20,145) = 0.625$, $P = 0.8891$, respectively]. As expected, water intake was negligible in sodium-depleted rats and was not modified by any of the treatments.

Fig. 6A shows the effect of bilateral MeA injections of the selective 5-HT_{2C} antagonist SDZ SER 082 alone (40, 80 and 160 nmol) on salt intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated significant treatment main effects and significant treatment \times time interaction [$F(4,33) = 47.27$; $P < 0.0001$; $F(5,20) = 69.25$, $P < 0.0001$; $F(20,165) = 7.58$, $P < 0.0001$, respectively]. Here, as in the previous experimental sets, there was a significant increase in salt intake in sodium-depleted rats receiving bilateral MeA injections of isotonic saline solution when compared to normonatremic rats also receiving central administration of isotonic saline solution. At the lowest dose used, SDZ SER 082 failed to modify the high salt intake of sodium-depleted rats. At the intermediate dose used, SDZ SER 082 significantly decreased salt intake in sodium-depleted rats in the first 90 min of the experiment. At the highest dose injected, SDZ SER 082 significantly reduced salt intake in sodium-depleted rats for the entire duration of the experiment.

Fig. 6B shows the effect of treatment with SDZ SER 082 alone at various doses (40, 80 and 160 nmol) on water intake in sodium-depleted rats. Analysis of variance indicated no significant treatment main effects and no significant treatment \times time interaction [$F(4,33) = 0.62$; $P = 0.6481$; $F(5,20) = 4.44$, $P = 0.0008$; $F(20,165) = 0.905$, $P < 0.5807$, respectively]. Here, as in the previous experimental set, water intake was negligible in sodium-depleted rats and was not altered by any of the treatments.

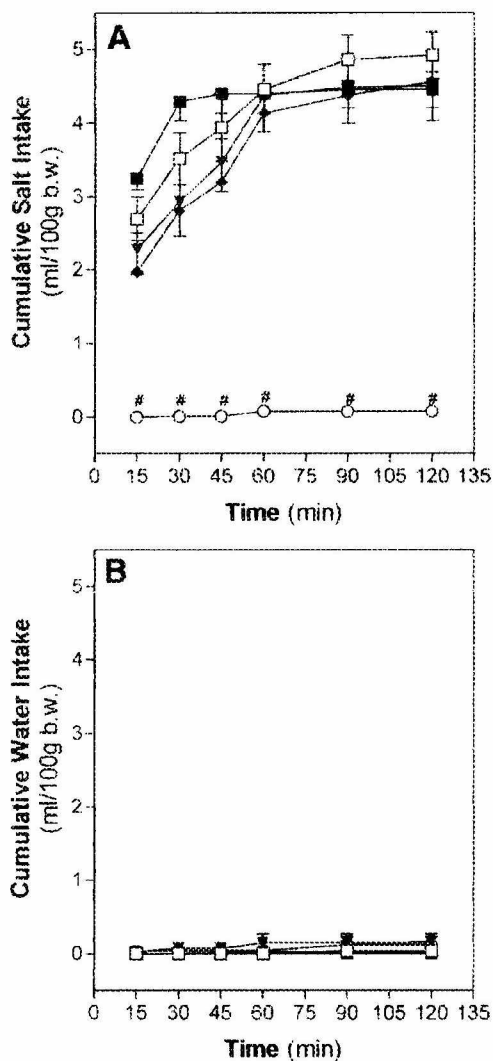


Fig. 5 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of *m*-CPP, at various doses, into the MeA. The following groups are presented: saline (□; *n* = 06); *m*-CPP 40 nmol/rat (◆; *n* = 06); *m*-CPP 80 nmol/rat (▼; *n* = 06); *m*-CPP 160 nmol/rat (■; *n* = 06). An additional control group of animals not submitted to sodium depletion and receiving injections of saline into the MeA is also shown (○; *n* = 09). Data are presented as mean ± SEM. # indicates a statistically significant difference (two-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $P < 0.05$) when the group of animals not submitted to sodium depletion is compared to all other groups. Each curve in the graph has been obtained from a naive group of animals.

Table 3 shows the effect of bilateral injections of ondansetron (160 nmol) and *m*-CPP (160 nmol) into the MeA on water and salt intake in nonnatremic animals. In this condition, the administration of these compounds failed to produce any modification in those parameters compared to saline-treated controls.

Fig. 7A depicts the results of the avoidance test performed to verify whether the antinatriorexetic effects of *m*-CPBG could be attributed to any "illness-like" side effects. Analysis of

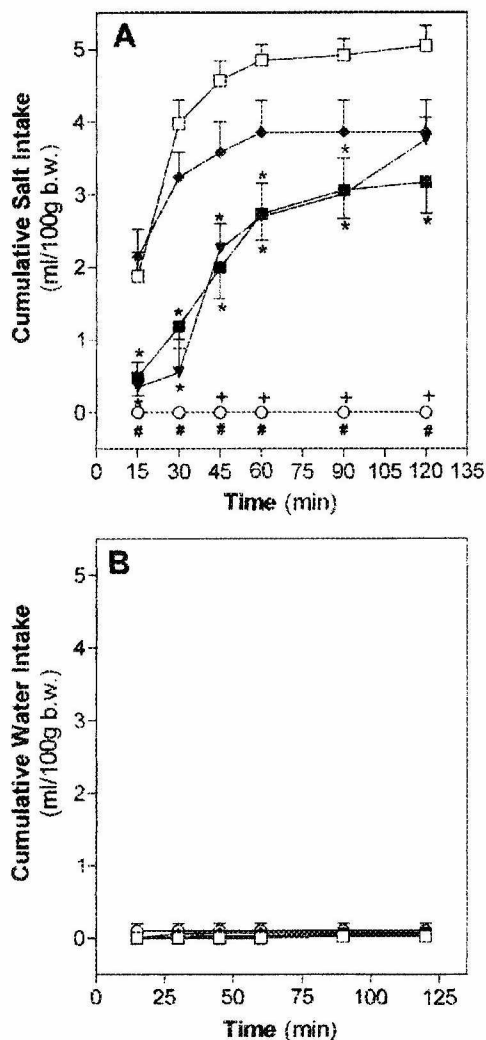


Fig. 6 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of SDZ SER 082, at various doses, into the MeA. The following groups are presented: saline (□; *n* = 09); SDZ SER 082 40 nmol/rat (◆; *n* = 07); SDZ SER 082 80 nmol/rat (▼; *n* = 06); SDZ SER 082 160 nmol/rat (■; *n* = 05). An additional control group of animals not submitted to sodium depletion and receiving injections of saline into the MeA is also shown (○; *n* = 08). Data are presented as mean ± SEM. Asterisks indicate a statistically significant difference (two-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $P < 0.05$) when the distinct groups of sodium-depleted animals are compared to control sodium-depleted animals receiving injections of saline into the MeA. # indicates a statistically significant difference when the group of rats not submitted to sodium depletion is compared to sodium depletion animals receiving saline or SDZ SER 082 at the dose of 40 nmol. + indicates a statistically significant difference when the group of rats not submitted to sodium depletion receiving injections of saline into MeA was compared to the groups of sodium-depleted animals receiving MeA injections of SDZ SER 082 at the doses of 80 and 160 nmol. Each curve in the graph has been obtained from a naive group of animals.

Table 3 – Cumulative salt and water intakes (ml/100 g body weight) of sodium-repleted animals receiving bilateral injections of *m*-CPP and ondansetron at various doses into the MeA

Time	Intakes	15	30	45	60	90	120	ANOVA			
								Water	Salt		
Saline (6)	Water	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	Factor A — drug F(1,14) = 1.48; P = 0.2435	Factor A — drug F(1,14) = 0.00; P = 1.000		
	Salt	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0				
	Ond 160 nmol (4)	Water	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	Factor B — time F(5,5) = 14.48; P < 0.0001 Factor A × Factor B F(5,70) = 13.02; P < 0.0001	Factor B — time F(5,5) = 0.00; P = 1.000 Factor A × Factor B F(5,70) = 0.00; P = 1.000	
		Salt	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0			
Saline (9)	Water	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	Factor A — drug F(1,14) = 0.0724; P = 0.7918			Factor A — drug F(1,14) = 0.127; P = 0.7272
	Salt	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1				
	<i>m</i> -CPP 160 nmol (8)	Water	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	Factor B — time F(5,5) = 7.4647; P < 0.0001 Factor A × Factor B F(5,70) = 3.6307; P = 0.0056	Factor B — time F(5,5) = 2.333; P = 0.0510 Factor A × Factor B F(5,70) = 0.919; P = 0.4738	
		Salt	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1			

Results are shown as mean ± SEM. There were no statistically significant differences among the groups. The number of animals used in each experimental set is indicated in the parenthesis.

variance indicated a significant treatment difference between the groups [$F(2,18) = 27.2$; $P < 0.0001$]. As expected, there was a significant reduction in saccharin intake on the following day in animals establishing a previous association between lithium chloride and saccharin as compared to saline-treated controls. In contrast, the previous association of *m*-CPBG with saccharin failed to produce any significant reduction in saccharin intake the next day, which suggests that it is unlikely that illness-like effects could explain the results observed here after the injection of these compounds into the medial amygdala.

Fig. 7B shows the results of the dessert test. Here, saccharin intake was similar in saline-treated control animals and animals receiving bilateral MeA injections of *m*-CPBG (160 nmol), indicating that the hedonic behavior represented by the preferential intake of a "tasty" solution was not modified by central injections of *m*-CPBG ($t = 0.303$; $df = 13.0$; $P = 0.7669$).

Fig. 7C shows the result of the avoidance test performed to verify whether the antinatriorexic effects of SDZ SER 082 could be ascribed to some "illness-like" side effects. Analysis of variance indicated a significant treatment difference between the groups [$F(2,25) = 80.8$; $P < 0.0001$]. In animals establishing a previous association between lithium chloride and saccharin, there was a significant decrease in saccharin intake on the following day when compared to saline-treated controls. Conversely, the previous association of SDZ SER 082 with saccharin was unable to modify saccharin intake the next day, indicating that the results observed here after the injection of this compound into the medial amygdala are not due to some illness-like effect.

Fig. 7D presents the results of the dessert test. In this case, saccharin intake was comparable in saline-treated control animals and animals receiving bilateral MeA injections of SDZ

SER 082 (160 nmol), indicating that the hedonic behavior represented by the preferential intake of a "tasty" solution was not modified by central injections of SDZ SER 082 ($t = 0.794$; $df = 14.0$; $P = 0.4404$).

3. Discussion

The present data show that the pharmacological stimulation of 5-HT₃ receptors located in the medial amygdala by the selective agonist *m*-CPBG significantly decreases salt intake in sodium-depleted rats. This antinatriorexic effect of *m*-CPBG seems to be due to its action on 5-HT₃ receptors since it is abolished by pretreatment with the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron. In sodium-depleted animals, a 5-HT₃-receptor-dependent inhibitory drive on salt intake seems to be absent since treatment with ondansetron alone failed to modify salt intake in this group of animals. 5-HT₃ receptors located in the medial amygdala exert neither inhibitory nor stimulatory drive on salt intake in normonatremic rats (animals not submitted to sodium depletion) since injections of ondansetron into the MeA also failed to modify salt intake in this group of animals. The present data also show that pharmacological administration of the selective 5-HT_{2C} receptor agonist *m*-CPP was unable to modify salt intake in sodium-depleted rats. However, a 5-HT_{2C}-receptor-dependent stimulatory drive on salt intake seems to exist in sodium-depleted rats since the treatment of animals in this condition with the selective 5-HT_{2C} receptor antagonist SDZ SER 082 significantly blunted salt intake in this group of animals. In addition, the pharmacological activation of 5-HT_{2C} receptors located within the MeA failed to induce any modification in salt intake in rats not submitted to sodium depletion. The inhibitory effects of *m*-CPBG and SDZ SER 082 on salt intake cannot be attributed to sickness-like effects induced

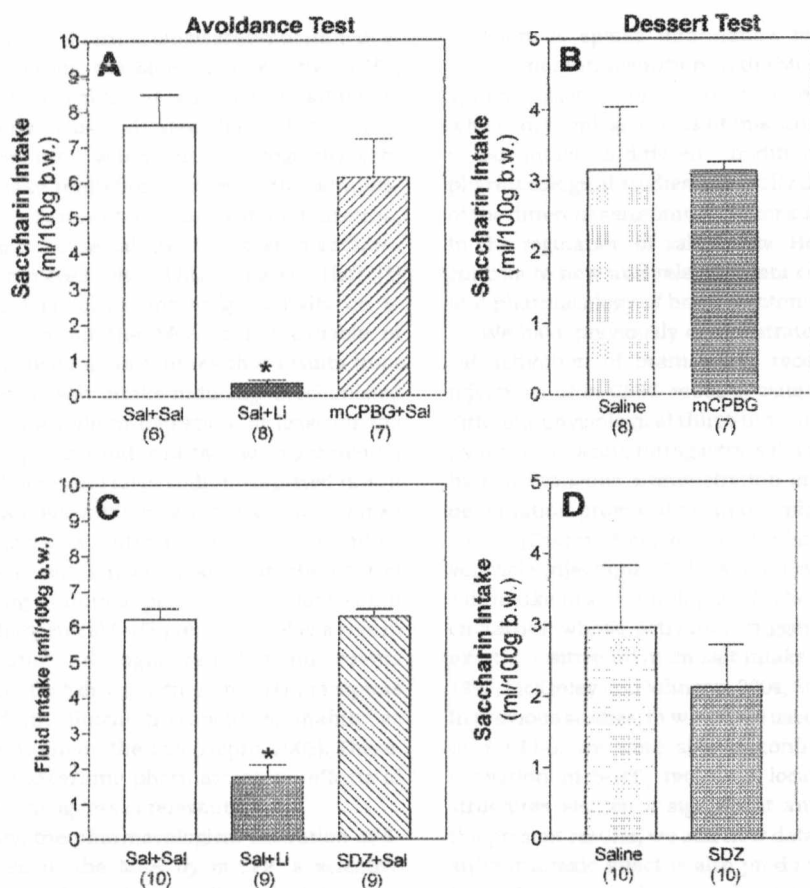


Fig. 7 – Avoidance tests: saccharin solution (0.25%) consumption (ml/100 g body weight) over 15 min at a second offering in animals receiving injections of *m*-CPBG (160 nmol) or saline into the MeA (A) and SDZ SER 082 (160 nmol) or saline (C). The sequence of injections used during the first offering of saccharin and the number of animals used are indicated in the figure. The first injection was into the MeA and the second via intraperitoneal route. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.001$) between that particular group and controls (saline + saline). **Dessert tests:** saccharin intake (ml/100 g body weight) during 2 h in the test cage in rats receiving MeA injections of isotonic saline solution (controls), *m*-CPBG at the dose of 160 nmol (B) and SDZ SER 082 at the dose of 160 nmol (D). The treatment received by each group and the number of animals used are indicated in the graph. There was no significant difference in the ingestion of saccharin between groups treated with saline and the serotonergic agents tested. Data are expressed as mean \pm SEM.

by these compounds since aversion tests excluded this possibility. Furthermore, the reduction in salt intake induced by *m*-CPBG and SDZ SER 082 appears to be a selective antinatriorexetic effect, and not a general inhibition of ingestive behaviors, since the intake of a palatable solution of saccharin remained unaffected when these compounds were bilaterally injected into the medial amygdala.

The amygdala receives many inputs from other prosencephalic regions involved in the regulation of sodium appetite and thirst, such as the subfornical organ (SFO) and the anteroventral third ventricle region (AV3V), mainly through angiotensinergic pathways (Johnson et al., 1999). The amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis (BST) may have had a common ontogenic origin, and this led to the concept of an extended amygdala, formed by several structures including the central and the medial amygdala as well as their extensions to the lateral and medial parts of the BST (Johnson et al., 1999).

The extended amygdala is strongly involved in the control of sodium appetite. Indeed, surgical lesions of the MeA inhibit salt intake induced by mineralocorticoid administration (Nitabach et al., 1989; Schulkin et al., 1989) and the same type of lesions in the central amygdala (CeA) as well as in the BST inhibit sodium appetite in several experimental protocols (Galaverna et al., 1991; Zardetto-Smith et al., 1994). Immunocytochemical studies indicate that 5-HT₃ receptors are extensively located throughout the rat brain (Bloom and Morales, 1998), including some areas related to the control of water intake and salt appetite, such as the hypothalamus, the amygdaloid complex and the septal region (Tecott et al., 1993). 5-HT_{2C} receptor, a serotonin receptor subtype that seems to exist only in the central nervous system, is ubiquitously found, being present in limbic areas that participate in the mechanisms controlling water intake (Barnes and Sharp, 1999; Clement et al., 2000; Giorgetti and Tecott, 2004).

In the present study, the pharmacological stimulation of 5-HT₃ receptors located within the MeA by a selective 5-HT₃ receptor agonist leads to a significant reduction in salt intake in sodium-depleted rats. This indicates that a local 5-HT₃ receptor-dependent circuitry, when pharmacologically activated, leads to salt intake inhibition. However, the administration of a selective 5-HT₃ receptor antagonist, ondansetron, into the MeA failed to increase salt intake either in sodium-depleted or sodium-repleted rats. This suggests that (1) suppression of the endogenous serotonergic activity on 5-HT₃ receptors located within the MeA is not capable of modifying the high intensity of salt intake that results from the activation of several salt-intake-inducing mechanisms normally triggered during sodium depletion, at least for the high level of sodium appetite induced by the experimental protocol we have used here, and (2) in sodium-repleted rats, it seems that an endogenous inhibitory drive on salt intake depending on the functional integrity of 5-HT₃ receptors located into the MeA is not a major feature in the central mechanisms controlling sodium appetite in rats. However, it is important to note that central 5-HT₃ receptors play a role in anxiolytic, antipsychotic and cognitive-enhancing events (Farber et al., 2004) and that drugs acting on 5-HT₃ receptors are extensively used in clinical therapeutics, mainly as antiemetic agents during chemotherapy (Aapro, 2005). Therefore, any information concerning pharmacological effects of that class of therapeutical agents is relevant.

In the present study, the pharmacological activation of 5-HT_{2C} receptors situated in the MeA by *m*-CPP, a selective agonist, failed to modify salt intake in sodium-depleted rats. Conversely, the blockade of 5-HT_{2C} receptors located in the MeA by the selective 5-HT_{2C} receptor antagonist SDZ SER 082 significantly reduced salt intake in sodium-depleted animals. This indicates that the endogenous serotonergic activity on 5-HT_{2C} receptors within the MeA is essential for the full expression of sodium appetite in sodium-depleted rats. The fact that the pharmacological activation of 5-HT_{2C} receptors located within the MeA did not produce any further increase in salt intake in sodium-depleted rats may simply mean that, during sodium depletion, the other salt intake-inducing mechanism(s) normally activated under this condition are able to promote a maximal salt intake response.

The pharmacological agents used in the present study were adequate tools for clarifying the questions raised here. *m*-CPBG is a well-documented 5-HT₃ receptor agonist (Sepúlveda et al., 1991; Van Hooft and Vijverberg, 1997), ondansetron is a well-recognized 5-HT₃ receptor antagonist (Gaster and King, 1997), *m*-CPP is a selective 5-HT_{2C} agonist (Simansky et al., 2004) and SDZ SER 082 is a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist (Hernandez et al., 2003). *m*-CPP may display some affinity for other serotonin receptors. However, it binds to the 5-HT_{2C} receptor with much greater affinity than to any other serotonin receptor subtype and, in the absence of a drug that could be considered a strictly selective 5-HT_{2C} agonist, *m*-CPP is considered the prototypical pharmacological tool for studying 5-HT_{2C} function (Hajos et al., 2003; Jakus et al., 2003; Mitchell et al., 2003; Simansky et al., 2004). Therefore, the results obtained in the present study have to be considered a consequence of *m*-CPP-induced 5-HT_{2C} receptor stimulation.

There is sparse information regarding the role of the various neurotransmitters in the MeA in the control of sodium appetite. Most studies have used experimental protocols in which anatomical lesions of this structure induced alterations in salt intake in different conditions. We failed to find any pharmacological studies especially designed to clarify the role of the different serotonin receptor subtypes located in the MeA in the regulation of salt intake. Hence, the present results contribute new and relevant data concerning the physiology and pharmacology of brain serotonin receptors.

We have previously demonstrated that the pharmacological activation of brain 5-HT₃ receptors by third ventricle injections of *m*-CPBG reduces water intake induced by three different physiological thirst-inducing stimuli: hyperosmolarity due to an acute intragastric salt load, hypovolemia induced by subcutaneous administration of polyethylene glycol and dehydration provoked by an overnight period of water deprivation (Castro et al., 2002b). We have also shown that third ventricle injections of the same compound (*m*-CPBG) inhibit salt intake in sodium-depleted rats (Castro et al., 2003). Brain circuitries whose activation triggers water intake normally exert a positive drive on salt intake (Johnson and Thunhorst, 1997; McKinley and Johnson, 2004; Stricker and Verbalis, 1990). In previous studies, in which we used third ventricle injections of *m*-CPBG, we were able to confirm that pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located at circumventricular structures elicited a significant antinatriorexic effect. With the present results, we add new data indicating that the same antinatriorexic effect is also produced when 5-HT₃ receptors located in a particular central region involved in the regulation of water and salt intake are activated.

In a previous study, we demonstrated that third ventricle injections of *m*-CPP, the same 5-HT_{2B/2C} receptor agonist used in the present study, promoted a dose-dependent reduction in salt intake in sodium-depleted rats (Castro et al., 2003). Data reported here indicate that 5-HT_{2C} receptors located within the MeA are essential for the full expression of salt intake in sodium-depleted rats since the pharmacological blockade of these receptors reduced sodium appetite induced by sodium depletion. The large family of serotonin receptors operates multiple functions in the brain, and the activation of the same receptor subtype may generate distinct effects depending on the central area in which the receptor is located (Uphouse, 1997). Considering both our previous data and the data presented here, it would appear that the activation of 5-HT_{2C} receptors located in circumventricular areas reduces salt intake, whereas the activation of these receptors in the MeA is a necessary step to the increase in sodium appetite in sodium-depleted rats.

The inhibition of ingestive behaviors observed in experimental protocols in animals may be due to actions on brain sites induced by the specific measures employed in those protocols. On the other hand, such inhibitory actions may be the result of aversive effects associated with those procedures. We have previously shown that third ventricle injections of both *m*-CPBG and *m*-CPP do not generate aversive effects (Castro et al., 2002a,b). In the present paper, we demonstrate that injections into the MeA of the compounds that induced a reduction in sodium appetite (*m*-CPBG and SDZ SER 082) do not produce aversive effects that could explain the reduction in

salt intake observed here. We have also shown that both drugs failed to disrupt hedonic ingestive behaviors since they do not modify the ingestion of saccharin offered as a dessert meal. This clearly indicates that the drugs are specifically inhibiting salt intake instead of producing a general inhibition of all ingestive behaviors.

In the present study, no effect was seen when the drugs were injected into sites located outside the medial amygdala. This clearly points out that the effects shown here are specifically due to the pharmacological manipulation of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located in the MeA.

In summary, the present data suggest that the pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located within the MeA inhibits salt intake in sodium-depleted rats and that, in this same brain region, the functional integrity of 5-HT_{2C} receptors is required for the full expression of sodium appetite in sodium-depleted rats.

4. Experimental procedure

4.1. Animals

In the present study, we used male Wistar rats weighing 280 ± 20 g. They were housed in individual cages and kept under controlled light (lights on from 7 AM to 7 PM) and temperature (22–24 °C) conditions. In all experimental protocols, central injections of saline (controls) and each individual dose of the serotonergic agents were tested in a naive group of animals. All experiments were conducted between 7 AM and 12 PM. The experimental protocols were conducted according to the regulations established by the National Institutes of Health (USA) and were approved by a local committee regulating the use of animals in research laboratories.

4.2. Surgical procedures

Cannulation of the MeA was performed under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg i.p.). Five days before the experimental sessions, a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) was used to implant a 15 mm, 28-gauge, stainless steel cannula. The following coordinates were used: anteroposterior = 2.8 mm behind bregma; lateral = 6.8 mm; vertical = 8.6 mm below the skull. The animals were placed in the stereotaxic apparatus with their heads in the horizontal position. The cannulas were cemented to the skull bone with dental acrylic, and an obturator (22-gauge) was provided to avoid obstruction. After surgery, the animals in all the study groups had free access to two different bottles, one containing distilled water and the other containing 1.5% saline solution. In order to minimize the stress of the experimental maneuvers, the animals were handled every day. At the end of the experiments, the animals were anesthetized with ether and submitted to transcardiac perfusion with isotonic saline solution followed by 10% formalin. The brains were then removed and fixed in 10% formalin. They were frozen and cut into 40 μ m sections. To confirm the injection sites in relation to the MeA, the slices were stained with cresyl violet and analyzed by light microscope. Data from animals in which the cannulas were strictly inside the medial amygdala were

analyzed and taken into consideration for the interpretation of the effects of the pharmacological agents on water and salt intake. A special table condenses the data from animals in which the cannulas were off target.

4.3. Drugs and microinjections

The following drugs were used: *m*-chlorophenylbiguanide hydrochloride (1-(3-chlorophenyl)biguanide; *m*-CPBG), a selective 5-HT₃ agonist (Sepúlveda et al., 1991; Van Hooft and Vijverberg, 1997), *m*-CPP (1-(3-Chlorophenyl)piperazine), a 5-HT₂ agonist (Simansky et al., 2004), and SDZ SER 082 [(+)-cis-4,5,7a,8,9,10,11,11a-octahydro-7H-10-methylindolo[1,7-bc] (Barnes and Sharp, 1999; Castro et al., 2002a)-naphthyridine], a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist (Hernandez et al., 2003), were all purchased from Tocris Cookson, Inc. Ballwin, MO. Ondansetron, a specific 5-HT₃ antagonist, was kindly donated by GlaxoWellcome Research and Development Limited, UK (Gaster and King, 1997). Lithium chloride was acquired from Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO. Furosemide, a loop diuretic, was purchased from Aventis Pharma Ltd., São Paulo, Brazil. Central injections were performed using a Hamilton microsyringe connected to a Myzzy-Slide-Pak needle through polyethylene tubing. The injectors we have used extended 1 mm beyond the end of the guide cannulas. All drugs were dissolved in isotonic saline solution. The final volume injected was 0.5 μ l over a period of 60 s.

4.4. Sodium depletion

To induce sodium depletion, the animals were submitted to an experimental protocol in which they had simultaneous access to two bottles (distilled water and 1.5% saline solution) and standard rat chow from the period immediately after MeA cannulation until the moment of furosemide administration. To provoke the renal sodium loss that induces sodium depletion, the rats received a subcutaneous injection of furosemide (20 mg/kg) 24 h prior to the experimental sessions. Access to 1.5% saline ceased immediately after the furosemide injection. From that moment on, the animals continued to have free access to distilled water, and normal rat chow was replaced by a low sodium diet (0.001% Na⁺ and 0.33% K⁺). Control animals not submitted to sodium depletion received subcutaneous injections of isotonic saline solution instead of furosemide. We have previously shown that furosemide administration, at the dose used here, effectively increases urine output and renal sodium excretion and produces hyponatremia (Castro et al., 2003). To test the participation of central 5-HT_{2C} and 5-HT₃ receptors in water and salt intake in sodium-depleted rats, different groups of sodium-depleted animals received bilateral injections of the serotonergic agents at different doses into the MeA. Sodium-depleted control animals received injections of isotonic saline solution into this same area. The bottles containing 1.5% saline solution were reintroduced into the cages 30 min after the injections into the MeA. The first measurement of fluid intake was recorded 15 min after this and measurements continued for the next 120 min. All groups were also compared to a control group of normonatremic animals.

4.5. Avoidance test

An avoidance test was carried out to verify whether the central administration of the serotonergic agents *m*-CPBG and SDZ SER 082 was devoid of non-specific, inhibitory, "illness-like" effects on water intake. An experimental protocol based on the original design proposed by Nachman (1970) was adopted. This protocol uses a temporal association between the novel taste of a 0.25% saccharin solution and the distress induced by lithium chloride administration. Five days after the cannulation of the MeA, the animals had their access to water restricted to 15 min/day (between 12 and 12:15 PM) for 4 consecutive days. Under these conditions, rats drank water rapidly and reliably. On the fifth day, they were divided into 4 different groups that, after being submitted to the different pharmacological protocols, had access to bottles containing saccharin (no water was offered on this day). The first group (controls) received two consecutive injections of isotonic saline solution, one immediately following the other, the first being intraperitoneal and the second into the MeA. In the second group of animals, 0.15 M lithium chloride intraperitoneal injections (0.6% b.w.) were followed by injections of isotonic saline solution into the MeA. In this group, the lithium-induced, illness-like effects, a condition that generally disrupts ingestive behaviors in rats, were associated with the novel taste of saccharin. The third and the fourth groups of animals received intraperitoneal injections of saline solution in the same volume used in the previous group followed by injections of *m*-CPBG (third group) or SDZ SER 082 (fourth group). Both drugs were injected at the dose of 160 nmol. In these groups of animals, we investigated whether the administration of the serotonergic agents *m*-CPBG and SDZ SER 082 into the MeA provokes any degree of discomfort leading to a general reduction in ingestive behavior that the animals could associate with the novel taste of saccharin. On the sixth day, at the same time that the bottles had been available on the previous days (12 to 12:15 PM), saccharin-containing bottles were placed in all cages and the amount ingested recorded. No drugs were injected on this day.

4.6. Dessert test

To investigate whether the serotonergic agents used in the present study were able to modify water and salt intake through a non-specific general inhibition of the central nervous system or through a locomotor deficit, we investigated the effect of their injection into the MeA on the intake of 0.1% saccharin solution, a well-established example of hedonic behavior in rats (Johnson and Schwob, 1975). In this experiment, after the cannulation of MeA, two different groups of animals, kept in the usual individual cages where the only fluid available was water, were transferred (for 2 h each day for seven consecutive days) to a different cage (the test cage) in which two bottles, one containing water and the other containing a 0.1% saccharin solution, were accessible. After this period of training, two different groups of fluid-deprived animals received injections of *m*-CPBG (160 nmol), SDZ SER 082 (160 nmol) or saline (controls) into the MeA, 30 min before being transferred to the test cage. The intake of saccharin was then recorded during the following 120 min.

4.7. Statistical analysis

A computer software package (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, San Rafael, CA) was used to carry out two-way analysis of variance for repeated measures. The post hoc Student–Newman–Keuls test was used for comparison of each treatment with its corresponding time in the control groups. One-way ANOVA was used to analyze the data resulting from the avoidance test. Data resulting from the dessert test were analyzed using Student's *t* test. Data are presented as mean \pm SEM. The effects were considered significantly different when $P < 0.05$.

Acknowledgments

We are grateful to Mr. Vanilson Souza and Mr. José de Souza for their skillful technical assistance. The present work was supported by grants provided by The Brazilian Council of Research (CNPq), grant numbers 300.915/2003-9 and 300.943/2003-2, and by The Financial Agency for the Support of Research of the State of Bahia (FAPESB). Carla Luz received financial support from the State University of Southwest Bahia.

REFERENCES

- Aapro, M., 2005. 5-HT₃-receptor antagonists in the management of nausea and vomiting in cancer and cancer treatment. *Oncology* 69, 97–109.
- Barnes, N.M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.
- Bloom, F.E., Morales, M., 1998. The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders. *Neurochem. Res.* 23, 653–659.
- Castro, L., De Castro e Silva, E., Lima, A.K.S., Souza, F.S., Maldonado, I., Macedo, D.F., Ferreira, M.G., Santamaria, G.F., Bandeira, I.P.V., Amor, A.L.M., Carvalho, F.L.Q., Rocha Jr., M.A., Oliveira, I.R., Fregoneze, J.B., 2000. Central 5-HT₄ receptors and drinking behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 443–448.
- Castro, L., Maldonado, I., Campos, I., Varjão, B., Ângelo, A.L., Athanzio, R.A., Barbeta, M.C., Ramos, A.C., Fregoneze, J.B., De Castro e Silva, E., 2002a. Central administration of *m*-CPP, a serotonin 5-HT_{2B/2C} agonist, decreases water intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 891–898.
- Castro, L., Varjão, B., Maldonado, I., Campos, I., Duque, B., Fregoneze, J.B., Oliveira, I.R., De Castro e Silva, E., 2002b. Central 5-HT₃ receptors and water intake in rats. *Physiol. Behav.* 77, 349–359.
- Castro, L., Athanzio, R., Barbeta, M., Ramos, A.C., Ângelo, A.L., Campos, I., Varjão, B., Ferreira, H.S., Fregoneze, J.B., De Castro e Silva, E., 2003. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res.* 981, 151–159.
- Clement, D.A., Punhani, T., Duxon, M.S., Blackburn, T.P., Fone, K.G.F., 2000. Immunohistochemical localization of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology* 39, 123–132.
- De Castro e Silva, E., Sarmiento, C., Nascimento, T.A., Luz, C.P., Soares, T., Marinho, A., Cunha, M., Bulcão, C., De Oliveira, I.R., Fregoneze, J.B., 1997. Effect of third ventricle administration of 1-694,247, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on water intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 749–754.
- Farber, L., Haus, U., Saphth, M., Drechsler, S., 2004. Physiology and

- pathophysiology of the 5-HT₃ receptor. *Scand. J. Rheumatol.* **33**, 2–8.
- Galaverna, O., De Luca, L.A., Schulkin, J., Yao, S.Z., Epstein, A.N., 1991. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull.* **28**, 89–98.
- Gaster, L.M., King, F.D., 1997. Serotonin 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor antagonists. *Med. Res. Rev.* **17**, 163–214.
- Giorgetti, M., Tecott, L.H., 2004. Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur. J. Pharmacol.* **488**, 1–9.
- Hajos, M., Hoffmann, W.E., Weaver, R.J., 2003. Regulation of septo-hippocampal activity by 5-hydroxytryptamine(2C) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 605–615.
- Halford, J.C., Harrold, J.A., Lawton, C.L., Blundell, E., 2005. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr. Drug Targets* (6), 201–213.
- Hernandez, M., Barahona, M.V., Simonsen, U., Recio, P., Rivera, L., Martinez, A.C., Garcia-Sacristan, A., Orensanz, L.M., Prieto, D., 2003. Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in the pig isolated intravesical ureter. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 137–144.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533–554.
- Jakus, R., Graf, M., Juhasz, G., Gerber, K., Levay, G., Halasz, P., Bagdy, G., 2003. 5-HT_{2C} receptors inhibit and 5-HT_{1A} receptors activate the generation of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy. *Exp. Neurol.* **184**, 964–972.
- Johnson, A.K., Schwob, J.E., 1975. Cephalic angiotensin receptors mediating drinking to systemic angiotensin II. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **3**, 1077–1084.
- Johnson, A.K., Thunhorst, R.L., 1997. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front. Neuroendocrinol.* **18**, 292–353.
- Johnson, A.K., de Olmos, J., Pastuskovas, C.V., Zardetto-Smith, A.M., Vivas, L., 1999. The extended amygdala and salt appetite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **877**, 258–280.
- McKinley, M.J., Johnson, A.K., 2004. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol. Sci.* **19**, 1–6.
- Meguid, M.M., Fetissov, S.O., Varma, M., Sato, T., Zhang, L., Laviano, A., Rossi-Fanelli, F., 2000. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* **16**, 843–857.
- Mitchell, P.J., Fairhall, S.J., Fletcher, A., Redfern, P.H., 2003. Effects of single and repeated electroconvulsive shock on the social and agonistic behaviour of resident rats. *Neuropharmacology* **44**, 911–925.
- Nachman, M., 1970. Learned taste and temperature aversions due to lithium chloride sickness after temporal delays. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **73**, 22–30.
- Nitabach, M.N., Schulkin, J., Epstein, A.N., 1989. The medial amygdala is a part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. *Behav. Brain Res.* **35**, 127–134.
- Schulkin, J., Marini, J., Epstein, A.N., 1989. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. *Behav. Neurosci.* **103**, 178–185.
- Sepúlveda, M.I., Lummis, S.C., Martin, I.L., 1991. The agonist properties of *m*-chlorophenylbiguanide and 2-methyl-5-hydroxytryptamine on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* **104**, 536–540.
- Simanski, K.J., 1996. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res.* **73**, 37–42.
- Simansky, K.J., Dave, K.D., Inemer, B.R., Nicklous, D.M., Padron, J.M., Aloyo, V.J., Romano, A.G., 2004. A 5-HT_{2C} agonist elicits hyperactivity and oral dyskinesia with hypophagia in rabbits. *Physiol. Behav.* **82**, 97–107.
- Stricker, E.M., Verbalis, J.G., 1990. Control of appetite and satiety: insights from biologic and behavioral studies. *Nutr. Rev.* **48**, 114–131.
- Tecott, L.H., Maricq, A., Julius, V.D., 1993. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1430–1434.
- Uphouse, L., 1997. Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 679–698.
- Van Hooft, J.A., Vijverberg, H.P., 1997. Full and partial agonists induce distinct desensitized states of the 5-HT₃ receptor. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **17**, 267–277.
- Zardetto-Smith, A.M., Beltz, T.G., Johnson, A.K., 1994. Role of central nucleus of the amygdala and bed nucleus of stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain. Res.* **645**, 123–134.

The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Research* 1139: 178-194, 2007.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres
**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors

C.P. Luz^a, A. Souza^b, R. Reis^b, P. Mineiro^b, H.S. Ferreira^c,
J.B. Fregoneze^b, E. De Castro e Silva^{b,*}

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 3 January 2007

Available online 9 January 2007

Keywords:

Serotonin
5HT2 receptor
5HT3 receptor
Salt intake
Water intake
Thirst
Amygdala
Central amygdala

ABSTRACT

In the present paper, we have evaluated the participation of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors in the central amygdala (CeA) in the regulation of water and salt intake in sodium-depleted rats. m-CPBG-induced pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located in the CeA resulted in a significant reduction in salt intake in sodium-depleted rats. This antinatriuretic effect of m-CPBG was reverted by pretreatment with the selective 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron. The injection of ondansetron alone into the CeA had no effect on sodium-depleted and normonatremic rats. Conversely, pharmacological stimulation of 5-HT_{2C} receptors located in the central amygdala by the selective 5-HT_{2C} receptor agonist m-CPP failed to modify salt intake in sodium-depleted rats. Additionally, the administration of a selective 5-HT_{2C} receptor blocker, SDZ SER 082, failed to modify salt intake in rats submitted to sodium depletion. These results lead to the conclusion that the pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located within the CeA inhibits salt intake in sodium-depleted rats and that 5-HT_{2C} receptors located within the CeA appear to be dissociated from the salt intake control mechanisms operating in the central amygdala.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In a series of previous studies, we have tried to establish the role of several brain serotonergic receptors in the control of water and salt intake. Our results showed that the activation of central 5-HT_{1D} receptors by selective pharmacological agents leads to a significant inhibition of water intake induced by central cholinergic, angiotensinergic and adrenergic stimulation (De Castro e Silva et al., 1997). Furthermore, we have demonstrated that central 5-HT₄ receptors seem to exert a dualistic role in the control of water intake, potentiating

angiotensin II-induced drinking and inhibiting thirst induced by central cholinergic activation (Castro et al., 2000). We have also shown that the 5-HT₂ receptor family appears to participate in thirst and sodium appetite regulation since the pharmacological activation of central 5-HT_{2C} receptors inhibits water intake elicited by different thirst-inducing physiological stimuli (Castro et al., 2002a) and decreases sodium appetite in sodium-depleted rats (Castro et al., 2003). In addition, we have established that the central activation of 5-HT₃ receptors significantly decreases water intake in experimental protocols in which different physiological

* Corresponding author. Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 40110-100 Salvador-BA, Brazil.

E-mail address: emilio@ufba.br (E. De Castro e Silva).

stimuli are used to promote thirst (dehydration, hypovolemia and hyperosmolarity) and following central angiotensinergic and cholinergic activation (Castro et al., 2002b). We have also shown that the pharmacological stimulation of central 5-HT₃ receptors reduces salt intake in sodium-depleted rats (Castro et al., 2003). In all of the above-mentioned studies, the

pharmacological manipulations resulted from intracerebroventricular injections of selective serotonergic agents.

Multiple serotonin receptors exert a myriad of physiological effects depending on the regions in which they are situated within the central nervous system (Uphouse, 1997). Therefore, the investigation of the roles played by the several

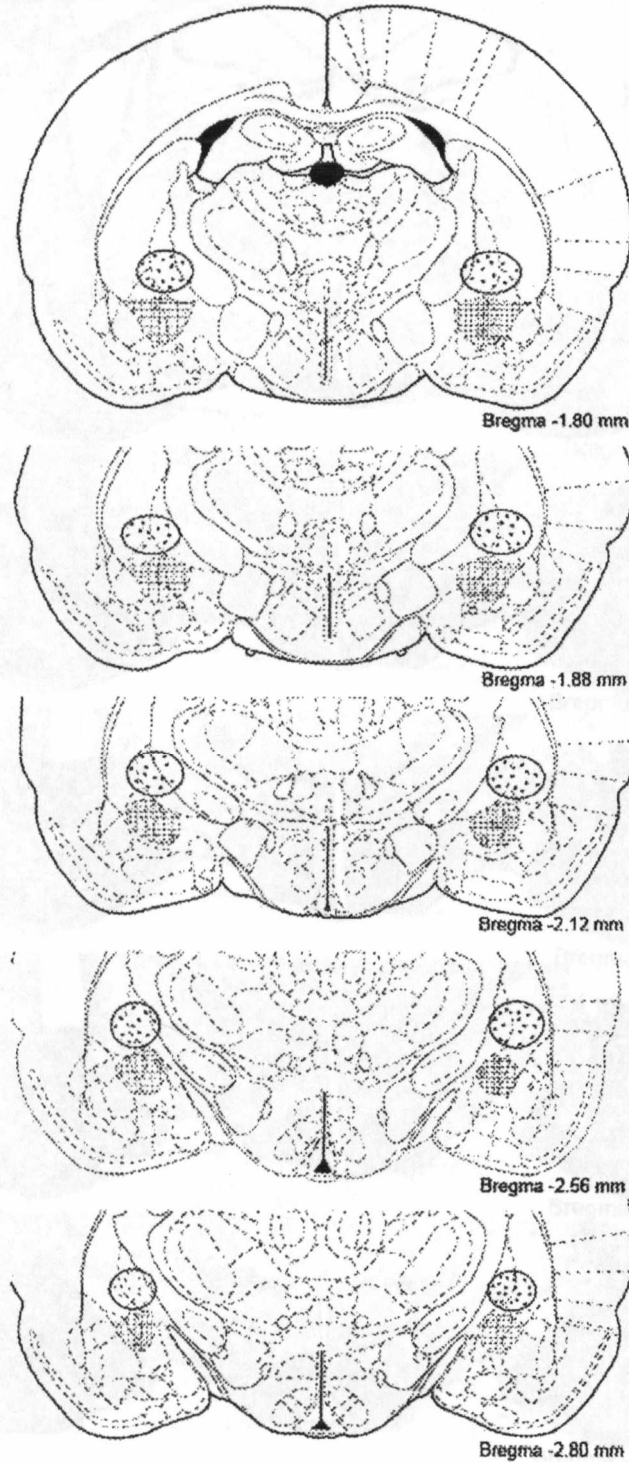


Fig. 1 – Diagram based on the Paxinos and Watson Atlas showing sequential coronal sections of areas reached by the injections within (hachured area) and outside (dotted area) the central amygdala.

serotonergic receptors located in specific brain regions on the regulation of water and salt intake is a logical next step in our research path.

The amygdala, a brain region containing distinct nuclei, influences a great number of behaviors tailored to promote the animal's adaptation to external and internal stimuli (Price et

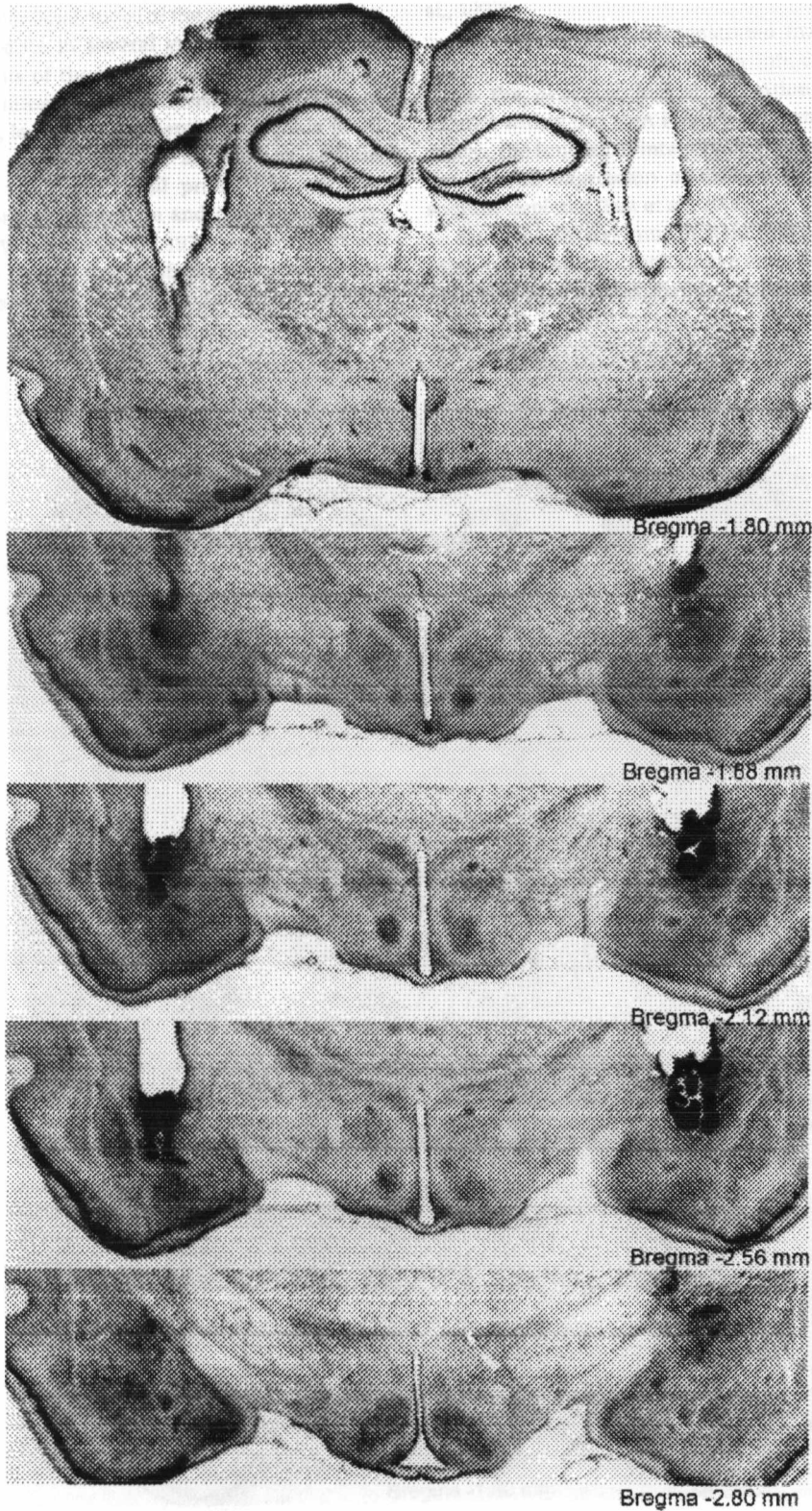


Fig. 2 - Photomicrographs showing the sequential coronal sections of the areas reached by typical bilateral injections into the central amygdala.

al., 1987), and seems to participate in the regulation of salt intake (Johnson et al., 1999). The distinct nuclei within the amygdala may play particular roles in the control of water and salt intake. Indeed, it has been clearly demonstrated that the basolateral, central and medial nuclei of the amygdala seem to influence sodium appetite in several experimental circumstances. Surgical lesions of the basolateral amygdala inhibit salt intake induced by mineralocorticoid treatment (Nachman and Ashe, 1974). Also, lesions of the central amygdala (CeA) reduce spontaneous sodium intake, as well as sodium appetite induced by pharmacological procedures such as subcutaneous injections of yohimbine and central angiotensinergic stimulation (Woodwar et al., 1979; Galaverna et al., 1992). The role of the several nuclei of the amygdala in the control of sodium appetite seems to be linked to the

physiological conditions triggering the intake of sodium since lesions of the medial amygdala (MeA) impair mineralocorticoid-induced salt intake but do not affect salt intake promoted by sodium depletion (Nitabach et al., 1989; Zhang et al., 1993).

We have recently demonstrated that both 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors in the amygdala influence sodium appetite since the pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located within the MeA inhibits salt intake and, in this brain region, the functional integrity of 5-HT_{2C} receptors is required for the full expression of sodium appetite when rats are sodium-depleted (Luz et al., 2006).

Since the different nuclei in the amygdala may play distinct roles in the control of salt intake and since multiple serotonin receptors may exhibit distinct physiological roles depending

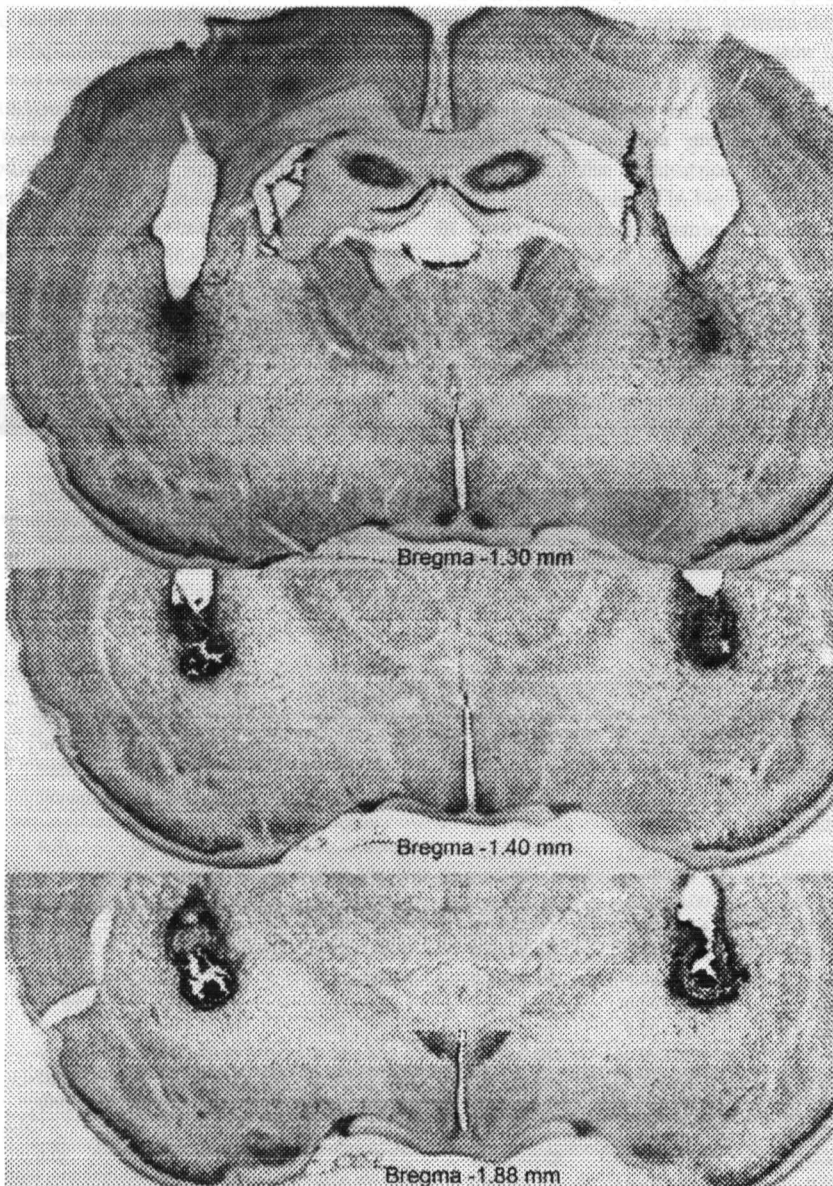


Fig. 3 – Photomicrographs showing the sequential coronal sections of the areas reached by the injections outside the central amygdala.

on their location within the central nervous system, in the present study, we decided to investigate the role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors within the CeA on water and salt intake in rats submitted to sodium depletion.

2. Results

Fig. 1 corresponds to a diagram based on the Paxinos and Watson Atlas showing sequential coronal sections of the areas reached by injections within and outside the central amygdala. Fig. 2 corresponds to photomicrographs showing the sequential coronal sections of the areas reached by typical bilateral injections into the central amygdala. Fig. 3 corresponds to photomicrographs showing the sequential coronal sections of the areas reached by the injections outside the central amygdala.

Table 1 displays the water and salt intake obtained with animals that received misplaced injections of m-CPBG and ondansetron. No effect was observable when these drugs were injected into sites located outside CeA.

Fig. 4A shows the effect of bilateral injections of m-CPBG, a selective 5-HT₃ receptor agonist, on salt intake in rats rendered sodium-depleted by previous subcutaneous furosemide injections. At the lowest dose used (10 nmol), the injection of the drug caused no effect. At all other doses used (40, 80, 160 nmol), m-CPBG induced a significant decrease in salt intake as compared to control, sodium-depleted rats

receiving bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. The magnitude of salt intake inhibition seems to be proportional to the dose used. Indeed, after 120 min, rats receiving m-CPBG at the dose of 40 nmol have a total salt intake approximately one-third of that presented by the control, saline-treated group, while the salt intake of sodium-depleted animals receiving m-CPBG at the highest dose of 160 nmol is totally inhibited. As expected, control, normonatremic rats (those receiving subcutaneous injections of isotonic saline solution and treated with bilateral saline injections into the CeA) present negligible salt intake. Panel B shows, as expected, that there was no water intake in any of the groups studied (sodium-depleted and control, normonatremic animals).

Fig. 5A shows the effect of the blockade of 5-HT₃ receptors by the selective antagonist ondansetron on the antinatriorexetic effect of m-CPBG. Here, as expected, a high salt intake was recorded in control, sodium-depleted rats receiving injections of isotonic saline solution into the CeA. Bilateral injections of m-CPBG into the CeA (160 nmol) significantly blocked salt intake in sodium-depleted rats, and the pretreatment of this group of rats with ondansetron extinguished the antinatriorexetic effect of m-CPBG. Similar to the events depicted in Fig. 4A, no salt intake was recorded in control, normonatremic rats (those receiving subcutaneous injections of isotonic saline solution and treated with bilateral saline injections into the CeA) which present no salt intake. Panel B shows, as expected, that there was negligible

Table 1 – Misplaced injections of m-CPBG, ondansetron or saline outside the central amygdala of sodium-depleted animals

Treatment	Intakes	Time					
		15	30	45	60	90	120
Saline (8)	Water	0.08±0.04	0.09±0.04	0.16±0.06	0.16±0.06	0.20±0.10	0.20±0.10
	Salt	1.16±0.38	2.60±0.50	3.97±0.52	4.22±0.60	4.94±0.69	5.15±0.65
m-CPBG 160 nmol (9)	Water	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Salt	1.79±0.51	3.15±0.70	3.70±0.75	3.91±0.64	4.57±0.32	4.71±0.33
m-CPBG 80 nmol (6)	Water	0.35±0.35	0.35±0.35	0.44±0.38	0.50±0.38	0.50±0.38	0.52±0.38
	Salt	1.03±0.52	1.74±0.71	2.40±0.84	2.83±0.89	4.43±0.30	5.02±0.39
m-CPBG 40 nmol (8)	Water	0.04±0.04	0.07±0.07	0.07±0.07	0.07±0.07	0.07±0.07	0.07±0.07
	Salt	1.25±0.37	2.42±0.49	2.94±0.54	3.71±0.53	4.50±0.58	5.25±0.39
m-CPBG 10 nmol (5)	Water	0.00±0.00	0.02±0.02	0.02±0.02	0.02±0.02	0.02±0.02	0.02±0.02
	Salt	1.86±0.30	2.50±0.29	3.10±0.38	3.18±0.40	3.99±0.50	4.34±0.54
ANOVA	Water	$F_{(4,31)}=1.07$; $p=0.39$	$F_{(4,31)}=0.97$; $p=0.44$	$F_{(4,31)}=1.32$; $p=0.28$	$F_{(4,31)}=1.65$; $p=0.19$	$F_{(4,31)}=1.58$; $p=0.20$	$F_{(4,31)}=1.78$; $p=0.16$
	Salt	$F_{(4,31)}=0.69$; $p=0.59$	$F_{(4,31)}=0.72$; $p=0.58$	$F_{(4,31)}=0.90$; $p=0.48$	$F_{(4,31)}=0.70$; $p=0.60$	$F_{(4,31)}=0.37$; $p=0.83$	$F_{(4,31)}=0.52$; $p=0.72$
Saline (5)	Water	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Salt	1.62±0.53	2.88±0.51	3.32±0.50	3.46±0.54	3.72±0.56	4.36±0.30
Ond 160 nmol (7)	Water	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
	Salt	2.07±0.60	2.69±0.74	3.26±0.70	4.32±0.66	5.26±0.49	5.63±0.46
Ond 80 nmol (9)	Water	0.16±0.16	0.16±0.16	0.16±0.16	0.16±0.16	0.23±0.23	0.23±0.23
	Salt	1.41±0.48	2.44±0.58	3.53±0.34	4.16±0.28	4.61±0.23	4.99±0.23
Ond 40 nmol (10)	Water	0.02±0.02	0.02±0.02	0.05±0.04	0.05±0.04	0.05±0.04	0.05±0.04
	Salt	1.68±0.36	3.31±0.47	3.96±0.38	4.31±0.27	4.79±0.23	5.14±0.13
ANOVA	Water	$F_{(3,27)}=0.72$; $p=0.55$	$F_{(3,27)}=0.69$; $p=0.57$	$F_{(3,27)}=0.56$; $p=0.65$	$F_{(3,27)}=0.56$; $p=0.65$	$F_{(3,27)}=0.62$; $p=0.61$	$F_{(3,27)}=0.62$; $p=0.61$
	Salt	$F_{(3,27)}=0.32$; $p=0.81$	$F_{(3,27)}=0.47$; $p=0.71$	$F_{(3,27)}=0.48$; $p=0.70$	$F_{(3,27)}=0.70$; $p=0.56$	$F_{(3,27)}=2.60$; $p=0.07$	$F_{(3,27)}=2.74$; $p=0.06$

Results are shown as mean ± SEM. There were no statistically significant differences among the groups. The number of animals used in each experimental set is indicated in parenthesis.

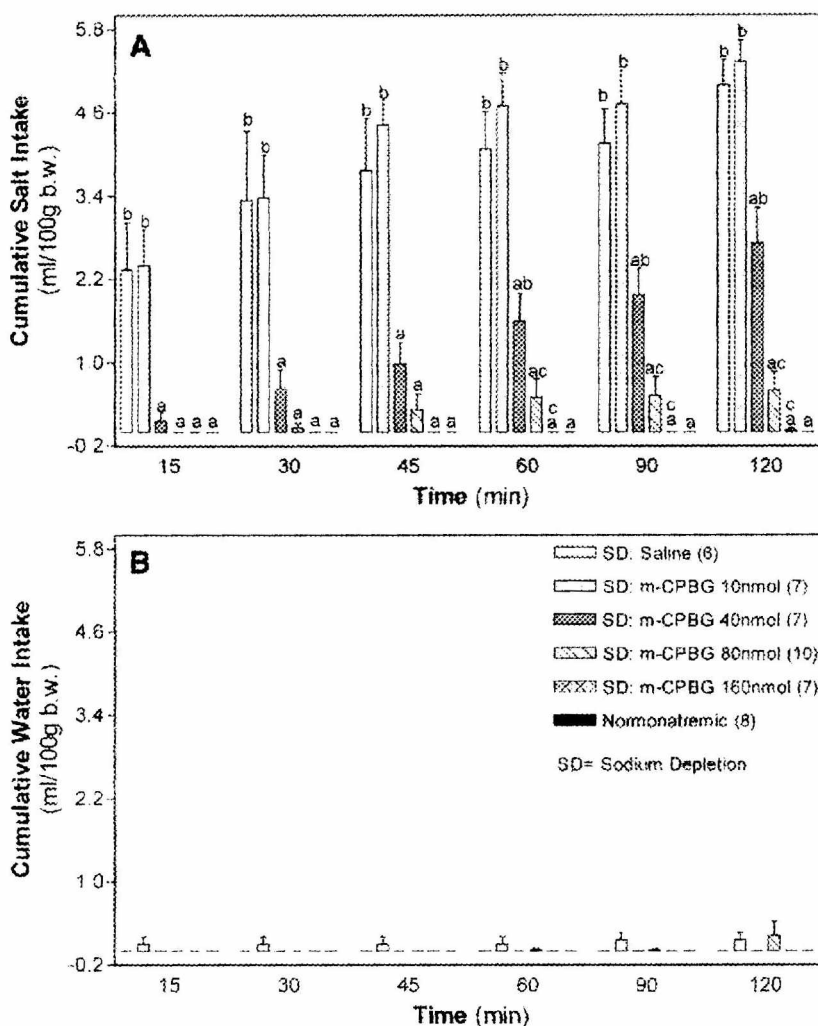


Fig. 4 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of m-CPBG, at various doses, into the CeA. The distinct pharmacological treatments and the number of animals used in each group are indicated within panel B. The animals labeled as normonatremic are control animals receiving subcutaneous injections of saline solution, instead of furosemide, and bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. Data are presented as mean ± SEM. “a” indicates a statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Newman-Keul’s test; $p < 0.05$) when the distinct groups of animals are compared to control sodium-depleted animals receiving injections of saline into the CeA. “b” indicates a statistically significant difference when the group of rats not submitted to sodium-depletion is compared to sodium-depleted animals receiving saline and m-CPBG at various doses. “c” indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) when sodium-depleted animals receiving injections of m-CPBG at the doses of 160 and 80 nmol into the CeA are compared to animals receiving m-CPBG at the dose of 40 nmol. Each bar in the graph has been obtained from a naive group of animals.

water intake in all groups studied (sodium-depleted and control, normonatremic animals).

Fig. 6A shows the effect of bilateral injections of ondansetron alone into the CeA on salt intake in sodium-depleted rats. Control, sodium-depleted rats receiving bilateral injections of isotonic saline solution presented a high salt intake as compared to control, normonatremic rats (those receiving subcutaneous injections of isotonic saline solution and treated with bilateral saline injections into the CeA). At all doses used (40, 80 and 160 nmol), bilateral injections of ondansetron were unable to modify the high salt intake presented by sodium-depleted animals. Panel B shows, as

expected, that there was insignificant water intake in all groups studied (sodium-depleted and control, normonatremic animals).

Fig. 7 shows a comparison between the effect of m-CPBG in several doses when injected into the CeA (produced in the present paper) with the effect of the injection of m-CPBG at the same doses when injected into the MeA, as we have presented in a previous paper (Luz et al., 2006). It is clear that, at the same doses, m-CPBG elicits a more powerful inhibition of salt intake in sodium-depleted rats when injected into the CeA as compared to the effect produced by the same drug when injected into the MeA.

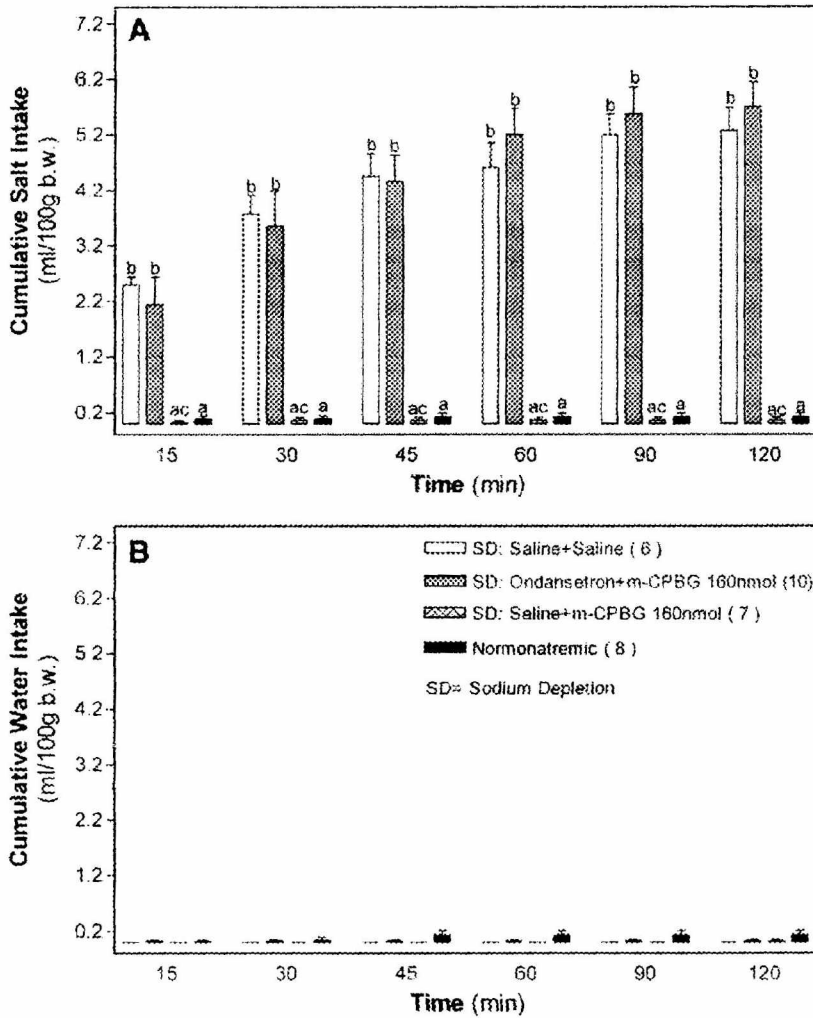


Fig. 5 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of m-CPBG (160 nmol) or saline into the CeA but pretreated with injections of ondansetron (160 nmol) or saline into the CeA. The distinct pharmacological treatments and the number of animals used in each group are indicated within panel B. The animals labeled as normonatremic are control animals receiving subcutaneous injections of saline solution, instead of furosemide, and bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. Data are presented as mean \pm SEM. “a” indicates a statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Newman-Keul’s test; $p < 0.05$) when the distinct groups of animals are compared to control sodium-depleted animals (saline+saline). “b” indicates a statistically significant difference when the group of rats not submitted to sodium-depletion is compared to the groups of sodium-depleted rats. “c” indicates a statistically significant difference when the group of sodium-depleted rats receiving saline+m-CPBG (160 nmol) into the CeA is compared to the group of sodium-depleted animals receiving ondansetron (160 nmol)+m-CPBG (160 nmol). Each bar in the graph has been obtained from a naive group of animals.

Fig. 8A shows the effect of bilateral injections of m-CPP, a selective 5-HT_{2C} receptor agonist, on salt intake in rats rendered sodium-depleted by previous subcutaneous furosemide injections. Salt intake in the groups of sodium-depleted rats receiving m-CPP, at any of the doses used (40, 80 and 160 nmol), is indistinguishable from that of the control, sodium-depleted rats receiving bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. As expected, there was negligible salt intake in the control, normonatremic rats (those receiving subcutaneous injections of isotonic saline solution and treated with bilateral saline injections into the CeA). Panel B shows, as expected, that there was no water intake in any of

the groups studied (sodium-depleted and control, normonatremic animals).

Fig. 9A shows the effect of bilateral injections of SDZ SER 082 (a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist) alone into the CeA on salt intake in sodium-depleted rats. A high salt-intake was registered in control, sodium-depleted rats receiving bilateral injections of isotonic saline solution as compared to control, normonatremic rats (those receiving subcutaneous injections of isotonic saline solution and treated with bilateral saline injections into the CeA). Bilateral injections of ondansetron were unable to modify the high salt intake of sodium-depleted animals at any of the doses used (40, 80 and 160 nmol). Panel B

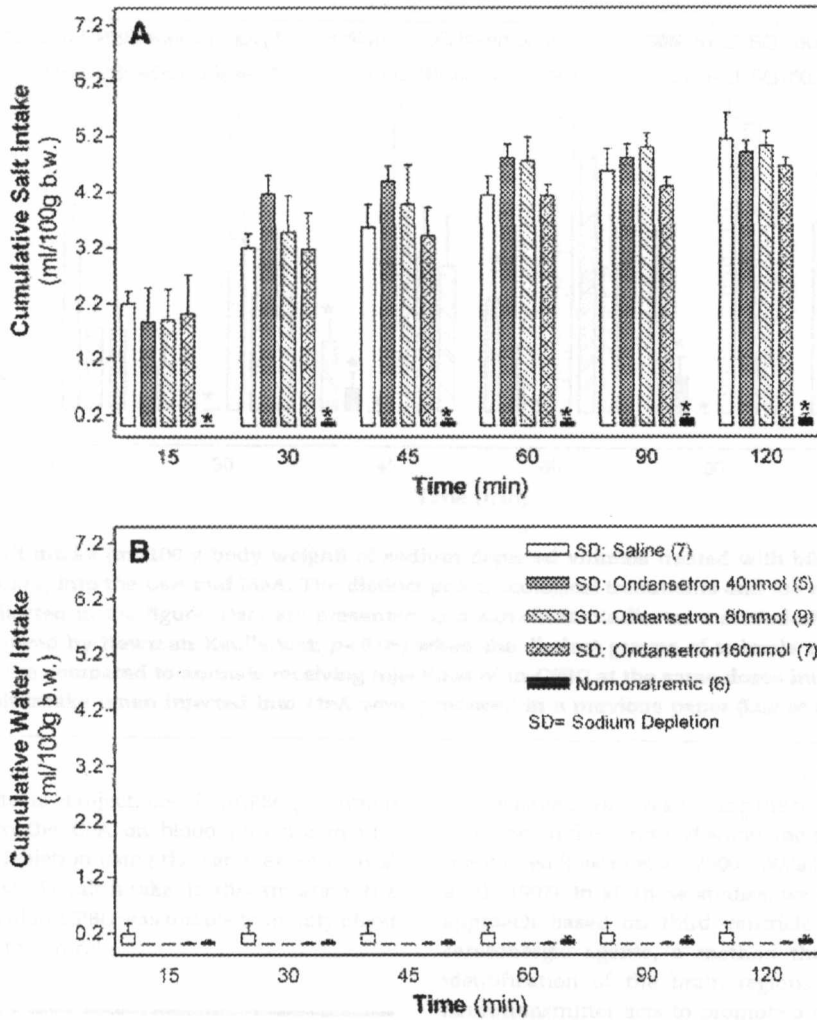


Fig. 6 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of ondansetron, at various doses, into the CeA. The distinct pharmacological treatments and the number of animals used in each group are indicated within panel B. The animals labeled as normonatremic are control animals receiving subcutaneous injections of saline solution, instead of furosemide, and bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisks indicate a statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $p < 0.05$) when the group of animals not submitted to sodium-depletion is compared to all other groups. Each bar in the graph has been obtained from a naive group of animals.

shows, as expected, the insignificant water intake registered in all the groups studied (sodium-depleted and control, normonatremic animals).

Table 2 shows the effect of bilateral injections of ondansetron (160 nmol) into the amygdala on water and salt intake in normonatremic animals. The administration of this compound did not induce any modification in those parameters compared to saline-treated controls.

Fig. 10A shows the results of the avoidance test performed to check whether the antinatriorexetic effects of m-CPBG could be consequent to any "illness-like" side effects. Analysis of variance indicated a significant treatment difference between the groups [$F_{(2,15)} = 93.3$; $p < 0.0001$]. As expected, there was a significant reduction in saccharin intake on the following day in animals establishing a previous association between lithium chloride and saccharin as compared to saline-treated

controls. Conversely, the previous association of m-CPBG with saccharin failed to produce any significant reduction in saccharin intake the next day, suggesting that it is improbable that illness-like effects could explain the results observed here after the injection of this compound into the central amygdala. Fig. 9B depicts the results of the dessert test. Here, saccharin intake was similar in saline-treated control animals and in animals receiving bilateral injections of m-CPBG into the CeA (160 nmol), indicating that the preferential intake of a "tasty" solution (a hedonic behavior) was not modified by central injections of m-CPBG ($t = 1.79$; $df = 10.0$; $p = 0.10$).

Table 3 lists the values of F , df and p for the effects obtained after injection of the serotonergic agents used, alone or in combination, into the CeA, in the experimental sets designed to study the role of brain 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors on the water and salt intake of sodium-depleted rats.

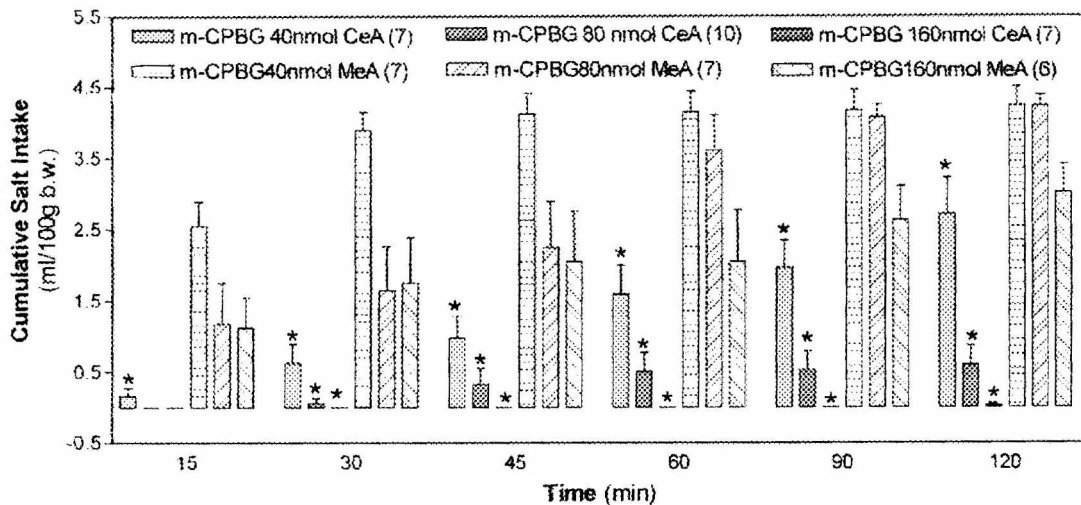


Fig. 7 – Cumulative salt intake (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of m-CPBG, at various doses, into the CeA and MeA. The distinct pharmacological treatments and the number of animals used in each group are indicated in the figure. Data are presented as mean \pm SEM. *Indicates a statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $p < 0.05$) when the distinct groups of animals receiving injections of m-CPBG into the CeA are compared to animals receiving injections of m-CPBG at the same doses into the MeA. The data on m-CPBG effects on salt intake when injected into MeA were produced in a previous paper (Luz et al., 2006).

Fig. 11 shows the effects of injections of m-CPBG (160 nmol) or saline solution into the CeA on blood pressure in rats submitted to sodium depletion using the same experimental protocol employed to study salt intake. In this situation, the central administration of m-CPBG was unable to modify blood pressure as compared to controls.

3. Discussion

The data shown in the present study demonstrate that the pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located within the CeA, by the selective 5-HT₃ receptor agonist m-CPBG, significantly reduces salt intake in sodium-depleted rats. The antinatriorexetic effect observed in this group of animals after the administration of m-CPBG seems to be due to the interaction of this compound with 5-HT₃ receptors since pretreatment with a selective 5-HT₃ antagonist, ondansetron, impairs the decrease in salt intake induced by the administration of this serotonergic agonist. It was also shown that bilateral injections of ondansetron alone into the CeA failed to modify salt intake in sodium-depleted and normonatremic rats. On the other hand, bilateral injections of m-CPP, a 5-HT_{2C} receptor agonist, and SDZ SER 082, a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist, did not modify salt intake in sodium-depleted animals. The inhibitory action of m-CPBG on salt intake is not consequent to sickness-like effects elicited by its injection into the CeA since an aversion test ruled out this possibility. Also, the antinatriorexetic effect obtained after bilateral injections of m-CPBG into the CeA is not due to a general, non-specific inhibitory effect on all ingestive behaviors, or to a locomotor deficit, since this pharmacological treatment failed to modify the ingestion of a palatable saccharin solution.

We have been investigating the role of central serotonergic receptors in the control of water and salt intake, as previously mentioned (Castro et al., 2000, 2002a,b, 2003; De Castro e Silva et al., 1997). In all these studies, we used a pharmacological approach based on third ventricle injections of selective serotonergic agents, a method that does not allow the identification of the brain regions in which a particular neurotransmitter acts to promote a specific effect. Recently, we decided to investigate the role of serotonergic receptors located in specific brain regions in the control of ingestive behaviors linked to hydrosaline homeostasis, by exploring the participation of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located in discrete nuclei of the amygdala in the modulation of water and salt intake in sodium-depleted rats.

The amygdala, a brain structure that is connected to both prosencephalic and rhombencephalic structures involved in the regulation of body sodium levels and sodium appetite, plays a well-documented role in the homeostasis of sodium (Johnson et al., 1999). A series of studies based on lesions of several nuclei of the amygdala has proven that this brain region influences sodium appetite in a way that makes this ingestive behavior a major regulatory loop in the control of sodium balance, together with renal sodium excretion/reabsorption and water intake. Indeed, surgical lesions of the MeA and CeA inhibit salt intake induced by the administration of mineralocorticoids (Nitabach et al., 1989; Schulkin et al., 1989; Galaverna et al., 1992; Zardetto-Smith et al., 1994).

The amygdaloid complex comprises more than 10 nuclei located in the midtemporal lobe that can be distinguished by cytoarchitectonic and connectional basis. Among these subparts, the centromedial nuclei consist of the central amygdala, the medial amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis. The CeA is located dorsomedially in the rostral part of the amygdala having the basolateral complex as lateral

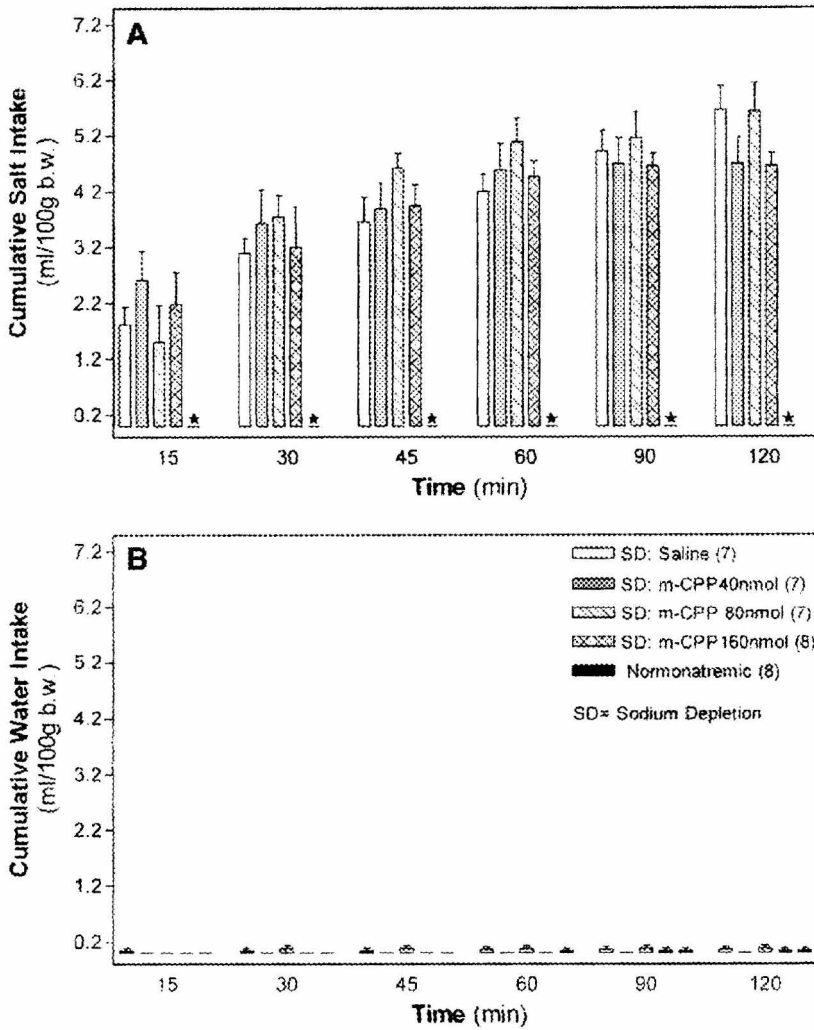


Fig. 8 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of m-CPP, at various doses, into the CeA. The distinct pharmacological treatments and the number of animals used in each group are indicated within panel B. The animals labeled as normonatremic are control animals receiving subcutaneous injections of saline solution, instead of furosemide, and bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisks indicate a statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $p < 0.05$) when the group of animals not submitted to sodium-depletion is compared to all other groups. Each bar in the graph has been obtained from a naive group of animals.

border, the globus pallidus as dorsal limit and the stria terminalis as medial rim. The CeA has four distinct subdivisions: the capsular, the lateral, the intermediate and the medial. The MeA is located near the surface bounded medially by the optic tract and has four subdivisions: rostral, central (dorsal and ventral) and caudal (McDonald, 1998; Sah et al., 2003; Swanson and Petrovich, 1998). The cytoarchitectonic and connective differences among the discrete subparts of the amygdala correspond to distinct functional roles and selective investigation of the physiology of the central and medial amygdala as separate functional units has been a common practice. The several distinct subnuclei within the amygdala may play specific functional roles in the control of salt intake that have to be continuously explored, in the near future, by the use of techniques and experimental protocols tailored to allow the individualization of those functional differences.

Results obtained by pharmacological approaches, as those used here, have to be extended and confirmed by complementary methods such as morphological detection of active neurons during selective ingestive behaviors, as well as anterograde and retrograde axonal labeling designed to identify neural connections involved in those behaviors. Indeed, it was recently demonstrated, by the use of axonal labeling techniques, that CeA is connected to a special group of aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract having the lateral parabrachial nucleus as an intermediary relay. This particular pathway may be one of the neuroanatomical circuits explaining the modulation of salt intake by the CeA (Geerling and Loewy, 2006).

The nature of the neurotransmitters related to the mechanisms controlling sodium appetite in the amygdala is unclear. Indeed, we were unable to find studies in which the

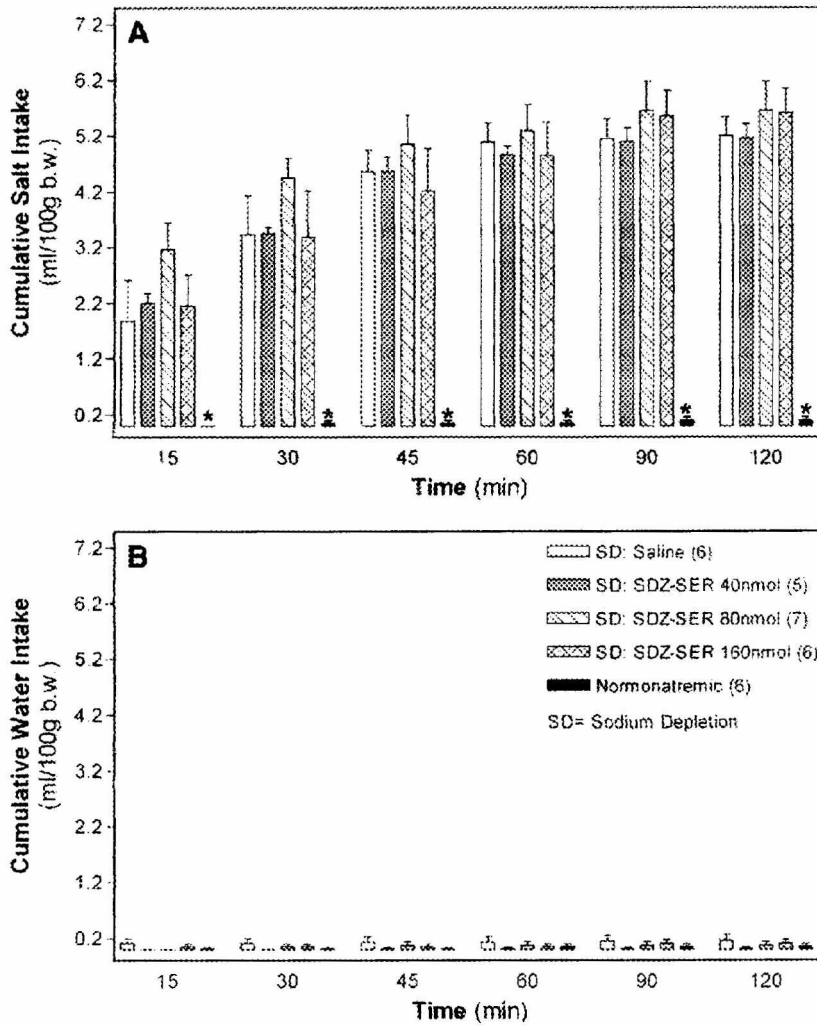


Fig. 9 – Cumulative salt (A) and water (B) intakes (ml/100 g body weight) of sodium-depleted animals treated with bilateral injections of SDZ SER 082, at various doses, into the CeA. The distinct pharmacological treatments and the number of animals used in each group are indicated within panel B. The animals labeled as normonatremic are control animals receiving subcutaneous injections of saline solution, instead of furosemide, and bilateral injections of isotonic saline solution into the CeA. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisks indicate a statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $p < 0.05$) when the group of animals not submitted to sodium-depletion is compared to all other groups. Each bar in the graph has been obtained from a naive group of animals.

aminergic neurochemical mechanisms that modulate water and salt intake in this structure were investigated. The only exception is the finding that cholinergic stimulation of the amygdaloid complex reduces water and salt intake in water-deprived rats (Saad et al., 1994). However, it is important to note that the mineralocorticoid system in the amygdala may play a crucial role in the regulation of fluid balance since genomic and non-genomic effects of mineralocorticoids in this area may influence salt intake. Indeed, the use of antisense oligodeoxynucleotides against mineralocorticoid receptors located within the amygdala reduces DOCA-induced salt intake (Sakai et al., 2000) but have no effect on salt intake elicited by adrenalectomy (Sakai et al., 1996).

In a previous study, we found that the pharmacological activation of 5-HT₃ receptors within the MeA inhibits salt intake and that, in this same brain region, the functional

integrity of 5-HT_{2C} receptors is required for the full expression of salt intake in sodium-depleted rats (Luz et al., 2006). Taking in consideration the findings of the present study and data contained in our previous work, it is possible to conclude that the activation of 5-HT₃ receptors located in the MeA and the CeA induces a reduction in salt intake in sodium-depleted rats, revealing a synergistic cooperation between these structures in the control of salt intake. Comparing the results obtained in both studies, it seems that activation of 5-HT₃ receptors within the CeA promotes a more significant antinatriuretic effect compared to the salt intake-inhibiting action that results from the activation of 5-HT₃ receptors located within the MeA. Indeed, the injection of the selective 5-HT₃ receptor agonist m-CPBG at the dose of 160 nmol into the CeA completely abolishes salt intake in sodium-depleted rats, while administration of the same dose

Table 2 – Effect of injections of ondansetron or saline into the CeA in normonatremic animals

Treatment	Intakes	Time					
		15	30	45	60	90	120
Saline (6)	Water	0.03±0.03	0.03±0.03	0.03±0.03	0.06±0.06	0.06±0.06	0.06±0.06
	Salt	0.00±0.00	0.06±0.06	0.06±0.06	0.06±0.06	0.13±0.08	0.13±0.08
Ondansetron (6)	Water	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Salt	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ANOVA	Water	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,30)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$
	Salt	$F_{(1,10)}=1.0; p=1.0$	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,10)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,30)}=1.0; p=0.34$	$F_{(1,10)}=2.5; p=0.14$	$F_{(1,10)}=2.5; p=0.14$

Results are shown as mean±SEM. There were no statistically significant differences among the groups. The number of animals used in each experimental set is indicated in the parenthesis.

of m-CPBG into the MeA significantly inhibits, but does not abolish, salt intake in rats after sodium depletion. Comparison of the data produced in both studies confirms that, in agreement with our findings in the MeA, the administration of the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron into the CeA failed to increase salt intake in normonatremic and sodium-depleted rats, indicating the absence of an endogenous inhibitory tonus exerted by 5-HT₃ receptors in these structures on salt intake. The absence of an endogenous 5-HT₃ receptor-dependent tonus modulating salt intake in the CeA suggests that the inhibitory action of m-CPBG on sodium appetite observed in the present study represents a pharmacological effect of the drug.

The administration of the 5-HT_{2C} agonist m-CPP into the CeA failed to modify water and salt intake in sodium-depleted rats. This result is similar to our previous findings following injection of the same pharmacological agent into the MeA. In that study, the injection of SDZ SER 082, a selective 5-HT_{2C} antagonist, into the MeA elicited a decrease in salt intake in sodium-depleted rats indicating that the endogenous serotonergic activity on 5-HT_{2C} receptors located in this region is necessary for the full expression of sodium appetite in sodium-depleted rats. Conversely, in the present study, the administration of the same 5-HT_{2C} receptor blocker, at the same doses, into the CeA was unable to modify salt intake in sodium-depleted animals, suggesting that 5-HT_{2C} receptors in this region do not participate in the neurochemical mechanisms modulating salt intake in sodium-depleted rats.

The structure of food behavior and the specific appetite for different nutrients is selectively modulated by brain serotonin (Simanski, 1996). Behavioral parameters such as the delay to initiate a meal, the duration of meals and the amount of food intake at each meal are affected by the brain serotonin system. Indeed, fenfluramine, a serotonin releaser, reduces the delay to begin a meal, the speed of eating and the amount of food consumed at each meal (Blundell and Lathan, 1980). In addition, brain serotonin seems to control the selective intake of the distinct nutrients by reducing fat and protein intake without modifying the ingestion of carbohydrates (Smith et al., 1999). The effects of central serotonin systems on sodium appetite are less studied. However, we have previously demonstrated that intracerebroventricular injections of both 5-HT_{2C} and 5-HT₃ receptor agonists inhibit salt intake (Castro et al., 2003). Another group has shown that the blockade of serotonergic action by

methysergide at the lateral parabrachial nucleus significantly increases salt intake in rats (Colombari et al., 1996; Menani et al., 1998, 2000). Ingestive behaviors are part of a general reward system that is at least partially controlled by the amygdala, whose functional integrity is essential for the correct choice of food by mammals (Baxter and Murray, 2002).

Several studies reveal that 5-HT₃ receptors are widespread throughout the central nervous system, being present in areas related to the control of hydrosaline balance such as the hypothalamus, the amygdala and the septal area (Tecott et al., 1993). Also, 5-HT_{2C} receptors are universally found in the brain and are present in limbic areas linked to the control of water and salt intake (Barnes and Sharp, 1999; Clement et al., 2000; Giorgetti and Tecott, 2004). Therefore, studies investigating the participation of these receptors located within the amygdala in the control of water and salt intake are based on anatomically proven data.

The serotonergic drugs used in the present study are considered suitable pharmacological agents for studying the role of serotonergic 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. Indeed, m-CPBG is a well-known 5-HT₃ receptor agonist (Sepúlveda et al., 1991; Van Hooft and Vijverberg, 1997), the antagonistic effect of ondansetron on 5-HT₃ receptor is a well-documented phenomenon (Gaster and King, 1997), m-CPP is a 5-HT_{2C} agonist (Simansky et al., 2004) and SDZ SER 082 is a specific 5-HT_{2C} receptor antagonist (Hernandez et al., 2003). Despite the fact that m-CPP may exhibit some affinity for other serotonin receptors, it is still considered an ideal tool for the investigation of the physiological roles of 5-HT_{2C} receptors since it binds to this serotonin receptor subtype with much greater affinity than to any other serotonin receptor. Indeed, in the absence of a more selective agonist, m-CPP is considered the prototypical pharmacological tool for the investigation of 5-HT_{2C} function (Hajos et al., 2003; Jakus et al., 2003; Mitchell et al., 2003; Simansky et al., 2004).

The identification of pharmacological effects of serotonergic agents on the central nervous system is of crucial importance since 5-HT₃ receptor antagonists, which easily cross the blood-brain barrier, are the main therapeutical approach to controlling non-coercible nausea and vomiting, generally presented in patients under chemotherapy (Doherty, 1999). Also, central 5-HT₃ receptors may participate in many pharmacological events associated with anxiolytic, antipsychotic and cognitive actions, opening a new field in

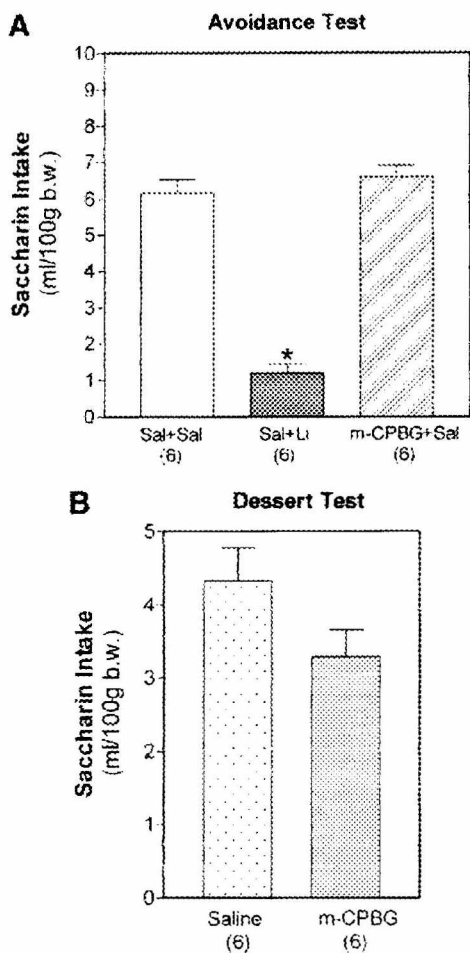


Fig. 10 – Avoidance test: saccharin solution (0.25%) consumption (ml/100 g body weight) over 15 min at a second offering in animals receiving injections of m-CPBG (160 nmol) or saline into the CeA (A). The sequence of injections used during the first offering of saccharin and the number of animals used are indicated in the figure. The first injection was into the CeA and the second via intraperitoneal route. The asterisk indicates a statistically significant difference ($p < 0.001$) between that particular group and controls (saline + saline). Dessert test: saccharin intake (ml/100 g body weight) during 2 h in the test cage in rats receiving CeA injections of isotonic saline solution (controls) and m-CPBG at the dose of 160 nmol (B). The treatment received by each group and the number of animals used are indicated in the graph. There was no significant difference in the ingestion of saccharin between groups treated with saline and the serotonergic agent tested. Data are expressed as mean \pm SEM.

which 5-HT₃ receptor related compounds may have a future therapeutic use. Therefore, the identification of any pharmacological action of the serotonergic agents used here on important brain functions may be considered relevant.

Inhibition of ingestive behaviors may be the result of aversive effects caused by methodological procedures. In the present study, we have demonstrated that the antinatriorexic

effect of m-CPBG is not due to any sickness-like condition since an appropriate test indicated the absence of aversive effects caused by the injection of this drug into the CeA. It is also evident that the injection of m-CPBG does not impair the expression of any hedonic behavior since animals receiving injections of m-CPBG into the CeA normally seek and drink a palatable saccharin solution.

Sodium appetite may be strongly influenced by changes in blood pressure. Sodium intake is more promptly developed during hypovolemia if the animals are made simultaneously hypotensive (Johnson and Thunhorst, 1997). Some studies showing that after the combined administration of furosemide plus captopril, a treatment that induces sodium depletion, salt intake is significantly reduced if blood pressure is not allowed to decrease by the use of sympathomimetic drugs such as phenylephrine. This clearly demonstrates the influence of blood pressure in the regulation of sodium appetite (Thunhorst and Johnson, 1994). Furthermore, sodium-depleted sheep display a significant inhibition in salt intake when their blood pressure is maintained elevated (Bott et al., 1967) and baroreceptor denervation significantly decreases sodium appetite in rats after sodium depletion (Thunhorst et al., 1994). These findings indicate that acute increases in blood pressure inhibit sodium appetite. In summary, hypotension seems to stimulate whereas hypertension inhibits salt intake. In the present study, the pharmacological stimulation of 5-HT₃ receptors located within the CeA was unable to modify blood pressure in rats submitted to the same experimental sodium depletion protocol used to study salt intake. This allows the conclusion that the antidiuretic effect evoked by the injections of m-CPBG into the CeA is not consequent to an increase in blood pressure.

In this study, injections of m-CPBG into areas located outside the CeA did not produce any significant effect on salt intake in sodium-depleted rats, indicating that the effects observed here are consequent to the pharmacological stimulation of 5-HT₃ receptors located within that brain region.

Considering the close proximity between CeA and MeA, we cannot exclude that the drugs injected into each one of these regions may partially reach the other, leading to an overall effect that may represent much more a preferential activation of one of these sites than an exclusive activation of that particular brain region. Therefore, we cannot exclude that, in our previous paper, the inhibitory effect of m-CPBG injections into the MeA on salt intake may result from the action of the drug partially reaching the CeA.

In summary, in this study, we show that pharmacological activation of 5-HT₃ receptors located in the CeA induces a significant decrease in salt intake in sodium-depleted rats. Our findings also suggest that 5-HT_{2C} receptors located in this same region do not participate in the mechanisms controlling salt intake at least in sodium-depleted rats.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

In the present study, we used male Wistar rats weighing 280 \pm 20 g. They were housed in individual cages and kept

Table 3 - Values of F, df and p for the effects obtained after the injections of the serotonergic agents administered alone or in combination, into the CeA, in the experimental sets designed to study the role of brain 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors on water and salt intake in sodium-depleted rats

Treatment compared	15	30	45	60	90	120
Saline; m-CPBG (10, 40, 80, 160 nmol)	F _(5,39) = 1.10; p = 0.38	F _(5,39) = 1.10; p = 0.38	F _(5,39) = 1.10; p = 0.38	F _(5,39) = 1.10; p = 0.38	F _(5,39) = 2.18; p = 0.08	F _(5,39) = 0.77; p = 0.57
normonatriemic	F _(5,39) = 15.3; p < 0.00001	F _(5,39) = 14.1; p < 0.00001	F _(5,39) = 27.3; p < 0.00001	F _(5,39) = 28.8; p < 0.00001	F _(5,39) = 30.9; p < 0.00001	F _(5,39) = 40.2; p < 0.00001
Saline + saline; saline + m-CPBG 160 nmol;	F _(5,39) = 0.67; p = 0.58	F _(5,39) = 0.72; p = 0.55	F _(5,39) = 1.76; p = 0.18	F _(5,39) = 1.76; p = 0.18	F _(5,39) = 1.76; p = 0.18	F _(5,39) = 1.40; p = 0.26
ondansetron 160 nmol + m-CPBG	F _(5,39) = 15.7; p < 0.00001	F _(5,39) = 23.6; p < 0.00001	F _(5,39) = 55.3; p < 0.00001	F _(5,39) = 67.0; p < 0.00001	F _(5,39) = 82.2; p < 0.00001	F _(5,39) = 92.5; p < 0.00001
160 nmol normonatriemic						
Saline; ondansetron (40, 80, 160 nmol)	F _(4,29) = 0.85; p = 0.50	F _(4,29) = 0.85; p = 0.50	F _(4,29) = 0.85; p = 0.50	F _(4,29) = 0.80; p = 0.53	F _(4,29) = 0.80; p = 0.53	F _(4,29) = 0.80; p = 0.53
normonatriemic	F _(4,29) = 3.54; p = 0.02	F _(4,29) = 9.32; p < 0.00001	F _(4,29) = 11.2; p < 0.00001	F _(4,29) = 31.4; p < 0.00001	F _(4,29) = 49.8; p < 0.00001	F _(4,29) = 49.4; p < 0.00001
Saline m-CPP (40, 80, 160 nmol)	F _(4,31) = 1.0; p = 1.0	F _(4,31) = 2.77; p = 0.05	F _(4,31) = 2.77; p = 0.05	F _(4,31) = 1.42; p = 0.25	F _(4,31) = 0.81; p = 0.53	F _(4,31) = 0.81; p = 0.53
normonatriemic	F _(4,31) = 4.79; p = 0.004	F _(4,31) = 11.0; p < 0.00001	F _(4,31) = 30.5; p < 0.00001	F _(4,31) = 42.0; p < 0.00001	F _(4,31) = 42.9; p < 0.00001	F _(4,31) = 44.5; p < 0.00001
Saline SDZ-SER082 (40, 80, 160 nmol)	F _(4,29) = 4.23; p = 0.032	F _(4,29) = 1.15; p = 0.36	F _(4,29) = 1.19; p = 0.34	F _(4,29) = 1.14; p = 0.36	F _(4,29) = 1.16; p = 0.35	F _(4,29) = 1.13; p = 0.36
normonatriemic	F _(4,29) = 5.42; p = 0.003	F _(4,29) = 10.5; p < 0.00001	F _(4,29) = 19.6; p < 0.00001	F _(4,29) = 32.2; p < 0.00001	F _(4,29) = 44.0; p < 0.00001	F _(4,29) = 45.5; p < 0.00001
m-CPBG (40, 80, 160 nmol) into	F _(5,39) = 11.40; p < 0.00001	F _(5,39) = 17.70; p < 0.00001	F _(5,39) = 14.3; p < 0.00001	F _(5,39) = 17.80; p < 0.00001	F _(5,39) = 36.2; p < 0.00001	F _(5,39) = 35.6; p < 0.00001
CeA; m-CPBG (40, 80, 160 nmol) into MeA						

The data were analyzed using one-way ANOVA for each time point. For follow-up statistical tests to compare specific groups, additional post hoc Student-Newman-Keuls tests were conducted. The group means for the various parameters analyzed were considered to be significantly different when p < 0.05. These results are shown in Figs. 2-6.

under controlled light (lights on from 7 AM to 7 PM) and temperature (22-24 °C) conditions. Central injections of saline (controls) and each individual dose of the serotonergic agents were tested in a naive group of animals. All experiments were conducted between 7 AM and 12 PM. The experimental protocols were conducted according to the regulations established by the National Institutes of Health (USA) and were approved by a local committee regulating the use of animals in research laboratories.

4.2. Surgical procedures

Five days before the experimental sessions, a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) was used to implant a 15 mm, 22-gauge, stainless steel cannula under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg i.p.). The following coordinates were used: anteroposterior = 2.0 mm behind bregma; lateral = 3.6 mm; vertical = 7.6 mm below the skull. The animals were placed in the stereotaxic apparatus with their heads in the horizontal position. The cannulas were cemented to the skull bone with dental acrylic. To avoid obstruction, an obturator (28-gauge) was provided. After surgery, the animals in all the study groups had free access to two different bottles, one containing distilled water and the other containing 1.5% saline solution. The animals were handled every day in order to minimize the stress of the experimental procedure. At the end of the experiments, the animals were anesthetized with ether and submitted to transcardiac perfusion with isotonic saline solution, followed by 10% formalin. The brains were then removed and fixed in 10% formalin. They were frozen and cut into 40 μm sections. To confirm the injection sites in relation to the CeA, the slices were stained with cresyl violet and analyzed by light microscopy. The data from the animals in which the cannulas were strictly inside the CeA were analyzed and taken into consideration for the interpretation of the effects of the pharmacological agents on water and salt intake. A special table condenses the data from animals in which the cannulas were off target.

4.3. Drugs and microinjections

The following drugs were used: m-chlorophenylbiguanide hydrochloride (1-(3-chlorophenyl)biguanide; m-CPBG), a selective 5-HT₃ agonist (Sepúlveda et al., 1991; Van Hooft and Vijverberg, 1997); m-CPP (1-(3-Chlorophenyl)piperazine), a 5-HT₂ agonist (Simansky et al., 2004); and SDZ SER 08 [(+)-cis-4, 5, 7a,8, 9, 10, 11, 11a-octahydro-7H-10-methylindolo [1,7-bc][2,6] naphthyndine), a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist (Hernandez et al., 2003), all purchased from Tocris Cookson, Inc. Ballwin, MO. Ondansetron, a specific 5-HT₃ antagonist, was kindly donated by GlaxoWellcome Research and Development Limited, UK (Gaster and King, 1997). Lithium chloride was acquired from Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO. Furosemide, a loop diuretic, was purchased from Aventis Pharma Ltd., São Paulo, Brazil. Central injections were performed using Hamilton microsyringes connected to Myzzy-Slide-Pak needles that extended 1 mm beyond the end of the guide cannulas. All drugs were dissolved in isotonic saline solution. The final volume injected was 0.5 μl over a period of 60 seconds.

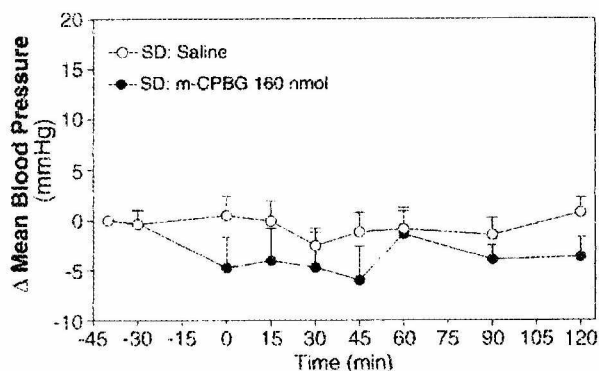


Fig. 11 – Changes in mean blood pressure in sodium-depleted rats after injections of m-CPBG (● 160 nmol; $n=6$) or saline solution (○; $n=6$), into the CeA. Blood pressure recording between times -45 and -30 min corresponds to a pre-drug basal evaluation. Intra-amygdaloid injections were made at time -30 min. The bottles containing water and saline solution (1.5%) were accessible at 0 min. Data are presented as mean \pm SEM.

4.4. Sodium depletion

Animals in the sodium depletion protocol had simultaneous access to two bottles (distilled water and 1.5% saline solution) and standard rat chow from the period immediately after CeA cannulation until the moment of furosemide administration. To provoke the renal sodium loss that induces sodium depletion, the rats received a subcutaneous injection of furosemide (20 mg/kg) 24 h prior to the experimental sessions. Access to 1.5% saline ceased immediately after the furosemide injection. From that moment on, the animals continued to have free access to distilled water, and normal rat chow was replaced by a low sodium diet (0.001% Na⁺ and 0.33% K⁺). Control animals not submitted to sodium depletion received subcutaneous injections of isotonic saline solution instead of furosemide. We have previously shown that furosemide administration, at the dose used here, effectively increases urine output and renal sodium excretion and produces hyponatremia (Castro et al., 2003). To test the participation of central 5-HT_{2C} and 5-HT₃ receptors in water and salt intake in sodium-depleted rats, different groups of sodium-depleted animals received bilateral injections of the serotonergic agents at different doses into the CeA. Sodium-depleted control animals received injections of isotonic saline solution into this same area. The bottles containing 1.5% saline solution were reintroduced into the cages 30 min after the injections into the CeA. The first measurement of fluid intake was recorded 15 min after this and measurements continued for the next 120 min. All groups were also compared to a control group of normonatremic animals.

4.5. Avoidance test

An avoidance test was carried out to verify whether the central administration of the serotonergic agent, m-CPBG, was devoid of non-specific, inhibitory, "illness-like" effects

on salt intake. An experimental protocol based on the original design proposed by Nachman (1970) was adopted. This protocol uses a temporal association between the novel taste of a 0.25% saccharin solution and the distress induced by lithium chloride administration. Five days after cannulation of the CeA, the animals had their access to water restricted to 15 min/day (between 12 and 12:15 PM) for 4 consecutive days. Under these conditions, rats drank water rapidly and reliably. On the fifth day, they were divided into 3 different groups that, after being submitted to the different pharmacological protocols, had access to bottles containing saccharin (no water was offered on this day). The first group (controls) received two consecutive injections of isotonic saline solution, one immediately following the other, the first being intraperitoneal and the second into the CeA. In the second group of animals, 0.15 M lithium chloride intraperitoneal injections (0.6% b.w.) were followed by injections of isotonic saline solution into the CeA. In this group, the lithium-induced, illness-like effects, a condition that generally disrupts ingestive behaviors in rats, were associated with the novel taste of saccharin. The third group of animals received intraperitoneal injections of saline solution in the same volume used in the previous group, followed by injections of m-CPBG (160 nmol). In this group of animals, we investigated whether the administration of the serotonergic agent m-CPBG into the CeA provoked any degree of discomfort leading to a general reduction in ingestive behavior that the animals could associate with the novel taste of saccharin. On the sixth day, at the same time that the bottles had been available on the previous days (12 to 12:15 PM), saccharin-containing bottles were placed in all cages and the amount ingested was recorded. No drugs were injected on this day.

4.6. Dessert test

To investigate whether the serotonergic agents used in the present study were able to modify water and salt intake through non-specific, general inhibition of the central nervous system or through a locomotor deficit, we investigated the effect of their injection into the CeA on the intake of 0.1% saccharin solution, a well-established example of hedonic behavior in rats (Johnson and Schwob, 1975). In this experiment, after CeA cannulation, two different groups of animals, kept in the usual individual cages where the only fluid available was water, were transferred (for 2 h each day for seven consecutive days) to a different cage (the test cage) in which two bottles, one containing water and the other containing a 0.1% saccharin solution, were accessible. After this period of training, two different groups of fluid-deprived animals received injections of m-CPBG (160 nmol) or saline (controls) into the CeA, 30 min before being transferred to the test cage. The intake of saccharin was then recorded during the following 120 min.

4.7. Blood pressure recording

To record blood pressure, a carotid catheter was connected to a pressure transducer (Hewlett-Packard, model 21080A) whose signal was amplified and digitally recorded by an analog-to-

digital interface (AqDados, version 5, Lynx Tecnologia Eletrônica LTDA, São Paulo, Brazil) and recorded (1 kHz) on a microcomputer (IBM/PC-AT 586) for later analysis.

To test the effects of the intra-amygdaloid administration of m-CPBG on blood pressure, distinct groups of sodium-depleted animals, whose blood pressure had already been monitored for 15 min, received injections of m-CPBG (160 nmol) or saline solution (controls) into the CeA. In each of those groups, blood pressure continued to be recorded for the next 150 min after m-CPBG or saline solution was injected. The experimental protocol used in this case was identical to that used to study salt intake in the previous groups.

4.8. Statistical analysis

A computer software package (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, San Rafael-CA) was used to carry out a one-way analysis of variance for each time point. The post hoc Student–Newman–Keuls test was used for comparison of each treatment with its corresponding time in the control groups. One-way ANOVA was also used to analyze the data resulting from the avoidance test. Two-way ANOVA was used to analyze the data in the experimental set designed to investigate the effect of intra-amygdaloid injections of m-CPBG on blood pressure. Data resulting from the dessert test were analyzed using Student's *t*-test. The data are presented as mean \pm SEM. The effects were considered significantly different when $p < 0.05$.

Acknowledgments

We are grateful to Mr. Vanilson Souza and Mr. José de Souza for their skillful technical assistance. The present work was supported by grants provided by The Brazilian Council of Research (CNPq), grant numbers 300.915/2003-9 and 300.943/2003-2, and by The Financial Agency for the Support of Research of the State of Bahia (FAPESB). Carla Luz received financial support from the State University of Southwest Bahia.

REFERENCES

- Barnes, N.M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.
- Baxter, M.G., Murray, E.A., 2002. The amygdala and reward. *Nat. Rev., Neurosci.* 3, 563–573.
- Blundell, J.E., Lathan, C.J., 1980. Characterization of adjustments to the structure of feeding behavior following pharmacological treatment: effects of amphetamine and fenfluramine and antagonism produced by pimoziide and methergoline. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 717–722.
- Bott, E., Denton, D.A., Weller, S., 1967. The effect of angiotensin II infusion, renal hypertension and nephrectomy on salt appetite of sodium-deficient sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 45, 595–612.
- Castro, L., De Castro e Silva, E., Lima, A.K.S., Souza, F.S., Maldonado, I., Macedo, D.F., Ferreira, M.G., Santamaría, G.F., Bandeira, I.P.V., Amor, A.L.M., Carvalho, F.L.Q., Rocha Jr., M.A., Oliveira, I.R., Fregoneze, J.B., 2000. Central 5-HT₂ receptors and drinking behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 443–448.
- Castro, L., Maldonado, I., Campos, I., Varjão, B., Ângelo, A.L., Athanzio, R.A., Barbeta, M.C., Ramos, A.C., Fregoneze, J.B., De Castro e Silva, E., 2002a. Central administration of m-CPP, a serotonin 5-HT_{2B/2C} agonist, decreases water intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 891–898.
- Castro, L., Varjão, B., Maldonado, I., Campos, I., Duque, B., Fregoneze, J.B., Oliveira, I.R., De Castro e Silva, E., 2002b. Central 5-HT₃ receptors and water intake in rats. *Physiol. Behav.* 77, 349–359.
- Castro, L., Athanzio, R., Barbeta, M., Ramos, A.C., Ângelo, A.L., Campos, I., Varjão, B., Ferreira, H.S., Fregoneze, J.B., De Castro e Silva, E., 2003. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res.* 981, 151–159.
- Clement, D.A., Punhani, T., Duxon, M.S., Blackburn, T.P., Fone, K.C., 2000. Immunohistochemical localization of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology* 39, 123–132.
- Colombari, D.S., Menani, J.V., Johnson, A.K., 1996. Forebrain angiotensin type I receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am. J. Physiol.* 271, R1470–R1476.
- De Castro e Silva, E., Sarmiento, C., Nascimento, T.A., Luz, C.P., Soares, T., Marinho, A., Cunha, M., Bulcão, C., De Oliveira, I.R., Fregoneze, J.B., 1997. Effect of third ventricle administration of L-694-247, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on water intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 749–754.
- Doherty, K.M., 1999. Closing the gap in prophylactic antiemetic therapy: patient factors in calculating the emetogenic potential of chemotherapy. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 3, 113–119.
- Galaverna, O., De Luca Jr., L.A., Schulkin, J., Yao, S.Z., Epstein, A.N., 1992. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull.* 28, 89–98.
- Gaster, L.M., King, F.D., 1997. Serotonin 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor antagonists. *Med. Res. Rev.* 17, 163–214.
- Geerling, J.C., Loewy, A.D., 2006. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 497, 646–657.
- Giorgetti, M., Tecott, L.H., 2004. Contributions of 5-HT_{2C} receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur. J. Pharmacol.* 488, 1–9.
- Hajos, M., Hoffmann, W.E., Weaver, R.J., 2003. Regulation of septo-hippocampal activity by 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 605–615.
- Hernandez, M., Barahona, M.V., Simonsen, U., Recio, P., Rivera, L., Martinez, A.C., Garcia-Sacristan, A., Orensanz, L.M., Prieto, D., 2003. Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in the pig isolated intravesical ureter. *Br. J. Pharmacol.* 138, 137–144.
- Jakus, R., Graf, M., Juhasz, G., Gerber, K., Levay, G., Halasz, P., Bagdy, G., 2003. 5-HT_{2C} receptors inhibit and 5-HT_{1A} receptors activate the generation of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy. *Exp. Neurol.* 184, 964–972.
- Johnson, A.K., Schwob, J.E., 1975. Cephalic angiotensin receptors mediating drinking to systemic angiotensin II. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3, 1077–1084.
- Johnson, A.K., Thunhorst, R.L., 1997. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front. Neuroendocrinol.* 18, 292–353.
- Johnson, A.K., De Olmos, J., Pastuskovas, C.V., Zardetto-Smith, A.M., Vivas, L., 1999. The extended amygdala and salt appetite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 258–280.
- Luz, C., Souza, A., Reis, R., Fregoneze, J.B., De Castro e Silva, E., 2006. Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res.* 1099, 121–132.

- McDonald, A.J., 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.* 55, 257–332.
- Menani, J.V., De Lucca Jr., L.A., Johnson, A.K., 1998. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am. J. Physiol.* 274, R555–R560.
- Menani, J.V., De Lucca Jr., L.A., Thunhorst, R.L., Johnson, A.K., 2000. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. *Am. J. Physiol.* 279, R126–R131.
- Mitchell, P.J., Fairhall, S.J., Fletcher, A., Redfern, P.H., 2003. Effects of single and repeated electroconvulsive shock on the social and agonistic behavior of resident rats. *Neuropharmacology* 44, 911–925.
- Nachman, M., 1970. Learned taste and temperature aversions due to lithium chloride sickness after temporal delays. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 73, 22–30.
- Nachman, M., Ashe, J.H., 1974. Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 87, 622–643.
- Nitabach, M.N., Schulkin, J., Epstein, A.N., 1989. The medial amygdala is a part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. *Behav. Brain Res.* 35, 127–134.
- Price, J.L., Russche, F.T., Amaral, D.G., 1987. In: Björklund, A., Hökfelt, T., Swanson, L.W. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Integrated Systems of the CNS, Part 1*, vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 279–388.
- Saad, W.A., Bengtson, R.M., Menani, J.V., Camargo, L.A., Renzi, A., Silveira, J.E., Saad, W.A., 1994. Effect of cholinergic stimulation of the amygdaloid complex on water and salt intake. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 915–920.
- Sah, P., Faber, E.S.L., Lopez de Armentia, M., Power, J., 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.* 83, 803–834.
- Sakai, R.R., Ma, L.Y., Zhang, D.M., McEwen, B.S., Fluharty, S.J., 1996. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. *Neuroendocrinology* 64, 425–429.
- Sakai, R.R., McEwen, B.S., Fluharty, S.J., Ma, L.Y., 2000. The amygdala: site of genomic and non-genomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. *Kidney Int.* 57, 1337–1345.
- Schulkin, J., Marini, J., Epstein, A.N., 1989. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. *Behav. Neurosci.* 103, 178–185.
- Sepúlveda, M.I., Lummis, S.C., Martin, I.L., 1991. The agonist properties of m-chlorophenylbiguanide and 2-methyl-5-hydroxytryptamine on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 104, 536–540.
- Simanski, K.J., 1996. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res.* 73, 37–42.
- Simansky, K.J., Dave, K.D., Inemer, B.D., Nicklous, D.M., Padron, J.M., Aloyo, V.J., Romano, A.G., 2004. A 5-HT_{2C} agonist elicits hyperactivity and oral dyskinesia with hypophagia in rabbits. *Physiol. Behav.* 82, 97–107.
- Smith, B.K., York, D.A., Bray, G.A., 1999. Activation of hypothalamic serotonin receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *Am. J. Physiol.* 277, R802–R811.
- Swanson, L.W., Petrovich, G.D., 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 21, 323–331.
- Tecott, L.H., Maricq, A., Julius, V.D., 1993. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1430–1434.
- Thunhorst, R.L., Johnson, A.K., 1994. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 266, R458–R465.
- Thunhorst, R.L., Lewis, S.J., Johnson, A.K., 1994. Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite. *Am. J. Physiol.* 267, R1043–R1049.
- Uphouse, L., 1997. Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 679–698.
- Van Hooft, J.A., Vijverberg, H.P., 1997. Full and partial agonists induce distinct desensitized states of the 5-HT₃ receptor. *J. Recept. Signal Transduction Res.* 17, 267–277.
- Woodwar, D.J., Moises, H.C., Waterhouse, B.D., Hoffer, B.J., Freedman, R., 1979. Modulatory actions of norepinephrine in the central nervous system. *Fed. Proc.* 38, 2109–2116.
- Zardetto-Smith, A.M., Beltz, T.G., Johnson, A.K., 1994. Role of central nucleus of the amygdala and bed nucleus of stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain Res.* 645, 123–134.
- Zhang, D.M., Epstein, A.N., Schulkin, J., 1993. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Res.* 600, 20–26.

A osmolaridade plasmática, o volume sangüíneo e a pressão sangüínea, condições básicas que permitem a perfusão tissular, são fortemente influenciados pela ingestão de sal e água. Um complexo circuito neuronal envolvendo muitas áreas e neurotransmissores cerebrais recebe, constantemente, informações relacionadas a alterações nestes parâmetros e gera respostas corretivas incluindo a estimulação ou a inibição da ingestão de água e sal. A manutenção da homeostasia hidroeletrólítica depende da quantidade de água e eletrólitos excretados pelos rins, bem como da ingestão de água e sódio. Tendo em vista que o sódio é o principal eletrólito do líquido extracelular, o controle da ingestão deste íon tem papel fundamental no balanço osmótico do organismo. Diferentes áreas cerebrais parecem estar envolvidas neste controle e, entre estas, o complexo amigdalóide desempenha função importante.

Os dados obtidos no presente estudo representam a continuação de trabalhos anteriores do nosso laboratório e fornecem respostas originadas de perguntas que resultaram dos nossos achados iniciais referentes ao papel das vias serotoninérgicas no sistema nervoso central sobre a regulação do equilíbrio hidroeletrólítico. Até o momento tínhamos encontrado os seguintes resultados.

Vínhamos estudando o papel dos receptores serotoninérgicos na homeostasia hidrossalina, mostrando que várias manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico central inibem a ingestão de água em diversos protocolos experimentais, além de reduzir a ingestão de sal induzida por depleção de sódio (De Castro e Silva et al., 1997; Castro et al., 2002a; 2002b; 2003). Estes resultados obtidos em nosso laboratório, em conjunto com outros encontrados na literatura, referendam o papel inibitório das vias serotoninérgicas centrais no controle hidrossalino. No entanto, a abordagem farmacológica utilizada nos nossos trabalhos

anteriores não nos permitiu identificar os sítios específicos de atuação destas drogas serotoninérgicas, uma vez que estas foram sempre administradas por via intracerebroventricular. Por isso, como próximo passo, decidimos investigar se a administração de drogas serotoninérgicas em sítios cerebrais específicos poderia influenciar o controle da homeostasia hidrossalina, da mesma forma que o fazem quando administradas no 3ºV. O papel do complexo amigdalóide no controle hidrossalino tem sido mostrado em diversos trabalhos. De fato, alguns estudos têm demonstrado que lesões extensas da amígdala ou de seus subnúcleos interferem na ingestão de água e no apetite por sódio induzidos por diferentes estímulos (Gentil et al., 1968, 1971; Cox et al., 1978; Saad et al., 1994; Nachman & Ashe, 1974; Nitabach et al., 1989; Schulkin et al., 1989; Zhang et al., 1993; Galaverna et al., 1992; Zardetto-Smith et al., 1994; Reilly et al., 1994). No entanto, o conhecimento sobre o papel dos diferentes neurotransmissores localizados na amígdala no controle hidrossalino ainda é escasso. Alguns trabalhos mostram que neurotransmissores como a dopamina, a acetilcolina, os mineralocorticóides e as taquicininas, atuando em seus receptores localizados no complexo amigdalóide podem interferir na homeostasia hidroeletrólítica (Mogenson & Wu, 1982; Pompei et al., 1991; Saad et al., 1994; Sakai et al., 1996; 2000). Em relação às vias serotoninérgicas centrais não foi demonstrada, até o momento, a participação dos seus diferentes receptores localizados no complexo amigdalóide sobre o controle hidrossalino. Diante disso, nos perguntamos se os receptores serotoninérgicos localizados no complexo amigdalóide poderiam estar influenciando o controle da ingestão de sódio exercido por esta estrutura. Sendo assim, no presente estudo investigamos a participação de dois dos subtipos de receptores serotoninérgicos centrais, o 5-HT₃ e o 5-HT_{2C}, localizados na amígdala sobre o controle do apetite por sódio. Além disso, tendo em vista que diferentes subnúcleos da amígdala

podem ter influências diversas sobre o apetite por sódio, decidimos estudar o papel destes receptores individualmente na amígdala medial (MeA) e na amígdala central (CeA). Os dados obtidos serão apresentados e comentados a seguir.

Inicialmente, apresentaremos os resultados relativos à investigação do papel dos receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2C} localizados na MeA sobre o apetite por sódio em ratos depletados deste íon. Os dados obtidos no presente estudo demonstram que a administração de m-CPBG, agonista serotoninérgico específico para os receptores 5-HT₃, na MeA reduz de forma significativa a ingestão de sal induzida por depleção de sódio. Este efeito antinatriorexigênico do m-CPBG parece ser dependente da ativação específica dos receptores 5-HT₃ localizados nesta área, desde que este efeito é bloqueado pelo pré-tratamento com a ondansetrona, antagonista específico para estes receptores. Entretanto, a administração da ondansetrona sozinha na MeA não modifica a ingestão de sal quer em animais depletados de sódio quer em animais normonatrêmicos. Estes dados sugerem, que os receptores 5-HT₃ localizados na MeA não exercem um tônus fisiológico inibitório no comportamento de ingestão de sódio no modelo aqui estudado. Em relação aos receptores 5-HT_{2C} localizados na MeA, verificamos que a administração do m-CPP, agonista serotoninérgico preferencial para os receptores 5-HT_{2C}, não é capaz de modificar a ingestão de solução salina hipertônica em animais depletados de sódio. Por outro lado, a administração do SDZ-SER082, antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, inibe de forma significativa a ingestão de sódio em animais depletados deste íon. Ao contrário do observado para os receptores 5-HT₃, parece haver um tônus serotoninérgico estimulatório, que depende da ativação dos receptores 5-HT_{2C} localizados na MeA, sobre o comportamento de ingestão de sal em animais depletados de sódio. Entretanto em animais normonatrêmicos a ativação destes receptores não é capaz de modificar o apetite por sódio. O efeito

antinatriorexigêncio provocado pela administração intra-amigdalóide do m-CPBG ou do SDZ-SER082 não parece ser atribuído a um efeito aversivo ou à inibição inespecífica do comportamento ingestivo causada por estes compostos, uma vez que testes comportamentais específicos para análise destes efeitos foram realizados e excluíram estas possibilidades. O significado destes testes será discutido detalhadamente mais adiante.

Os agentes farmacológicos utilizados no presente trabalho são adequados para responderem às questões aqui levantadas. A atividade do m-CPBG como agonista específico para os receptores 5-HT₃ já é bem documentada (Sepúlveda et al., 1991; Van Hooft & Vijverberg, 1997), assim como de seu antagonista, a ondansetrona (Gaster & King, 1997). Para o estudo da ação dos receptores 5-HT_{2C} utilizamos o agonista seletivo m-CPP (Simansky et al., 2004) e o antagonista SDZ-SER082 (Hernandez et al., 2003). Embora o m-CPP possa se ligar a outros receptores serotoninérgicos, ele se acopla aos receptores 5-HT_{2C} com muito maior afinidade do que aos outros subtipos de receptores serotoninérgicos. Por isso, na ausência de uma droga considerada estritamente específica para os receptores 5-HT_{2C}, o m-CPP tem sido considerado a ferramenta farmacológica mais apropriada para estudar as funções destes receptores (Hajos et al., 2003; Jakus et al., 2003; Mitchell et al., 2003; Simansky et al., 2004). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho devem ser considerados como consequência da ativação dos receptores 5-HT_{2C} pelo m-CPP.

O apetite por sal é um estado motivacional que induz à procura e ao consumo de substâncias contendo sódio em situações nas quais ocorre um balanço negativo na concentração deste íon. Embora o apetite por sódio possa ocorrer naturalmente, existe uma série de métodos experimentais específicos para induzir este tipo de apetite. No presente trabalho, empregamos o modelo de injeção subcutânea de um

diurético de alça (furosemida) associada à dieta hipossódica, protocolo este bastante utilizado em estudos sobre o apetite específico por sódio. Devido ao bloqueio do co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ na alça de Henle ascendente espessa a furosemida produz uma rápida perda urinária de água e sódio promovendo, desta forma, um estado hipovolêmico com perda de Na^+ e K^+ . Em situações de hipovolemia há aumento da ingestão hídrica resultando em hiponatremia secundária à perda urinária e diluição do sódio plasmático pela ingestão de água. A hiponatremia assim gerada leva a intenso apetite por sódio. Como no modelo aqui utilizado os animais têm acesso contínuo à água destilada, a volemia é restabelecida plenamente, enquanto os animais permanecem em hiponatremia (Fitts et al., 2007; Starbuck & Fitts, 1998). Desta forma, o papel dos neurotransmissores sobre o controle do apetite específico por sódio pode ser estudado adequadamente. Na hipovolemia induzida pela administração de furosemida, o sistema renina-angiotensina-aldosterona é ativado aumentando os níveis circulantes de ANGII, que age nos seus receptores localizados nos órgãos periventriculares como SFO, AP e OVLT que por sua vez ativa o sistema angiotensinérgico central. Desta forma, tanto o sistema angiotensinérgico periférico quanto o central estimulam a ingestão de água e sal. Por outro lado, o aumento na liberação de aldosterona leva a uma maior reabsorção de sódio pelos rins, que associada ao aumento da ingestão de sódio induzida pela ANGII, restabelece a natremia (Caloiero & Lundy, 2004; Antunes-Rodrigues et al., 2004; McKinley & Johnson, 2004; Stricker & Sved, 2000; Ruhf et al., 2001; Fitzsimons, 1998; Fitts & Thunhorst, 1996).

O conhecimento sobre a participação dos receptores 5HT_2 centrais no controle hidrossalino é comentado a seguir. Dados da literatura mostram que diferentes subtipos de receptores 5-HT_2 estão envolvidos no controle da ingestão de água e

sal (De Luca Jr et al., 2003; Castro et al., 2003; 2002a; De Gobbi et al., 2000; Menani et al., 2000; Menani et al., 1998; Menani et al., 1996; Menani & Johnson, 1995; Gentili et al., 1991). No entanto, trabalhos adicionais são necessários uma vez que os resultados encontrados até o momento apresentam divergências. Castro et al., em recentes trabalhos realizados no nosso laboratório, demonstraram que a administração i.c.v do m-CPP diminui a ingestão de sal induzida por depleção de sódio e a ingestão de água induzida por diferentes estímulos dipsogênicos (Castro et al., 2003; 2002a). A administração i.c.v de quetanserina, um antagonista inespecífico 5-HT₂, inibe o apetite por sal induzido por DOCA e por depleção de sódio (Gentili et al., 1991). Por outro lado, foi observado que a administração bilateral de metissergida, antagonista não seletivo dos receptores 5-HT₁₋₂, no LPBN aumenta de forma significativa a ingestão de salina hipertônica e de água em vários protocolos indutores de sede e do apetite por sal (De Luca Jr et al., 2003; De Gobbi et al., 2000; Menani et al., 2000; Menani et al., 1998; Menani et al., 1996; Menani & Johnson, 1995), enquanto que a administração de DOI, agonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}, nesta mesma área, inibe significativamente a ingestão de sal induzida pela injeção associada de furosemida e captopril (Menani et al., 1996). Estes efeitos aparentemente contraditórios da estimulação dos receptores da família 5-HT₂ sobre a ingestão de sal mostram que, dependendo da área central em que estes receptores estão localizados e do subtipo envolvido, os mesmos podem exercer efeitos diferentes neste parâmetro fisiológico. Isto está de acordo com o fato de que as famílias de receptores serotoninérgicos operam múltiplas funções no SNC e a ativação dos mesmos receptores pode gerar efeitos distintos dependendo da área central em que este esteja localizado.

Além dos trabalhos supracitados, nos últimos anos nosso laboratório também tem estudado extensivamente o papel das vias serotoninérgicas centrais no controle

do equilíbrio hidrossalino, demonstrando que, além dos receptores 5-HT₂, outros receptores serotoninérgicos centrais também estão envolvidos no controle da ingestão de água e sal. A ativação farmacológica dos receptores 5-HT_{1D} inibe de forma significativa a ingestão de água induzida pela estimulação colinérgica, angiotensinérgica e adrenérgica central (De Castro e Silva et al., 1997). Além disso, também foi mostrado que os receptores 5-HT₄ parecem exercer um papel distinto sobre o controle da ingestão de água, uma vez que o bloqueio dos mesmos potencializa o efeito dipsogênico da ANGII, mas inibe o mesmo efeito induzido pela estimulação colinérgica central (Castro et al., 2000). Verificamos também que a estimulação farmacológica central dos receptores 5-HT₃ inibe a ingestão de água induzida por diferentes estímulos fisiológicos, bem como a ingestão de sódio em animais depletados deste íon (Castro et al., 2002b; 2003). Embora o tipo de abordagem farmacológica utilizada nestes trabalhos não nos possibilite identificar os sítios específicos de ação dos agentes serotoninérgicos, acreditamos que estes resultados sejam provenientes da ação destas drogas em estruturas periventriculares relacionadas com o controle hidroeletrólítico.

No presente estudo, investigamos o papel dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala, uma vez que dados anteriores do nosso laboratório mostraram o possível envolvimento destes receptores no controle do apetite por sódio. Os receptores 5-HT₃, encontram-se localizados em diversas áreas do SNC responsáveis pelo controle hidrossalino como hipotálamo, complexo amigdalóide, área septal medial, núcleo do trato solitário, área postrema e núcleo parabraquial lateral (Tecott et al., 1993; Morales & Bloom, 1997; Bloom & Morales, 1998). A localização destes receptores em áreas centrais implicadas no controle hidroeletrólítico sugere que os mesmos participam, de alguma forma, do controle do apetite específico por sal. Além disso, a ativação dos receptores 5-HT₃ está implicada na modulação da

liberação de diversos neurotransmissores envolvidos no controle da homeostasia hidrossalina em diferentes áreas cerebrais. Já existem dados mostrando que a ativação dos receptores 5-HT₃ pelo agonista m-CPBG estimula a liberação de dopamina na área tegmental ventral e posterior, no núcleo accumbens, no estriado e no córtex pré-frontal (Alex & Pehek, 2007; Liu et al., 2006; Chen et al., 1992), além de aumentar a liberação de noradrenalina em regiões límbicas (Mongeau et al., 1994). Também foi observado que a administração do m-CPBG estimula a liberação de GABA no hipocampo e na amígdala (Turner et al., 2004; Katsurabayashi et al., 2003; Koyama et al., 2000). Por outro lado, estes receptores parecem exercer uma influência inibitória na neurotransmissão colinérgica, uma vez que a ativação destes pelo m-CPBG inibe a liberação de acetilcolina em sinaptossomos corticais, no córtex parietal e no hipocampo, enquanto que o seu bloqueio por antagonistas específicos estimula a liberação deste neurotransmissor (Giovannini et al., 1998; Crespi et al., 1997; Diez-Ariza et al., 2002; 1998; Ramirez et al., 1996). Dados do nosso laboratório mostram que a ativação central dos receptores 5-HT₃ diminui significativamente a ingestão de água em vários protocolos experimentais que induzem sede e a ingestão de sódio em animais sódio-depletados (Castro et al., 2002a; 2003). Desta forma, podemos especular que o efeito antinatriorexigênico do m-CPBG observado no presente trabalho pode ser resultado da ação modulatória da serotonina mediada pelos receptores 5-HT₃ sobre a liberação destes neurotransmissores nos núcleos central e medial da amígdala. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar se a ação modulatória dos receptores 5-HT₃ sobre estes neurotransmissores pode ser, realmente, responsável pela resposta antinatriorética aqui observada.

O efeito inibitório da administração do m-CPBG na MeA sobre o apetite específico por sódio, observado no presente trabalho, é condizente com resultados

anteriores do nosso laboratório, nos quais foi mostrado que a injeção intracerebroventricular deste composto inibe a ingestão de sódio no mesmo modelo experimental utilizado neste trabalho (Castro et al., 2003). De fato, no presente estudo a dose maior do m-CPBG (160nmol/0,5ul) bloqueou a resposta natriorexigênica induzida pela depleção de sódio. Estes resultados em conjunto, sugerem que ativação dos receptores 5-HT₃ centrais parecem exercer um efeito inibitório no apetite específico por sódio induzido por depleção deste íon. O efeito antinatriorexigênico induzido pela administração i.c.v, assim como na MeA do m-CPBG parece representar uma ação farmacológica desta droga, uma vez que a ondansetrona, antagonista dos receptores 5-HT₃, não é capaz de aumentar a ingestão de sódio em animais normonatrêmicos ou em animais depletados de sódio, sugerindo assim a ausência de um tônus fisiológico inibitório dos receptores 5-HT₃ localizados neste núcleo amigdalóide sobre a ingestão de sal. Os resultados do presente estudo e aqueles de trabalho anterior do nosso grupo levam a concluir que a ativação dos receptores 5-HT₃ localizados na MeA produz o mesmo efeito antinatriorexigênico gerado pela ativação farmacológica destes receptores em regiões periventriculares.

O presente estudo também contribui com o conhecimento da participação dos receptores 5-HT_{2C} no controle hidrossalino, na medida em que utilizamos drogas serotoninérgicas mais específicas e que estudamos as ações destes em duas áreas cerebrais distintas. A administração de m-CPP, agonista preferencial dos receptores 5-HT_{2C}, na MeA não foi capaz de modificar a ingestão de sal em ratos depletados de sódio. Por outro lado, a administração do SDZ-SER082 neste mesmo núcleo amigdalóide induziu uma redução na ingestão de sal em animais submetidos ao mesmo protocolo experimental. Este resultado sugere que a atividade serotoninérgica endógena sobre os receptores 5-HT_{2C} localizados na MeA parece

ser necessária para a expressão do apetite por sódio em animais depletados deste íon. O fato da administração do m-CPP ter falhado em aumentar a ingestão de sal em ratos depletados de sódio, sugere que a ativação dos receptores 5-HT_{2c} localizados na MeA não foi capaz de intensificar o consumo de sódio, já extremamente alto, que resulta da ativação de vários mecanismos indutores da ingestão de sal, normalmente ativados durante a depleção de sódio.

O receptor 5-HT_{2c}, um receptor serotoninérgico que parece existir somente no SNC, tem uma ampla distribuição, estando presente em áreas límbicas, como o complexo amigdalóide e núcleos hipotalâmicos, que participam dos mecanismos de controle da homeostasia hidrossalina (Barnes & Sharp, 1999; Clement et al., 2000; Giorgetti & Tecott; 2004). Como comentamos acima, os receptores 5-HT₃ exercem efeito modulatório sobre a liberação de diversos neurotransmissores, efeitos similares parecem ser exercidos pelos receptores 5-HT₂ centrais. De fato, estes receptores modulam a liberação de glutamato (Hasuo et al., 2002), catecolaminas (Gobert et al., 2000) e GABA (Serrats et al., 2005), além de aumentar a função sináptica mediada pelos receptores NMDA na amígdala basolateral (Chen et al., 2003). Trabalhos futuros são necessários para definir se a interação dos receptores 5-HT_{2c} com outros neurotransmissores é importante para explicar o resultado obtido no presente trabalho

O complexo amigdalóide é uma estrutura límbica que está implicada no controle de uma série de respostas emocionais e viscerais. Os núcleos amigdalóides possuem conexões com várias estruturas prosencefálicas envolvidas no controle do apetite específico por sódio, como o órgão subfornical e a área anteroventral do terceiro ventrículo, principalmente através das vias angiotensinérgicas. Além disso, a amígdala também recebe e envia projeções para estruturas romboencefálicas que possuem papel importante no controle

hidrossalino. De fato, já existem dados mostrando que informações viscerais provenientes de fibras sensoriais autonômicas alcançam os núcleos amigdalóides através das conexões que estes mantêm com o núcleo do trato solitário, a área postrema, o núcleo parabraquial lateral e o locus coeruleus (Sah et al., 2003; Johnson et al., 1999). Através dessas conexões o complexo amigdalóide interpreta estímulos externos e internos, integrando sinais viscerais do conteúdo de sódio e sinais somáticos (gosto), preparando o animal para o comportamento de procura e ingestão de água e de sódio (Albrecht et al., 2003; Johnson et al., 1999; Johnson & Thunorst, 1997).

A maioria dos estudos sobre o envolvimento do complexo amigdalóide no controle hidrossalino foi realizado em estruturas que compõem a amígdala estendida como a MeA, a CeA e o BNST. Estas estruturas possuem similaridades funcionais, estruturais e neuroquímicas, além de estarem reciprocamente conectadas com diversos núcleos centrais envolvidos no balanço hidroeletrolítico e no controle cardiovascular (Johnson et al., 1999). Estas características, em conjunto, justificam o grande interesse na investigação do papel desta estrutura na homeostasia hidrossalina.

Os diferentes núcleos do complexo amigdalóide recebem ampla inervação serotoninérgica proveniente do núcleo dorsal da rafe (Fallon & Ciofi, 1992). Além das terminações nervosas serotoninérgicas, também são encontrados nos núcleos amigdalóides uma grande quantidade dos diversos tipos de receptores serotoninérgicos, incluindo os receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2C} (Hoyer et al., 2002; Barnes & Sharp, 1999; Tecott et al., 1993). Por isso, a participação dos receptores serotoninérgicos localizados na amígdala nos processos fisiológicos regulados por esta área é de grande interesse para compreensão dos mecanismos de controle do balanço hidrossalino.

Uma vez observado que os receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2C} localizados na MeA exercem papel importante no controle do apetite por sódio em animais depletados deste íon, decidimos, então, investigar se estes mesmos receptores localizados em outro subnúcleo amigdalóide (CeA) também estariam participando do controle deste parâmetro fisiológico. Desta forma, na segunda parte do presente estudo, investigamos a participação dos receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2C} localizados na CeA sobre o apetite específico por sódio. Observamos que a administração do m-CPBG, agonista específico dos receptores 5-HT₃, da mesma forma que na MeA, induz potente efeito inibitório sobre o consumo de solução salina hipertônica induzido por depleção de sódio. Este efeito antinatriorexigênico do m-CPBG também parece ser devido à interação deste composto com os receptores 5-HT₃ localizados nesta área, desde que o pré-tratamento com a ondansetrona bloqueia completamente o seu efeito. De forma semelhante ao observado na MeA, os receptores 5-HT₃ presentes na CeA também não parecem exercer tônus inibitório endógeno sobre a ingestão de sódio, uma vez que a administração da ondansetrona sozinha não é capaz de modificar a ingestão de sal em animais depletados deste íon. Diferente do que foi verificado na MeA, a atividade dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} na CeA não parece desempenhar papel significativo no controle do apetite por sódio, desde que tanto a administração do agonista, quanto do antagonista específicos para estes receptores não modifica a ingestão de sódio em animais depletados deste íon. Além disso, observamos que o efeito inibitório do m-CPBG sobre a ingestão de sal não parece ser consequência de efeitos aversivos promovidos pela administração desta droga na CeA nem por alterações locomotoras ou por inibição inespecífica do comportamento de ingestão.

Embora a estimulação dos receptores 5-HT₃ localizados na MeA e CeA tenha inibido a ingestão de sal em animais depletados de sódio, observamos que o m-

CPBG administrado na CeA promoveu um efeito antinatriorexigênico mais potente do que o observado após a sua administração na MeA. Isto sugere que a estimulação dos receptores 5-HT₃ localizados na CeA parece ser mais expressiva na ativação de circuitos inibitórios responsáveis pela diminuição do apetite por sódio aqui observado.

Em relação aos receptores 5-HT_{2C}, verificamos que a administração do m-CPP na CeA não altera o apetite específico por sal em animais depletados de sódio, efeito semelhante ao observado com a administração deste composto na MeA. Ao contrário, a administração do SDZ-SER082 apresenta efeito inibitório na ingestão de sódio apenas quando injetado na MeA, mas não na CeA. Estes resultados sugerem que os receptores 5-HT_{2C} localizados na CeA não parecem participar dos mecanismos de modulação da ingestão de sal, pelo menos no modelo aqui empregado.

O envolvimento dos núcleos medial e central da amígdala no controle da ingestão de água e sal tem sido comprovado em uma série de estudos nos quais lesões destes núcleos amigdalóides promovem inibição na ingestão de sal induzida por diferentes protocolos experimentais, mostrando que a integridade funcional destes núcleos exerce importante função no controle destes parâmetros fisiológicos (Nitabach et al., 1989; Schulkin et al., 1989; Zhang et al., 1993; Galaverna et al., 1992; Zardetto-Smith et al., 1994). No entanto, são raros os dados da literatura mostrando o envolvimento de vias neurotransmissoras localizadas em núcleos amigdalóides específicos com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico. De fato, até o momento, só identificamos na literatura três trabalhos que mostram o envolvimento de neurotransmissores localizados em núcleos específicos da amígdala com o controle do equilíbrio hidrossalino, sendo dois destes desenvolvidos em nosso laboratório e outro pelo grupo de Mogenson & Wu. No

nosso laboratório demonstramos que: 1) a ativação dos receptores 5-HT₃ presentes na MeA e CeA inibe a ingestão de sal em animais sódio depletados e 2) a integridade funcional dos receptores 5-HT_{2C} localizados na MeA é importante para a expressão do apetite por sódio neste modelo experimental (Luz et al., 2006; 2007). O grupo de Mogenson & Wu verificou que a administração de agonistas e antagonistas dopaminérgicos na CeA aumenta a ingestão de sal (Mogenson & Wu, 1982).

Existe um número substancial de trabalhos mostrando que variações na pressão sangüínea podem interferir no apetite por sódio e no comportamento ingestivo de sal. Estes estudos têm demonstrado que a diminuição da pressão sangüínea estimula a ingestão de sódio, enquanto que estados de hipertensão aguda a diminuem (Johnson & Thunhorst, 1997). Em situações de hipovolemia induzida por administração de polietileno-glicol e furosemida o apetite por sódio é rapidamente desenvolvido se estes tratamentos forem associados a agentes hipotensores, como o captopril (Stricker, 1983; Thunhorst & Johnson, 1994). Além disso, foi observado que animais tratados com furosemida + captopril têm o apetite específico por sódio diminuído, quando infusões de fenilefrina são usadas para manter a pressão sangüínea em seus níveis normais (Thunhorst & Johnson, 1994). Por outro lado, o aumento agudo da pressão sanguínea parece diminuir o apetite por sal. Em ratos hipotensos, a ingestão de sal induzida pela ANGII é inibida tão logo a pressão sangüínea retorne aos seus níveis normais (Fitts & Thunhorst, 1996).

O envolvimento do sistema serotoninérgico central no controle cardiovascular também tem sido bastante estudado. Vários trabalhos têm mostrado que a administração central de serotonina ou de seus agonistas induz efeitos cardiovasculares diversos como bradicardia, hipotensão, vasodilatação ou

hipertensão, taquicardia e vasoconstricção. Os principais receptores serotoninérgicos envolvidos no controle central cardiovascular são os receptores, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇ (Côté et al., 2004; Ramage, 2001). Recentemente, no nosso laboratório, mostramos que a administração i.c.v de m-CPBG, agonista dos receptores 5-HT₃, diminui a pressão sanguínea arterial média (PAM), sem interferir com a frequência cardíaca em ratos não estressados. Ao contrário, em ratos estressados, o m-CPBG bloqueia a resposta hipertensiva e diminui a taquicardia induzida pelo estresse de restrição. Por outro lado, a administração do antagonista dos receptores 5-HT₃, ondansetrona, aumenta a PAM em animais não estressados, sem interferir com a resposta hipertensiva induzida pelo estresse (Ferreira et al., 2004).

Dados anatômicos, fisiológicos e comportamentais têm demonstrado que a CeA está especialmente envolvida na modulação de variações cardiovasculares (Ohta et al., 1991). Estudos com estimulação química ou elétrica da CeA induzem alterações da pressão sanguínea similares àsquelas induzidas pela ativação de áreas bulbares envolvidas no controle cardiovascular (Gelsema et al., 1987; Iwata et al., 1987). Diante do exposto, decidimos investigar se o efeito antinatriorexigênico observado após a administração do m-CPBG na CeA poderia ser resultante do efeito deste sobre a pressão sanguínea. No entanto, observamos que a estimulação dos receptores 5-HT₃ localizados na CeA pelo m-CPBG não altera a pressão sanguínea em ratos submetidos ao mesmo protocolo experimental utilizado para estudar a ingestão de sal. Desta forma, podemos concluir que o efeito antinatriorexigênico obtido no presente trabalho após a administração do m-CPBG na CeA não é consequência do aumento da pressão sanguínea.

Um dos principais problemas em estudos de comportamento ingestivo, que investigam mecanismos inibitórios, é verificar se o efeito observado é específico

para o parâmetro avaliado. Como a administração de m-CPBG causa efeitos adversos como náusea e ansiedade (Faerber et al., 2007), e no presente trabalho observamos que a administração deste agente na MeA e CeA induz uma resposta inibitória na ingestão de sódio, decidimos, então, investigar se esta resposta poderia ter sido consequência de um efeito aversivo ou de uma inibição do comportamento ingestivo em geral, promovido pela ativação dos receptores 5-HT₃. Para responder a este questionamento, utilizamos dois testes comportamentais específicos, o teste de aversão e o teste de “sobremesa”, que nos possibilitam verificar se a inibição na ingestão de sódio observada após a administração do m-CPBG na MeA e na CeA é específica para este parâmetro.

No primeiro, o teste de aversão, o principal objetivo é averiguar se a administração do m-CPBG nos núcleos amigdalóides aqui estudados poderia estar provocando situações de mal-estar, levando à redução da ingestão de sódio. Neste teste os animais são condicionados a associar o mal-estar induzido pela injeção intraperitoneal (i.p.) de LiCl (cloreto de lítio), um agente causador de náusea, com a ingestão de uma substância nova, que neste caso é, a sacarina 0,25%. Na primeira fase deste experimento, a ingestão de sacarina é associada à administração i.p. de LiCl ou à injeção central de m-CPBG. Em seguida, um dia após a primeira fase, a sacarina é oferecida novamente e o volume ingerido é registrado. Desta forma, observamos que o efeito antinatriorexigênico provocado pela administração intra-amigdalóide do m-CPBG não parece ser atribuída a um efeito aversivo causado por este composto, uma vez que os animais que receberam injeção central de m-CPBG ingeriram a mesma quantidade de sacarina (0,25%) quando comparados aos animais controle. Ao contrário, os animais que receberam injeção de LiCl associaram o mal-estar causado por este composto ao sabor da sacarina e, na

segunda vez em que esta foi oferecida, houve uma redução significativa no seu consumo quando comparada com o grupo controle.

No segundo teste utilizado, o teste de “sobremesa”, o objetivo é investigar se a inibição da ingestão de sódio após a administração do m-CPBG na MeA e na CeA poderia estar sendo causada por um efeito inibitório generalizado induzido por este composto no SNC, que resultasse em alterações locomotoras ou em supressão inespecífica dos comportamentos ingestivos em geral. Observamos neste teste que o m-CPBG não foi capaz de inibir a ingestão de sacarina, o que representa um comportamento hedônico em ratos, sugerindo, desta forma, que o efeito inibitório deste composto na ingestão de sal não é causado pelo bloqueio do comportamento ingestivo em geral ou por alterações locomotoras.

Também observamos que a inibição da ingestão de sal observada após a administração do SDZ-SER082, antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, na MeA não parece ser resultante de um efeito aversivo ou de uma inibição do comportamento ingestivo em geral promovido pelo bloqueio dos receptores 5-HT_{2C}, uma vez que a administração de SDZ-SER082, na mesma dose capaz de inibir a ingestão de sódio, não foi capaz de inibir a ingestão de sacarina em nenhum dos dois testes utilizados.

Vale ressaltar que os dados obtidos no presente estudo dependem da atividade dos receptores 5-HT₃ e 5-HT_{2C} especificamente localizados na MeA e na CeA, desde que tanto a administração dos agonistas quanto dos antagonistas em sítios vizinhos a estes subnúcleos não apresentaram qualquer efeito.

Os núcleos amigdalóides, estudados no presente trabalho, possuem conexões com outras estruturas cerebrais relacionadas com o controle hidroeletrólítico. De fato, a MeA recebe e emite projeções para a zona neuroendócrina do hipotálamo como o núcleo paraventricular, além de enviar projeções para o núcleo ventromedia!

hipotalâmico (De Olmos et al., 2004; Sah et al., 2003; Pitkänen, 2000; McDonald, 1998), enquanto a CeA se comunica com áreas como o hipotálamo, o BNST, o SFO, o OVLT, e a AP, além de manter conexões recíprocas com o bulbo, através do NTS, e com a ponte, através do LPBN, que são estruturas processadoras de informações gustatórias, olfatórias e viscerais (De Olmos et al., 2004; Sah et al., 2003; Lundy & Norgren, 2001; Pitkänen, 2000; McDonald, 1998). Assim sendo, acreditamos que os efeitos aqui observados após as manipulações farmacológicas dos receptores serotoninérgicos localizados na amígdala são justamente devidos ao controle que estes exercem sobre as circuitarias que conectam anatomofuncionalmente a amígdala às áreas neuroendócrinas vinculados ao controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

Tanto a MeA como a CeA possuem uma quantidade expressiva de neurônios GABAérgicos (Sah et al., 2003; Swanson & Petrovich, 1998). Os receptores 5-HT₃ são expressos em neurônios GABAérgicos, em muitas áreas cerebrais, inclusive no complexo amigdalóide. Segundo Bloom & Morales, 90% dos neurônios que expressam estes receptores no neocórtex e na formação hipocampal são GABAérgicos, enquanto que em regiões telencefálicas, incluindo o complexo amigdalóide e a área septal, cerca de 70 a 95% destes neurônios expressam receptores 5-HT₃ (Bloom & Morales, 1998). Como já foi dito anteriormente, a localização pré-sináptica dos receptores serotoninérgicos favorece a modulação da liberação de GABA pelos interneurônios GABAérgicos localizados nestas regiões. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório encontrado no SNC e já existem dados na literatura mostrando que a ativação dos seus receptores exerce papel inibitório na ingestão de água e sal induzida pela ANGII (Fitzsimons, 1998). Por isso, não podemos deixar de levar em consideração que a ativação dos receptores 5-HT₃ pelo agonista m-CPBG na MeA e CeA pode estar aumentando a liberação de GABA

nestes núcleos, e este, por sua vez, exerça um papel inibitório no apetite por sal estudado no presente trabalho.

Uma série de estudos tem sido realizada na tentativa de elucidar o papel funcional dos receptores 5-HT₃ no SNC. No entanto, ainda hoje, as funções e os mecanismos neuronais dos quais estes receptores participam permanecem elusivos. Embora as funções fisiológicas dos receptores 5-HT₃ sejam pouco evidenciadas, estes receptores parecem exercer um papel importante em situações patológicas relacionadas à liberação aumentada de serotonina. Uma grande variedade de antagonistas para os receptores 5-HT₃ tem sido desenvolvida, e embora estes fármacos não interfiram em aspectos comportamentais normais ou induzam mudanças fisiológicas em indivíduos saudáveis, tem sido observada uma grande eficácia clínica desses antagonistas no controle da emese induzida por quimio/radioterapia e pós-operativa, na diarreia induzida pela síndrome do intestino irritável, na fadiga crônica, no alcoolismo, na nocicepção e na ansiedade. Além disso, a possibilidade de utilização desses antagonistas no controle da obesidade, na esquizofrenia e na imunomodulação tem sido vista com bastante interesse pela comunidade científica (Faerber et al., 2007; Farber et al., 2004). Por isso, do ponto de vista clínico, o esclarecimento do papel exercido pelos receptores 5-HT₃ neste parâmetro de vital importância para o equilíbrio hidroeletrolítico, como a ingestão de sal, é considerado relevante.

Drogas serotoninérgicas que atuam nos receptores da família 5-HT₂ também têm sido bastante utilizadas na prática médica para o controle de uma série de distúrbios do SNC, tais como ansiedade, depressão, esquizofrenia, enxaqueca, insônia e obesidade (Giorgetti & Tecott, 2004; Bickerdike, 2003; Akiyoshi et al., 1996; Baxter et al., 1995). Por isso, a identificação de ações farmacológicas das

drogas 5-HT₂ utilizadas no presente trabalho sobre o apetite específico por sódio pode ser considerada relevante.

Com os resultados do presente estudo confirmamos as hipóteses de que a ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ localizados na amígdala medial e central inibe o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon. Vale salientar, que apenas a ativação farmacológica destes receptores foi efetiva em inibir o apetite por sódio, desde que a administração na CeA e na MeA do agonista específico dos receptores 5-HT₃, o m-CPBG, inibiu o apetite por sódio, enquanto a administração do antagonista específico, a ondansetrona, foi incapaz de modificar a ingestão de sódio induzida por depleção deste íon. Desta forma, fica claro que os receptores 5-HT₃ podem desempenhar algum papel controlador no apetite por sódio, mas não parece haver um tônus serotoninérgico endógeno que atue nestes receptores e module o apetite por sódio. Ao que se refere à ativação dos receptores 5-HT_{2C}, confirmamos a hipótese de que a ativação destes receptores localizados na amígdala medial estimula o apetite específico por sódio em animais depletados deste íon, desde que a administração do antagonista específico, SDZ-SER082, neste núcleo amigdalóide, inibiu a ingestão de sódio. Entretanto a ativação farmacológica dos receptores 5-HT_{2C} não provocou qualquer alteração da ingestão de sódio nas mesmas condições experimentais. Além disso, a presença dos receptores 5-HT_{2C} na amígdala central não parece exercer papel significativo no controle do apetite por sódio, desde que tanto a administração do agonista, quanto do antagonista específico para estes receptores, neste núcleo, não modificou a ingestão de sódio provocada pela depleção deste íon. Este dado confirma a hipótese nula de que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} localizados na amígdala central não altera o apetite específico por sódio induzido por depleção deste íon.

Assim os resultados obtidos no presente trabalho complementam dados anteriores do nosso laboratório que demonstram um papel inibitório das vias serotoninérgicas centrais no controle do apetite por sódio. No presente estudo mostramos que a administração em núcleos específicos do complexo amigdalóide de drogas serotoninérgicas específicas para os receptores 5HT₃ e 5HT_{2C} pode interferir de forma diversa sobre o controle do apetite específico por sódio. Além disso, evidenciamos que a natureza funcional dos receptores serotoninérgicos envolvidos no controle do equilíbrio hidroeletrolítico está associada a sua localização anatômica. A obtenção destes dados tem importância indiscutível, uma vez que são poucos os trabalhos que tentam compreender o papel da serotonina na regulação do apetite específico por sódio.

Os resultados aqui observados permitem concluir que a estimulação farmacológica dos receptores 5-HT₃ localizados na amígdala medial e central induz um significativo efeito antinatriorexigênico em ratos depletados de sódio e que, na CeA este efeito é mais potente do que na MeA.

Além disso, também podemos concluir que os receptores 5-HT_{2C} localizados na CeA não parecem estar envolvidos nos mecanismos de controle da ingestão de sal induzido por depleção de sódio, enquanto na MeA estes receptores parecem mediar um tônus endógeno estimulatório que é fundamental para o controle do apetite por sódio no modelo aqui estudado.

ROLE OF 5-HT₃ and 5-HT_{2c} RECEPTORS WITHIN AMYGDALA IN THE CONTROL OF SALT INTAKE IN RATS. Many central nervous system areas participate in the control of water and salt intake. They constitute a large neural network that coordinates visceral and behavioral responses tailored to maintain hydrosaline balance. Some studies have demonstrated that the activation of distinct neurochemical pathways using serotonin, acetylcholine, catecholamines, angiotensin, opioids and GABA leads to changes in water and salt intake. In the present study, we have analyzed the role of 5-HT₃ and 5-HT_{2c} receptors localized within the medial (MeA) and central (CeA) amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. We have found that the administration of m-CPBG, a specific 5-HT₃ receptor agonist, into the MeA inhibits salt intake in sodium-depleted rats. This antinatriorexic effect seems to be mediated by 5-HT₃ receptors since pretreatment with ondansetron, a selective 5-HT₃ receptor antagonist, impairs m-CPBG inhibition of salt intake. The administration of ondansetron alone into the MeA failed to change salt intake in sodium-depleted rats. Also, we have demonstrated that the administration of m-CPP, a 5-HT_{2c} agonist, into the MeA was not able to change salt intake induced by sodium depletion. In contrast, the injection of SDZ-SER082, a selective 5-HT_{2c} receptor antagonist, into this same region reduced salt intake after sodium depletion. The antinatriorexic effect of both m-CPBG and SDZ-SER 082 is not due to aversive effects or locomotor deficits induced by the administration of these drugs into the MeA, since adequate tests have excluded these possibilities. The administration of m-CPBG into the CeA also induced a significant reduction of salt intake in sodium depleted rats, an effect that is similarly blocked by the pretreatment with ondansetron. The injection of ondansetron alone into the CeA failed to alter salt intake in sodium depleted rats. Again, we have used suitable tests to exclude that the inhibitory effect on salt intake induced by the administration of m-CPBG into the CeA could be related to aversive effects or locomotor deficits or to an increase in blood pressure. The administration of m-CPP and SDZ-SER082 into the CeA failed to modify salt intake after sodium depletion. It is concluded that the pharmacological stimulation of 5-HT₃ receptors into the MeA and CeA induces a significant antinatriorexic effect in sodium depleted rats and that the functional integrity of 5-HT_{2c} receptors located into the MeA is essential to the expression of sodium appetite in rats.

Key-words: 1. Amygdaloid complex; 2. Sodium appetite 3. 5-HT_{2c} receptors; 4. 5-HT₃ receptors; 5. Serotonin

1. Akiyoshi J, Isogawa K, Yamada K, Nagayama H, Fuji F. Effects of antidepressants on intracellular Ca^{2+} mobilization in CHO cells transfected with the human 5-HT_{2C} receptors. *Biological Psychiatry* 39: 1000–8, 1996.
2. Albrecht D, Hellner K, Walther T, Von-Bohlen Und Haubach O. Angiotensin II and amygdala. *Annual New York Academy of Sciences* 985: 498-500, 2003.
3. Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacology & Therapeutics* 113: 296-320, 2007.
4. Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann AM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews* 84: 169-208, 2004.
5. Badauê-Passos Jr D, Ventura RR, Silva LF, Olivares EL, Reis LC. Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite of euthyroid and hypothyroid rats. *Experimental Physiology* 88: 251-60, 2003.
6. Bagdy G, Kalogeras KT, Szemeredi K. Effect of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ receptor stimulation on excessive grooming, penile erection and plasma oxytocin concentrations. *European Journal of Pharmacology* 229: 9-14, 1992.
7. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-152, 1999.
8. Baxter GS, Kennett GA, Blackburn TP, Blaney F. 5-HT₂ receptor subtypes, a family reunited? *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 105-10, 1995.
9. Bickerdike MJ. 5-HT_{2C} receptor agonists as potential drugs for the treatment of obesity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3: 885–97, 2003.
10. Bloom FE, Morales M. The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders. *Neurochemical Research* 23: 653-9, 1998.

11. Bobillier P, Seguin S, De Gueurce A, Lewis BD, Pujol JF. The efferent connections of the nucleus raphe centralis superior in the rat as revealed by radioautography. *Brain Research* 166: 1-8, 1979.
12. Bockaert J, Pin JP. Use of a G-protein-coupled receptor to communicate: an evolutionary success. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 321: 529-51, 1998.
13. Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33: 275-317, 1994.
14. Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, Durkin MM, Mengod G, Branchek TA, Hoyer D, Palacios JM. Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} alpha, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology* 33: 367-86, 1994.
15. Brun SRM, Luz V, Fernandez MF, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. *Regulatory Peptide* 98: 127-35, 2001.
16. Brunet-Gouet E, Decety J. Social brain dysfunctions in schizophrenia: a review of neuroimaging studies. *Psychiatry Research* 148: 75-92, 2006.
17. Caloiero V, Lundy RF. A novel method for induction of salt appetite in rats. *Brain Research Bulletin* 64: 1-7, 2004.
18. Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17: 317-26, 1996.
19. Castro L, Athanazio R, Barbeta M, Ramos AC, Ângelo AL, Campos I, Varjão B, Ferreira HS, Fregoneze JB, De Castro e Silva E. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Research* 981: 151-9, 2003.

20. Castro L, De Castro e Silva E, Lima AKS, Souza FS, Maldonado I, Macedo DF, Ferreira MG, Santamaría GF, Bandeira IPV, Amor ALM, Carvalho FLQ, Rocha Jr MA, Oliveira IR, Fregoneze JB. Central 5-HT₄ receptors and drinking behavior. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 66: 443-8, 2000.
21. Castro L, Maldonado I, Campos I, Varjão B, Ângelo AL, Athanazio RA, Barbetta MC, Ramos AC, Fregoneze JB, De Castro e Silva E. Central administration of m-CPP, a serotonin 5-HT_{2B/2C} agonist, decreases water intake in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 72: 891-8, 2002a.
22. Castro L, Varjão B, Maldonado I, Campos I, Duque B, Fregoneze JB, Oliveira IR, De Castro e Silva E. Central 5-HT₃ receptors and water intake in rats. *Physiology & Behavior* 77: 349-59, 2002b.
23. Cavalcante-Lima HR, Lima HR, Costa e Sousa RH, Olivares EL, Cedraz-Merchez PL, Reis RO, Badaue-Passos Jr D, De Luca Jr W, De Medeiros MA, Cortes WS, Reis LC. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. *Neuroscience Letters* 374: 5-10, 2005.
24. Chen A, Hough J, Li H. Serotonin type II receptor activation facilitates synaptic plasticity via N-methyl-d-aspartate-mediated mechanism in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 119: 53-63, 2003.
25. Chen J, Paredes W, van Praag HM, Lowinson JH, Gardner EL. Presynaptic dopamine release is enhanced by 5-HT₃ receptor activation in medial prefrontal cortex of freely mixing rats. *Synapse* 10: 264-6, 1992.
26. Cho S, Hu Y. Activation of 5-HT₄ receptors inhibits secretion of β -amyloid peptides and increases neuronal survival. *Experimental Neurology* 203: 274-8, 2007.
27. Clement DA, Punhani T, Duxon MS, Blackburn TP, Fone KCF. Immunohistochemical localization of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology* 39: 123-32, 2000.

28. Colombari DS, Menani JV, Johnson AK. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *American Journal of Physiology* 271: R1470-6, 1996.
29. Colombari E, Saad WA, Camargo LAA, Renzi, A, De Luca Jr LA, Menani JV. Role of central $\alpha 1$ – and $\alpha 2$ – adrenoceptors on the dipsogenic and cardiovascular effect of angiotensin II. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 36: 893-6, 1989.
30. Cooper SJ, Barber DJ. Effects of d-fenfluramine, MK-212, and ondansetron on saline drinking in two choice tests in the rehydrating rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 45: 593-6, 1993.
31. Cooper SJ, Ciccocioppo R. Effects of selective 5-HT₁ receptor agonists in water-deprived rats on salt intake in two-choice tests. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 45: 513-8, 1993.
32. Côté F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vodjani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends in Molecular Medicine* 10: 233-8, 2004.
33. Cox JR, Cruz CE, Ruger J. Effect of total amygdectomy upon regulation of salt intake in rats. *Brain Research Bulletin* 3: 431-5, 1978.
34. Crespi D, Gobbi, M, Mennini T. 5-HT₃ serotonin hetero-receptors inhibit [3h] acetylcholine release in rat cortical synaptosomes. *Pharmacological Research* 35: 351-4, 1997.
35. Da Silva RA, De Oliveira ST, Hackl LPN, Spilere CI, Faria MS, Marino-Neto J, Paschoalini MA. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D/1B} receptors agonists in the pigeon. *Brain Research* 1026: 275–83, 2004.

36. Dabire H, Cherqui C, Fournier B, Schmitt H. Comparison of effects of some 5-HT₁ agonists on blood pressure and heart rate of normotensive anaesthetized rats. *European Journal of Pharmacology* 140: 259-66, 1987.
37. Daniels D, Fluharty SJ. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. *Physiology & Behavior* 81: 319-37, 2004.
38. De Castro e Silva E, Luz PA, Magrani J, Andrade L, Miranda N, Pereira V, Fregoneze JB. Role of the central opioid system in the inhibition of water and salt intake induced by central administration of IL-1 β in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 83: 285-95, 2006.
39. De Castro e Silva E, Sarmiento C, Nascimento TA, Luz CP, Soares T, Marinho C, Cunha M, Bulcão C, De Oliveira IR, Fregoneze JB. Effect of third ventricle administration of L-694-247, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on water intake in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 57: 749-54, 1997.
40. De Gobbi JI, Barbosa SP, De Luca LA Jr, Thunhorst RL, Johnson AK, Menani JV. Activation of serotonergic 5-HT(1A) receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. *Brain Research* 1066: 1-9, 2005.
41. De Gobbi JI, De Luca Jr LA, Menani JV. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Research* 880: 131-8, 2000.
42. De Luca Jr LA, Barbosa SP, Menani JV. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience* 121: 1055-61, 2003.
43. De Mello Cruz AP, Pinheiro G, Alves SH, Ferreira G, Mendes M, Macedo CE. Behavioral effects of systematically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 182: 345-54, 2005.

44. De Olmos JS, Beltramino CA, Alheid G. The rat nervous system: Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. 3. ed. Elsevier: 509-603, 2004.
45. De Vry J, Schreiber R, Daschke A, Jentsch KR. Effects of serotonin 5-HT(1/2) receptor agonists in a limited-access operant food intake paradigm in the rat. *European Neuropsychopharmacology* 13: 337-45, 2003.
46. De Vry J, Schreiber R. Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24: 341-53, 2000.
47. Denton D, McKinley MJ, Weisinger RS. Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7397-404, 1996.
48. Diez-Ariza M, Alloza MG, Lasheras B, Del Rio J, Ramírez MJ. GABA_A receptor antagonists enhance cortical acetylcholine release induced by 5-HT₃ receptor blockade in freely moving rats. *Brain Research* 956: 81-5, 2002.
49. Diez-Ariza M, Ramírez MJ, Lasheras B, Del Rio J. Differential interaction between 5-HT₃ receptors and GABAergic neurons inhibiting acetylcholine release in rat entorhinal cortex slices. *Brain Research* 801: 228-32, 1998.
50. Dubovsky SL, Thomas M. Beyond specificity: effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. *Journal of Psychosomatic Research* 39: 429-44, 1995.
51. Duxon MS, Flanigan TP, Reavley AC, Baxter GS, Blackburn TP, Fone KFC. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine 2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience* 76: 323-9, 1997.
52. Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidemeier H, Fischer W. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research: Evolving concepts in

- management of pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology* 560: 1-8, 2007.
53. Fallon JH, Ciofi P. The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction: Distribution of monoamines within the amygdala. Wiley-Liss: New York: 97-114, 1992.
54. Farber L, Haus U, Spath M, Drechsler S. Physiology and pathophysiology of the 5-HT₃ receptor. *Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement* 119: 2-8, 2004.
55. Ferreira HS, De Castro e Silva E, Cointeiro C, Oliveira E, Faustino TN, Fregoneze JB. Role of central 5-HT₃ receptors in the control of blood pressure in stressed and non-stressed rats. *Brain Research* 1028: 48-58, 2004.
56. Fitts DA, Thunhorst RL. Rapid elicitation of salt appetite by an intravenous infusion of angiotensin II in rats. *American Journal of Physiology* 270: R1092-8, 1996.
57. Fitts DA, Zierath DK, Savos AV, Ho JM, Bassett JE. Intravenous angiotensin and salt appetite in rats. *Appetite* 48: 69-77, 2007.
58. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst and sodium appetite. *Physiological Reviews* 78: 583-686, 1998.
59. Foguet M, Hoyer D, Pardo LA, Parekh A, Kluxen FW, Kalkman HO, Stuhmer W, Lubbert H. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *The EMBO Journal* 11: 3481-87, 1992.
60. Foster-Schubert KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocrine Reviews* 27: 779-93, 2006.
61. Fratucci De Gobbi JI, De Luca Jr LA, Johnson AK, Menani JV. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280: R1301-7, 2001.

62. Galaverna O, De Luca Jr LA, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Research Bulletin* 28, 89-98, 1992.
63. Gaster LM, King FD. Serotonin 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor antagonists. *Medicinal Research Reviews* 17: 163-214, 1997.
64. Geerling JC, Loewy AD. Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thirst. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292: R1338-48, 2007.
65. Gelsema AJ, McKittrick DJ, Calaresu FR. Cardiovascular responses to chemical and electrical stimulation of amygdala in rats. *American Journal of Physiology* 253: 712-8, 1987.
66. Gentil CG, Antunes-Rodrigues JA, Negro-Villar A, Covian MR. Role of amygdaloid complex in sodium chloride and water intake in the rat. *Physiology & Behavior* 3: 981-5, 1968.
67. Gentil CG, Mogenson GJ, Stevensons AE. Electrical stimulation of septum, hypothalamus, and amygdala and saline preference. *American Journal of Physiology* 220: 1172-7, 1971.
68. Gentili L, Saija A, Luchetti G, Massi M. Effect of the 5-HT₂ antagonist ketanserin on salt appetite in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 39: 171-6, 1991.
69. Gerard C, Mestikawy S, Lebrand C, Adrien J, Ruat M, Traiffort E. Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT₆ receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23: 164-73, 1996.
70. Gerhardt CC, Van Heerikhuizen H. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *European Journal of Pharmacology* 334: 1-23, 1997.
71. Giorgetti M, Tecott LH. Contributions of 5-HT_{2C} receptors to multiple actions of central serotonin systems. *European Journal of Pharmacology* 488: 1-9, 2004.

72. Giovannini MG, Ceccarelli I, Molinari B, Cecchi M, Goldfarb J, Blandina P. Serotonergic modulation of acetylcholine release from cortex of freely moving rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 285: 1219-25, 1998.
73. Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience* 23: 7451-60, 2003.
74. Gobert A, Rivet JM, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Adhumeau-Auclair A, Nicolas JP, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ. Serotonin (2C) receptors tonically suppress the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. *Synapse* 36: 205-21, 2000.
75. Green AR. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology* 147: S145-52, 2006.
76. Gur E, Newman ME, Avraham Y, Dremencov E, Berry EM. The differential effects of food restriction on 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor mediated control of serotonergic transmission in the hippocampus and hypothalamus of rats. *Nutritional Neuroscience* 6: 169-75, 2003.
77. Guscott MR, Egan E, Cook GP, Stanton JA, Beer MS, Rosahl TW, Hartmann S, Kulagowski J, McAllister G, Fone KC, Hutson PH. The hypothermic effect of 5-CT in mice is mediated through the 5-HT₇ receptor. *Neuropharmacology* 44: 1031-7, 2003.
78. Gyermek L. 5-HT₃ receptors: pharmacologic and therapeutic aspects. *Journal of Clinical Pharmacology* 35: 845-55, 1995.
79. Gyermek L. Pharmacology of serotonin as related to anesthesia. *Journal of Clinical Anesthesia* 8: 402-25, 1996.

80. Hackler EA, Turner GH, Gresch PJ, Sengupta S, Deutch AY, Avison MJ, Gore JC, Sanders-Bush E. 5-HT_{2C} receptor contribution to m-chlorophenylpiperazine and N-methyl-(beta)-carboline-3-carboxamide-induced anxiety-like behavior and limbic brain activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320: 1023-9, 2006.
81. Hajos M, Hoffman WE, Weaver RJ. Regulation of septo-hippocampal activity by 5-hydroxytryptamine (2C) receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306: 605-15, 2003.
82. Halford JC, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Current Drug Targets* 6: 201-13, 2005.
83. Harsing LG, Prauda I, Barkoczy J, Matyus P, Juranyi Z. A 5-HT₇ heteroreceptor-mediated inhibition of [³H] serotonin release in raphe nuclei slices of rat: Evidence for a serotonergic-glutamatergic interaction. *Neurochemical Research* 29: 1487-97, 2004.
84. Hasuo H, Matsuoka T, Akasu T. Activation of presynaptic 5-hydroxytryptamine 2A receptors facilitates excitatory synaptic transmission via protein kinase C in the dorsolateral septal nucleus. *The Journal of Neuroscience* 22: 7509-17, 2002.
85. Hayes ES, Adaikan PG. The effects of 5HT(1) agonists on erection in rats in vivo and rabbit corpus cavernosum in vitro. *International Journal of Impotence Research* 14: 205-12, 2002.
86. Hayrapetyan V, Jenschke M, Dillon GH, Machu TK. Co-expression of 5-HT_{3B} subunit with the 5-HT_{3A} receptor reduces alcohol sensitivity. *Molecular Brain Research* 142: 146-50, 2005.
87. Hernandez M, Barahona MV, Simonsen U, Recio P, Rivera L, Martinez AC., Garcia-Sacristan A, Orensanz LM, Prieto D. Characterization of the 5-hydroxytryptamine

- receptors mediating contraction in the pig isolated intravesical ureter. *British Journal of Pharmacology* 138: 137-44, 2003.
88. Hillebrand JJG, Heinsbroek ACM, Kas MJH, Adan RAH. The appetite suppressant d-fenfluramine reduces water intake, but not food intake, in activity-based anorexia. *Journal of Molecular Endocrinology* 36: 153-62, 2006.
89. Hogg S, Dalvi A. Acceleration of onset of action in schedule-induced polydipsia: combinations of SSRI and 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor antagonists. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 77: 69-75, 2004.
90. Hornung JP. The Human raphe nuclei and serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26: 331-43, 2003.
91. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PPA. VII. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacological Reviews* 46: 157-203, 1994.
92. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 71: 533-54, 2002.
93. Iwata J, Chida K, LeDoux JE. Cardiovascular responses by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Research* 418: 183-8, 1987.
94. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72: 165-229, 1992.
95. Jakus R, Graf M, Juhasz G, Gerber K, Levay G, Halasz P, Bagdy G. 5-HT_{2c} receptors inhibit and 5-HT_{1A} receptors activate the generation of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy. *Experimental Neurology* 184: 96-102, 2003.

96. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 23: 183-91, 1996
97. Johnson AK, De Olmos J, Pastuskovas CV, Zardetto-Smith AM, Vivas L. The extended amygdala and salt appetite. *Annual New York Academy of Sciences* 877: 258-80, 1999.
98. Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: Visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 292-353, 1997.
99. Jorgensen H, Knipq U, Kjaer A, Moller M, Warberg J. Serotonergic stimulation of corticotropin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin gene expression. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 788-95, 2002.
100. Joshi PR, Suryanarayanan A, Hazai E, Schulte MK, Maksai G, Bikádi Z. Interactions of granisetron with an agonist-free 5-HT_{3A} receptor model. *Biochemistry* 45: 1099-105, 2006.
101. Kalia M. Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* 54: 24-7, 2005.
102. Kanner AM. Is major depression a neurologic disorder with psychiatric symptoms? *Epilepsy & Behavior* 5: 636-44, 2004.
103. Katsurabayashi S, Kubota H, Tokutomi N, Akaike N. A distinct distribution of functional presynaptic 5-HT receptor subtypes on GABAergic nerve terminals projecting to single hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology* 44: 1022-30, 2003.
104. Kita T, Takahashi M, Wagner GC, Kubo K, Nakashima T. Methamphetamine-induced changes in activity and water intake during light and dark cycles in rats.

Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry 22: 1185-96, 1998.

105. Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G, Bickerdike, M. Pharmacological characterization of the agonist radioligand binding site of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 370: 114–23, 2004.
106. Koyama S, Matsumoto N, Kubo C, Akaike N. Presynaptic 5-HT₃ receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. *Journal of Physiology* 529: 373-83, 2000.
107. Krzywkowski K. Do polymorphisms in the human 5-HT₃ genes contribute to pathological phenotypes? *Biochemical Society Transactions* 34: 872-6, 2006.
108. Landry ES, Guertin PA. Differential effects of 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on hindlimb movements in paraplegic mice. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28: 1053-60, 2004.
109. Lanfumey L, Hamon M. 5-HT₁ receptors. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders* 3: 1-10, 2004.
110. Lee MD, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. 5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin_{1B} agonist CP-94,253. *Psychopharmacology* 164: 49-60, 2002.
111. Leite–Panissi CR, Ferrarese AA, Terzian AL, Menescal de Oliveira L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Research Bulletin* 69: 356-64, 2006.
112. Leshem M. The ontogeny of salt hunger in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23: 649-59, 1999.
113. Leysen JE. 5-HT₂ receptors. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders* 3: 11-26, 2004.

114. Li Z, Huang M, Prus AJ, Day J, Meltzer HY. 5-HT₆ receptor antagonist SB 399 885 potentiates haloperidol and risperidone-induced dopamine efflux in the medial prefrontal cortex or hippocampus. *Brain Research* 1134: 70-8, 2007.
115. Lima HRC, Cavalcante-Lima HR, Cedraz-Mercez PL, Costa e Sousa RH, Olivares EL, Badauê-Passos Jr D, Medeiros MA, Côrtes WS, Reis LC. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 76: 85-92, 2004.
116. Lin MT, Chueh FY, Hsieh MT. The hypothermic effects of dl-tetrahydropalmatine in rats. *Neuroscience Letters* 315: 53-6, 2001.
117. Lind RW, Johnson AK. A further characterization of the effects of AV3V lesions on ingestive behavior. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 245: R83-R90. 1983.
118. Liu W, Thielena RJ, Rodda ZA, McBride WJ. Activation of serotonin-3 receptors increases dopamine release within the ventral tegmental area of Wistar and alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 40: 167-76, 2006.
119. Lu CC, Tseng CJ, Wan FJ, Yin TH, Tung CS. Role of locus coeruleus and serotonergic drug actions on schedule-induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 43: 255-61, 1992.
120. Lundy RF, Norgren R. Pontine gustatory activities altered by electrical stimulation in the central nucleus of amygdala. *Journal of Neurophysiology* 85: 770-83, 2001.
121. Luz C, Souza A, Reis R, Fregoneze JB, De Castro e Silva E. Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Research* 1099: 121-32, 2006.
122. Luz CP, Souza A, Reis R, Mineiro P, Ferreira HS, Fregoneze JB, De Castro e Silva, E. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Research* 1139: 178-94, 2007.

123. Luz PA, Andrade L, Miranda N, Pereira V, Fregoneze JB, De Castro e Silva E. Inhibition of water intake by the central administration of IL-1beta in rats: role of the central opioid system. *Neuropeptides* 40: 85-94, 2006.
124. Maeda N, Matsuoka N, Yamaguchi I. Role of the dopaminergic, serotonergic and cholinergic link in the expression of penile erection in rats. *Japanese Journal of Pharmacology* 66: 59-66, 1994.
125. Malmkvist J, Hansen SW, Danqaard BM. Effect of the serotonin agonist buspirone on behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in confident and fearful mink. *Physiology & Behavior* 78: 229-40, 2003.
126. Margatho LO, Giusti-Paiva A, Menani JV, Elias LL, Vivas LM, Antunes-Rodrigues J. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus in renal and hormonal responses to isotonic blood volume expansion. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292: R1190-7, 2007.
127. Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432-7, 1991.
128. Markstein R, Matsumoto M, Kohler C, Togashi H, Yoshioka M, Hoyer D. Pharmacological characterization of 5-HT receptors coupled to adenylyl cyclase in the rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359: 454-9, 1999.
129. Matthes H, Boschert U, Amlaiky N, Grailhe R, Plassat JL, Muscatelli F, Mattei MG, Hen R. Mouse 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptamine receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Molecular Pharmacology* 43: 313-9, 1993.

130. McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology* 55: 257-332, 1998
131. McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *Journal of clinical neurosciences* 6: 289-301, 1999.
132. McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News in Physiological Sciences* 19: 1-6, 2004.
133. Melis C, Chau PL, Price KL, Lummis SC, Molteni C. Exploring the binding of serotonin to the 5-HT₃ receptor by density functional theory. *The Journal of Physical Chemistry* 110: 26313-9, 2006.
134. Meltzer HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21: 101-15, 1999.
135. Menani JV, Barbosa SP, De Luca Jr LA, De Gobbi JI, Johnson AK. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282: R837-41, 2002.
136. Menani JV, Barbosa SP, McKinley MJ, Wade JD, De Luca Jr LA. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and relaxin-induced sodium intake. *Brain Research* 1030: 74-80, 2004.
137. Menani JV, Colombari DS, Beltz TG, Thunhorst RL, Johnson AK. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Research* 801: 29-35, 1998a.
138. Menani JV, De Luca Jr LA, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 274: 555-60, 1998b.

139. Menani JV, De Luca Jr LA, Thunhorst RL, Johnson AK. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: R126-31, 2000.
140. Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *American Journal of Physiology* 269: R1044-9, 1995.
141. Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *American Journal of Physiology* 270: R162-68, 1996.
142. Micale V, Leggio GM, Mazzola C, Drago F. Cognitive effects of SL65.0155, a serotonin 5-HT₄ receptor partial agonist, in animal models of amnesia. *Brain Research* 1121: 207-15, 2006.
143. Mitchell ES, Neumaier JF. 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacology & Therapeutics* 108: 320-33, 2005.
144. Mitchell PJ, Fairhall SJ, Fletcher A, Redfern PH. Effects of single and repeated electroconvulsive shock on the social and agonistic behavior of resident rats. *Neuropharmacology* 44: 911-25, 2003.
145. Mogenson GJ, Wu M. Electrophysiological and behavioral evidence of interaction of dopaminergic and gustatory afferents in the amygdala. *Brain Research Bulletin* 8: 685-91, 1982.
146. Mongeau R, De Montigny C, Bier P. Activation of 5-HT₃ receptors enhances the electrically evoked release of [³H] noradrenaline in rat brain limbic structures. *European Journal of Pharmacology* 256: 269-79, 1994.
147. Morales M, Battenberg E, Bloom FE. Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 402: 385-401, 1998.

148. Morales M, Bloom FE. The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *The Journal of Neuroscience* 17: 3157-67, 1997.
149. Morales M, Wang S. Differential composition of 5-hydroxytryptamine₃ receptors synthesized in the rat CNS and peripheral nervous system. *The Journal of Neuroscience* 22: 6732-41, 2002.
150. Moran A, Fernandez MM, Velasco C, Martin ML, San Roman L. Characterization of prejunctional 5-HT₁ receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat. *British Journal of Pharmacology* 123: 1205-13, 1998.
151. Moulignier A. Central serotonin receptors. Principal fundamental and functional aspects. Therapeutic applications. *Revue Neurologique* 150: 3-15, 1994.
152. Nachman M, Ashe JH. Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 87: 622-43, 1974.
153. Neil JC, Cooper SJ. Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats: evidence for possible 5-HT_{1C} receptor mediation. *Psychopharmacology* 99: 196-201, 1989.
154. Nelson DL. 5-HT₅ receptors. *Current Drug Targets CNS and Neurological Disorders* 3: 53-8, 2004.
155. Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 310: 101-11, 2003.
156. Nitabach MN, Schulkin J, Epstein AN. The medial amygdala is a part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. *Behavioral Brain Research* 35: 127-34, 1989.

157. Nonogaki K, Nozue K, Oka Y. Increased hypothalamic 5-HT_{2A} receptor gene expression and effects of pharmacologic 5-HT_{2A} receptor in obese AY mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351: 1078-82, 2006.
158. Oerther S. Temperature set-point changes induced by DA D_{2/3} and 5-HT_{1A} receptor agonists in the rat. *Neuroreport* 11: 3949-51, 2000.
159. Ohta H, Watanabe S, Ueki S. Cardiovascular changes induced by chemical stimulation of the amygdala in rats. *Brain Research Bulletin* 26: 575-81, 1991.
160. Olivares EL, Costa e Sousa RH, Cavalcante-Lima HR, Lima HRC, Cedraz-Mercez PL, Reis LC. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1709-16, 2003.
161. Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinath-Singhji DJS. Localization of 5-HT_{5A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research* 867: 131-42, 2000.
162. Parent A, Descarries C, Beaudet A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain: a radioautographic study after intraventricular administration of ³H hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6: 115-38, 1981.
163. Pasqualetti M, Ori M, Nardi I, Castagna M, Cassano GB, Marazziti D. Distribution of the 5-HT_{5A} serotonin receptor mRNA in the human brain. *Molecular Brain Research* 56: 1-8, 1998.
164. Patel S, Roberts J, Moorman J, Reavill C. Localization of serotonin-4 receptors in the striatonigral pathway in rat brain. *Neuroscience* 69: 1159-67, 1995.
165. Pauwels PJ. 5-HT 1B/D receptor antagonists. *General Pharmacology* 29: 293-303, 1997.
166. Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Research* 346: 205-30, 1985.

167. Pitkänen A. The amygdala: functional analysis: Connectivity of the rat amygdaloid complex. Oxford Univ. Press: Oxford, UK, 31-115, 2000.
168. Pompei P, Tayebaty SJ, De Caro G, Schulkin J, Massi. Bed nucleus of the stria terminalis: site for the antinatriorexic action of tachykinins in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 40: 977-81, 1991.
169. Price JL, Russche FT, Amaral DG. Handbook of Chemical Neuroanatomy: Integrated Systems of the CNS, Part 1. Elsevier: Amsterdam, vol 5, 279-388, 1987.
170. Ramage AG. Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Research Bulletin* 56: 425-39, 2001.
171. Ramírez MJ, Cenarruzabeitia E, Lasheras B, Del Rio J. Involvement of GABA systems in acetylcholine release induced by 5-HT₃ receptor blockade in slices from rat entorhinal cortex. *Brain Research* 712: 274-80, 1996.
172. Rauch SL, Shin LM, Phelps EA. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research-past, present, and future. *Biological Psychiatry* 60: 376-82, 2006.
173. Reeves DC, Lummis SCR. Detection of human and rodent 5-HT_{3B} receptors subunits by anti-peptide polyclonal antibodies. *BMC Neuroscience* 27: 1-8, 2006.
174. Reilly JJ, Maki R, Nardozi J, Schulkin J. The effects of lesions of the bed nucleus of stria terminalis on sodium appetite. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 54: 253-7, 1994.
175. Reis LC, Ramalho MJ, Antunes-Rodrigues J. Brain serotonergic stimulation reduces the water intake induced by systemic and central beta-adrenergic administration. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25: 529-36, 1992.
176. Reis LC, Ramalho MJ, Antunes-Rodrigues J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by angiotensin II and carbachol in normally hydrated

- rats: effect of intracerebroventricular injection of MK-212. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23: 1339-42, 1990a.
177. Reis LC, Ramalho MJ, Antunes-Rodrigues J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by water deprivation: effect of a serotonergic agonist (MK-212) administered intracerebroventricularly. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23: 1335-8, 1990b.
178. Reis LC, Ramalho MJ, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 12022-6, 1994.
179. Reis LC, Ramalho MJ, Antunes-Rodrigues J. Participation of the serotonergic system in the regulation of water and electrolyte balance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 22: 761-3, 1989.
180. Roberts GW. The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction: Neuropeptides: cellular morphology, major pathways, and functional considerations. Wiley-Liss: New York, 115-42, 1992.
181. Rouah-Rosilio M, Orosco M, Nicolaidis S. Serotonergic modulation of sodium appetite in the rat. *Physiology & Behavior* 55: 811-6, 1994.
182. Ruhf AA, Starbuck EM, Fitts DA. Effects of SFO lesions on salt appetite during multiple sodium depletions. *Physiology & Behavior* 74: 629-36, 2001.
183. Saad WA, Antunes-Rodrigues J, Gentil CG, Covian MR. Interaction between hypothalamus, amygdala and septal area in the control of sodium chloride intake. *Physiology & Behavior* 9: 626-36, 1972.
184. Saad WA, Bengtson RM, Menani JV, Camargo LA, Renzi A, Silveira JE, Saad WA. Effect of cholinergic stimulation of the amygdaloid complex on water and salt intake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 915-20, 1994.

185. Saad WA, Camargo LAA, Silva-Netto CR, Antunes-Rodrigues J, Covian MR. The control of sodium chloride intake: functional relationship between hypothalamic inhibitory áreas and amygdaloid complex stimulating areas. *Brain Research Bulletin* 6: 197-202, 1981.
186. Saad WA, Paulino MA, Camargo LA, Renzi A, Menani JV, Abrão-Saad W. Effect of eletrolitic and chemical lesion by ibotenic acid of the amygdala on salt intake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 2903-7, 1994.
187. Sah P, Faber ESL, Lopez de Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews* 83: 803-34, 2003.
188. Sakai RR, Ma LY, Zhang DM, McEwen BS, Fluharty SJ. Intracerebral of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt-appetite in rats. *Neuroendocrinology* 64: 425-9, 1996.
189. Sakai RR, McEwen BS, Fluharty SJ, Ma LY. The amygdala: Site of genomic and non-genomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. *Kidney International* 57: 1337-45, 2000.
190. Saxena PR. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacology & Therapeutics* 66: 339-68, 1995.
191. Schreiber R, Selbach K, Asmussen M, Hesse D, De Vry J. Effects of serotonin_{1/2} receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 67: 291-305, 2000.
192. Schulkin J, Marini J, Epstein AN. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. *Behavioral Neuroscience* 103: 178-85, 1989.
193. Sepúlveda MI, Lummis SC, Martin IL. The agonist properties of m-chlorophenylbiguanide and 2-methyl-5-hydroxytryptamine on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *British Journal of Pharmacology* 104: 536-40, 1991.

194. Serrats J, Mengod G, Cortés R. Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 29: 83-91, 2005.
195. Simansky KJ, Dave KD, Inemer BR, Nicklous DM, Padron JM, Aloyo VJ, Romano AG. A 5-HT_{2C} agonist elicits hyperactivity and oral dyskinesia with hypophagia in rabbits. *Physiology & Behavior* 82: 97-107, 2004.
196. Simansky KJ. Peripheral 5-carboxamidotryptamine (5-CT) elicits drinking by stimulating 5-HT₁-like serotonergic receptors in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 38: 459-62, 1991.
197. Starbuck E M, Fitts D A. Influence of salt intake, ANG II synthesis and SFO lesion on thirst and blood pressure during sodium depletion. *Appetite* 31: 309–31, 1998.
198. Steffens SM, Casas DC, Milanez BC, Freitas CG, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons. *Brain Research* 44: 681-8, 1997.
199. Stricker EM, Sved AF. Thirst. *Nutrition* 16: 821-6. 2000.
200. Stricker EM. Thirst and sodium appetite after colloid treatment in rats: Role of the renin-angioensin- aldosterone system. *Behavioral Neuroscience* 97: 725-37, 1983.
201. Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends in Neurosciences* 21: 323-31, 1998.
202. Tanaka J, Hayashi Y, Yamato K, Miyakubo H, Nomura M. Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. *Neuroscience Letters* 357: 41-4, 2004.
203. Tangaprégasson MJ, Tangaprégasson AM, Soulairac A. Effets des lésions de la région du raphé mesencéphalique sur le comportement de soif et de la neurosécrétion hypothalamique antérieure du rat. *Annales D'endocrinologie* 35: 667-8, 1974.

204. Tecott LH, Maricq AV, Julius D. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1430-4, 1993.
205. Thomas DR, Hagan JJ. 5-HT₇ receptors. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders* 3: 81-90, 2004.
206. Thunhorst RL, Johnson AK. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. *American Journal of Physiology* 266: R458-65, 1994.
207. Tordoff MG, Geiselman PJ, Grijalva CV, Kiefer SW, Novin D. Amygdaloid lesions impair ingestive responses to 2-deoxy-D-glucose but not insulin. *American Journal of Physiology* 242: R129-35, 1982.
208. Turner T J, Mokler D J, Luebke J I. Calcium influx through presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates GABA release in the hippocampus: *in vitro* slice and synaptosome studies. *Neuroscience* 129: 703-18, 2004.
209. Uphouse L. Multiple Serotonin Receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21: 679-98, 1997.
210. Valencia-Flores M, Campos-Sepulveda E, Galindo-Morales JA, Lujan M, Colotia VA. Behavioral and biochemical correlates of chronic administration of quipazine. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 36: 299-304, 1990.
211. Van de Kar LD, Javed A, Zhang Y, Serres F, Raap DK, Gray TS. 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *The Journal of Neuroscience* 21: 3572-9, 2001.
212. Van Hooft JA, Vijverberg HP. Full and partial agonists induce distinct desensitized states of the 5-HT₃ receptor. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 17: 267-77, 1997.

213. Van Oekelen D, Luyten WHML, Leysen JE. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sciences* 72: 2429-49, 2003.
214. Verbalis JG. Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 17: 471-503, 2003.
215. Vilaro MT, Cortes R, Mengod G. Serotonin 5-HT₄ receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *The Journal of Comparative Neurology* 484: 418-39, 2005.
216. Waeber C, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A. Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rat brain. *Behavioral Brain Research* 73: 259-62, 1996.
217. Wesolowska A. In the search for selective ligands of 5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇ serotonin receptors. *Polish Journal of Pharmacology* 54: 327-41, 2002.
218. Wood MD. Therapeutic potential of 5-HT_{2C} receptor antagonists in the treatment of anxiety disorders. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders* 2: 383-7, 2003.
219. Zardetto-Smith AM, Beltz TG, Johnson AK. Role of central nucleus of the amygdala and bed nucleus of stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain Research* 645: 123-34, 1994.
220. Zardetto-Smith AM, Johnson AK. Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat. *Neuroscience Letters* 199: 215-9, 1995.
221. Zhang DM, Epstein AN, Schulkin J. Medial region of the amygdala: Involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Research* 600: 20-6, 1993.
222. Zolovick AJ, Avrith D, Jalowiec JF. Reversible colchicines-induced disruption of amygdaloid function in sodium appetite. *Brain Research Bulletin* 5: 35-9, 1980.