

**UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

TESE

**EXPOSIÇÃO GESTACIONAL AGUDA AO ETANOL EM RATOS WISTAR:
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E HIDROELETROLÍTICAS**

ADRYANO AUGUSTTO VALLADÃO DE CARVALHO

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EXPOSIÇÃO GESTACIONAL AGUDA AO ETANOL EM RATOS WISTAR:
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E HIDROELETROLÍTICAS**

ADRYANO AUGUSTTO VALLADÃO DE CARVALHO

Sob a Orientação do Professor
Luís Carlos Reis

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração Fisiologia.

Seropédica, Rio de Janeiro
Outubro de 2014

DEDICATÓRIA

O caráter do indivíduo determinará a direção e a intensidade de várias decisões e caminhos que o mesmo tomara em sua jornada. Assim também ocorrerá no âmbito acadêmico, a formação científica que adquirimos irá impelir os anseios que motivarão as escolhas futuras. E é por isto que dedico este trabalho às pessoas que até aqui contribuíram ativamente na formação do meu perfil científico e do meu caráter.

Ao meu primeiro orientador, prof^o Dr. Tales Alexandre Aversi Ferreira que me ensinou durante a iniciação científica a avaliar o universo de forma crítica e ao mesmo tempo contemplativa, aliando o prazer da descoberta do novo com a constante avaliação do que está sendo discutido em voga. Aos meus orientadores de mestrado, prof^o Dr. Luis Carlos da Cunha e prof^o Dr. Elson Alves Costa, que pacientemente me permitiram assimilar paradigmas científicos novos e diferentes, além do exemplo de honestidade, dedicação, seriedade e humanismo que sempre foram para mim.

Ao meu orientador de Doutorado, prof^o Dr. Luís Carlos Reis (mestre Luís) o qual tenho muito orgulho de ter sido orientado e que, sem contra-dita, foi quem mais influenciou minha formação científica, me ensinando a integrar todas as contribuições científicas valorosas dos mestres das etapas anteriores e construir uma base intelecto-científica capaz de se adaptar constantemente ao pool de concênitos e informações a que estamos submetidos, a gerar interpretações próprias e pertinentes, e acima de tudo com uma base auto-crítica e que com a propriedade de respeitar e compartilhar ativamente, e com prazer, o convívio com aqueles que possuem embasamento e formação divergentes.

À minha família; meu pai Dari Mariano de Almeida, minha mãe Anilda Fernandes, meus irmãos Tayme e Acassy, ao meu avô Antônio Fernandes, minha avô Ilda Fernandes, meus tios Fernando Fernandes, Sylla Adryanna, Mônica Beatriz; que me ampararam nas dificuldades desde a infância, respeitaram e apoiaram minhas escolhas e me ensinaram os valores do trabalho honesto, da coesão familiar e do bom relacionamento com as pessoas do convívio diário, além do embasamento cristão.

Com todo o carinho do mundo dedico especialmente este trabalho à pessoa que me ajudou em todas as etapas de execução e elaboração deste projeto, desde os cuidados básicos com os animais, na execução de experimentos, na discussão dos resultados, na aquisição de material teórico, me substituindo no trabalho e me incentivando nos momentos de cansaço, à minha razão de ser; minha amada esposa Pablinny Moreira Galdino de Carvalho. Além do auxílio direto na aquisição da imensa maioria dos resultados aqui descritos, ela foi sempre minha fonte de luz, afeto, amparo, serenidade e compreensão. Indubitavelmente sem você, eu nada teria feito de valor nestes quatro anos.

AGRADECIMENTOS

A lista daqueles que oportunamente contribuírem com este trabalho é imensa, e faço questão de enumerar todos os que de alguma forma me ajudaram a obter resultados, a melhorar a qualidade do texto, proporcionaram situações de amparo e contribuíram na minha formação.

Ao professor Wellington Sliva Côrtes (mestre Wellington), com quem tive o imenso prazer de aprender muito em várias e fortuitas conversas no departamento. Obrigado mestre pelo seu apoio, exemplo e compreensão durante estes quatro anos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFRRJ Emerson Olivares, Frederico Argolo e Fábio Fagundes da Rocha por me receberem no departamento sempre com solicitude e pelas contribuições nas discussões que ajudaram a lapidar meu trabalho.

Ao professor do departamento de Ciências Fisiológicas do IB-UFRRJ, André Souza Mecawi, pela ajuda com os resultados e delineamento experimental. Além do aprendizado cinetífico abstratido deste convívio, pude construir uma amizade indelével e me espelhar muito na sua postura como pesquisador. Também a amiga, professora Dr^a Fabricia Viana Fonseca pela ajuda em vários momentos de dificuldades e nas discussões que ajudaram a melhorar a estrutura do meu trabalho.

Aos amigos de Pós-graduação do departamento de Ciências Fisiológicas da Rural que me recebam como um irmão e cada um a sua maneira durante os congressos e minha estadia na Rural me motivaram para que a distância e as diferenças não me fizessem desistir. Muito Obrigado Claudinho, Rafael, Fernando, Robertinho, Andreson, Verônica, Fernanda, Rodrigo, Marissa, Raquel. Agradecimento especial ao secretário do PMPGCF Franklin Rezende por toda atenção dedicada e ao amigo Raoni Santos, pela ajuda com a realização da imunohistoquímica, pela amizade e por todo o.

Meu agradecimento especial à colega de Doutorado que foi para mim uma segunda orientadora e uma irmã, Iracema Araújo (Cema). Você é a pessoa mais habilidosa, prestativa e altruísta que conheci no meio acadêmico. Obrigado de todo o coração pelos ensinamentos, pelas discussões, sugestões e por disponibilizar seu tempo para realizar o protocolo imunohistoquímico deste trabalho. As amizades conquistadas neste período são para mim tão valiosas quanto o conhecimento adquirido, e entre estas, a amizade edificada entre nós foi a mais importante e intensa.

Aos Professores do departamento de Ciências Fisiológicas da UFG que colaboraram ativamente com meu trabalho. Professora e amiga querida Elizabeth Mendes pela ajuda com a realização das avaliações dos parâmetros renais e cardiovasculares, ao Professor e prezado amigo Gustavo Pedrino pelo apoio na realização da perfusão dos animais e avaliação das lâminas, e os meus mais profundos agradecimentos à Professora e amiga Renata Mazaro e Costa pelo amparo e orientação na avaliação dos parâmetros de desenvolvimento sensorio-motor, pela disponibilização do espaço físico em seu laboratório, além dos meus agradecimentos pelas contribuições humanísticas.

Meu agradecimento especial à CAPES pela oportunidade da bolsa de pesquisa e ao CNPq e FAPERJ, que proporcionaram fomento aos laboratórios que se envolveram neste projeto.

RESUMO

CARVALHO, Adryano Augustto. **Exposição gestacional aguda ao etanol em ratos wistar: alterações comportamentais e hidroeletrólíticas.** 2014. 110 p. Tese (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O consumo gestacional agudo de etanol pode promover distúrbios contundentes na estruturação de vários sistemas de neurotransmissores, acarretando alterações funcionais que persistem por toda vida do indivíduo. No presente trabalho avaliamos a influência pré-natal aguda do etanol na regulação hidroeletrólítica e em diferentes respostas comportamentais e ontogênicas ligadas ao sistema serotoninérgico cerebral. A regulação hidroeletrólítica é fundamental para o desenvolvimento de vários processos bioquímicos relacionados à manutenção da vida, e um dos principais mecanismos adaptativos envolvidos com a conquista do ambiente terrestre. O sistema serotoninérgico cerebral possui papel crítico na manutenção da homeostase hidroeletrólítica, particularmente no comportamento de saciedade ao sódio. Efetivamente o padrão de atividade serotoninérgica pode ser criticamente afetado por xenobióticos durante a neurogênese embrionária. A administração de etanol durante a gestação pode reduzir a síntese de serotonina e a expressão da enzima Triptofano Hidroxilase no Núcleo Dorsal da Rafe de ratos. Embora já demonstrado que a exposição gestacional ao etanol gera prejuízos sobre os circuitos serotoninérgicos, não havia até então dados reportando a influência de tal exposição sobre os mecanismos de regulação hidroeletrólítica, especialmente tratamentos agudos, que possuem aspecto translacional mais tangível. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo perquirir o espectro das possíveis alterações desencadeadas pela exposição pré-natal aguda ao etanol sobre o apetite ao sódio e outros parâmetros implicados no controle hidroeletrólítico, e também sobre outras respostas comportamentais. Para tanto, no 14º dia de gestação ratas gestantes foram tratadas com solução de etanol (20% em solução fisiológica, 3g/Kg i.p.). Aos noventa dias de vida, grupos de no mínimo 10 indivíduos provenientes de diferentes ninhadas foram aleatoriamente separados para proceder as manipulações experimentais. Nesta idade a ingestão acumulativa de sódio e água foi mensurada após quatro dias de dieta pobre em sódio seguida de administração de furosemida (10 mg/kg s.c.) e captopril (5 mg/kg s.c.). Neste mesmo paradigma experimental, também avaliamos a evolução do peso corporal, a pressão sistólica, o ritmo de filtração glomerular, a concentração urinária e plasmática de sódio, e ainda o hematócrito dos grupos testados. O grupo etanol apresentou maior ingestão acumulativa de sódio, mas não apresentou diferenças significativas nos outros parâmetros descritos. Também investigamos a ativação neuronal (por meio de imunoreatividade a proteína Fos) das principais áreas encefálicas envolvidas no controle da ingestão salina. Durante a fase de consumo houve maior número de células Fos-ir no OVLT e SFO, sem diferença no MnPO e menor imuno reatividade no SON, PVN (PaML, PaMM, PaPo) e no DRN, indicando menor reatividade destas áreas após a ingestão de salina. Também evidenciamos que os animais do grupo etanol apresentaram comportamento relacionado à ansiedade e déficit na consolidação e evocação da memória. Entretanto o tratamento com etanol não acarreta déficits sensoriais, prejuízos na coordenação motora e no desenvolvimento ponderal, bem como não gera anedonia sob condições basais. Nossos dados permitem concluir que a exposição pré-natal aguda ao etanol induz distúrbios na geração do comportamento de saciedade ao sódio, comportamento relacionado à ansiedade e distúrbios nos mecanismos de memória.

Palavras-Chave: Apetite ao Sódio, Etanol, Sistema Serotoninérgico.

ABSTRACT

CARVALHO, Adryano Augustto. **Gestational exposure to ethanol in wistar rats: behavioral and hydroelectrolitic alterations** 2014. 110 p. Thesis (Multicenter Post-Graduate Program in Physiological Sciences). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The acute gestational exposure to ethanol can cause disorders in the development of several systems of neurotransmitters, promoting functional changes that may persist for all life of individual. In the present work, we evaluated the acute prenatal influence of ethanol on hydroelectrolytic regulation and various behavioral and ontogenetic responses related to brain serotonergic system. The hydroelectrolytic regulation is critical to the development of numerous biochemical processes related to the maintenance of life, and one of the main adaptive mechanisms involved in the conquest of the terrestrial environment. The brain serotonergic system has a critical role in the maintenance of fluid and electrolyte homeostasis, particularly in the satiety sodium behavior. Assuredly, the pattern of serotonergic activity may be critically affected by xenobiotics during embryonic neurogenesis. The ethanol administration during pregnancy reduces serotonin synthesis and tryptophan hydroxylase expression in Dorsal Raphe Nucleus in rats. Although previously studies shown that ethanol gestational exposure generate damage on serotonergic circuits, had not hitherto data reporting the influence this exposure on the mechanisms of hydroelectrolytic homeostasis, especially acute treatments that have more tangible translational aspect. In this context, the present study aimed to assert the spectrum of possible alterations triggered by acute prenatal exposure to ethanol on the sodium appetite and other parameters involved in electrolytic control, as well as other behavioral responses. For this, in 14th day of pregnancy, female rats were treated with ethanol solution (20% in saline solution, 3 g/kg, i.p.). At ninety day of life, groups of at least 10 individuals from different mothers were randomly assigned to conduct the experimental manipulations. At this age, the cumulative intake of sodium and water was measured after four days of low-sodium diet and after administration of 10 mg/kg of furosemide (s.c.) associated with captopril (5 mg/kg s.c.). In this same experimental paradigm, we also evaluated the evolution of body weight, systolic blood pressure, glomerular filtration rate, urinary and plasma sodium concentration and hematocrit of the groups. The ethanol group showed higher cumulative sodium intake, but no significant differences in the other parameters described. We also investigated the neuronal activation (by immunoreactivity to Fos) of the main brain structures involved in the control of salt intake. Animals of ethanol group showed higher number of Fos-ir cells in the OVLT and SFO during the consumption phase, and no difference in number of immunoreactivity cells in MnPO, and reduced ir-Fos in SON, PVN (PaML, PaMM, PaPo) and DRN, indicate lower reactivity in these areas after ingestion of salt. We also demonstrated that the animals of ethanol group showed anxiety-like behavior and deficit in consolidation and evocation of memory. However, ethanol treatment does not promote sensory deficits, impairments in motor coordination and weight development, and no generates no anhedonia under baseline conditions. Our results suggest that acute prenatal ethanol exposure induces disturbances in the generation of sodium satiety behavior, anxiety-like behaviour and debilitates in the memory mechanisms.

Keywords: Sodium Appetite, Ethanol, Serotonergic system.

LSITA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT _{1A}	Receptor para serotonina do tipo 1A
5-HT _{2B}	Receptor para serotonina do tipo 1B
5-HT ₂	Receptor para serotonina do tipo 2
5-HT ₃	Receptor para serotonina do tipo 3
3V	Terceiro Ventrículo
Kg	Quilograma (s)
mg	miligrama (s)
mL	mililitro (s)
ABC	Reagentes avidina-biotina-peroxidase
Angt	Angiotensinogênio
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análise da variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP	Área Postrema
ARP-Fos	Antígenos relacionados à proteína Fos
AT1	Receptor para angiotensina II, do tipo 1
AT2	Receptor para angiotensina II, do tipo 2
AVP	Vasopressina
AV3V	Região Anteroventral do Terceiro Ventrículo
c-Fos	proto-oncogene que expressa a proteína Fos
DAB	Diaminobenzidina
DRN	Núcleo Dorsal da Rafe
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENaC	Canais Epiteliais Sensíveis ao Sódio
EPM	Erro padrão da média
FUROCAP	Furosemida + Captopril
i.c.v.	Intracerebroventricular
IP3	Inositol 3-fosfato
LCR	Líquido cefaloraquidiano
LEC	Líquido extracelular
LIC	Líquido intracelular
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
Nax	Canal sensor de sódio do tipo "x"
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMR	Núcleo Medial da Rafe
NPBL	Núcleo Parabraquial Lateral
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OCVs	Órgãos Circunventriculares
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal

PB.....	Tampão fosfato
PBS.....	Tampão fosfato em salina 0,15 M
PFA.....	Paraformolaldeído
PKC.....	Proteína quinase C
PLC.....	Fosfolipase C
PVN.....	Núcleo Paraventricular
RNA.....	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
s.c.	via sub-cutânea
SFO.....	Órgão subfornical
SNC.....	Sistema Neural Central
SON.....	Núcleo Supraóptico
SRAA.....	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TPH.....	Enzima Triptofano Hidroxilase
UFRRJ.....	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VRAC.....	Receptor de Volume Acoplado a Canal Iônico
v.o.....	Via Oral

LSITA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Avaliação cronológica do desenvolvimento Sensorio-Motor de ninhadas tratadas em E ₁₄ com etanol ou solução fisiológica.....	59
Tabela 2. Avaliação cronológica dos principais parâmetros murinométricos de ninhadas tratadas com etanol ou solução fisiológica.....	59
Tabela 3. Descrição dos parâmetros avaliados no teste do Campo Aberto.....	61
Figura 1. Esquema representativo do protocolo FUROCAP modificado utilizado nos experimentos para avaliação do apetite ao sódio dos grupos experimentais.....	32
Figura 2. Esquema representativo da sequência temporal e dos pontos de aferição dos parâmetros renais e hemodinâmicos mensurados.....	33
Figura 3. Estágio de aparecimento da fissura longitudinal nos olhos, de abertura do pavilhão auditivo e irrupção dos incisivos, respectivamente.....	36
Figura 4. Procedimento para avaliação dos reflexos de preensão palmar, localização pelas vibrissas e reflexo de reposicionamento corporal.....	37
Figura 5. Fotografia representando o modelo do Aparelho de Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos testes.....	39
Figura 6. Fotografia representando o aparelho de Step-Down utilizado nas avaliações de memória.....	41
Figura 7. Avaliação do consumo espontâneo de água e solução salina 0,3 M	42
Figura 8. Ingestão acumulativa de água de animais controle e etanol sub-metidos ao protocolo FUROCAP modificado.....	43
Figura 9. Ingestão acumulativa de solução de NaCl 0,3 M (A) e proporção de NaCl 0,3 M consumido relativamente à água (B) durante o protocolo FUROCAP modificado.....	44
Figura 10. Média da Pressão Sistólica 24 horas antes do início e ao final de 4 dias do período de dieta pobre em sódio vinculado ao protocolo FUROCAP modificado.....	45
Figura 11. Concentração de sódio (A) e volume urinários (B) de animais controle e etanol durante o período de execução do Protocolo FUROCAP modificado.	46
Figura 12. Média do Ritmo de Filtração Glomerular dos grupos submetidos ao período de quatro dias de dieta pobre em sódio.....	47
Figura 13. Hematócrito (C) e concentrações plasmática de sódio (A) e de potássio (B) após quatro dias de dieta hipossódica.....	48
Figura 14. Variação do peso corporal após quatro dias de dieta pobre em Sódio.....	49

Figuras 15. Número de neurônios imunorreativos à proteína Fos na lâmina terminal dos grupos controle e etanol sob diferentes condições.....	50
Figura 16. Fotomicrografias de secções coronais do SFO e do OVLT dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos.....	51
Figura 17. Fotomicrografias de secções coronais das porções dorsal e ventral do MnPO dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos.....	52
Figura 18. Número de neurônios imunorreativos à proteína Fos no SON e sub-núcleos do PVN dos grupos controle e etanol sob diferentes condições.....	53
Figura 19. Número de neurônios com dupla marcação para Fos-OT no SON e sub-núcleos do PVN de animais controle e etanol sob diferentes condições.....	54
Figura 20. Fotomicrografias de secções coronais do PVN e SON dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos dos grupos avaliados.....	55
Figura 21. Número de neurônios imunorreativos para Fos (A) e para Fos+TPH (B) no DRN de dos grupos controle e etanol sob diferentes condições.....	56
Figura 22. Fotomicrografias de secções coronais do DRN dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos sob diferentes condições experimentais.....	57
Figura 23. Fotomicrografias de secções coronais do DRN ilustrando a dupla-marcação para proteína Fos+Triptofano Hidroxilase (setas) em neurônios do DRN de animais controle (A) e etanol (B) cinco horas após o consumo induzido de salina.....	58
Figura 24. Evolução do desenvolvimento Ponderal de ratos machos expostos ao tratamento agudo com etanol durante.....	60
Figura 25. Consumo percentual de solução de sacarose	62
Figura 26. Latência (A) e número total de quedas (B) no teste do Rota-Rod.....	62
Figura 27. Percentual de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado.....	63
Figura 28. Tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado.....	63
Figura 29. Tempo de Latência no teste de Esquiva passiva utilizado para avaliar aquisição da memória.....	64
Figura 30. Latência no teste de Esquiva passiva utilizado para avaliar a retenção da memória.....	64

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Influências do Etanol sobre a Neurogênese Embrionária.....	3
1.2. Controle Neuroendócrino do Equilíbrio Hidroeletrólítico.....	9
1.3. Ativação dos neurônios osmo/sódio sensíveis e apetite ao sódio.....	16
1.4. Inibição da Ingestão e Saciedade ao Sódio.....	22
2. OBEJETIVOS	28
3. JUSTIFICATIVAS.....	29
4.MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Apreciação Bioética do Presente Projeto.....	30
4.2. Animais Utilizados.....	30
4.3. Protocolo de Alcoolização.....	30
4.4. Avaliação da Ingestão Basal de Água e NaCl 0,3 M.....	31
4.5. Protocolo FUROCAP Modificado.....	31
4.6. Parâmetros Renais e Hemodinâmicos Avaliados.....	32
4.7. Avaliação da ativação neurônial frente ao protocolo FUROCAP modificado.....	34
4.8. Avaliação do Desenvolvimento Ontogênico, Sensorio-Motor e Ponderal.....	35
4.9. Teste da Preferência por Sacarose.....	37
4.10. Teste do Campo-Aberto.....	38
4.11. Teste da Barra-Giratória.....	38
4.12. Teste do Labirinto em Cruz Elavado.....	39
4.13. Teste do Nado Forçado.....	39
4.14 Teste da esquivia inibitória.....	40
4.15 Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Avaliação da Ingestão Basal de Água e NaCl 0,3 M.....	42
5.2. Protocolo FUROCAP Modificado.....	43
5.3. Parâmetros Renais e Hemodinâmicos Avaliados.....	45
5.4. Avaliação da ativação neurônial frente ao protocolo FUROCAP modificado.....	54
5.5. Avaliação do Desenvolvimento Ontogênico, Sensorio-Motor e Ponderal.....	59
5.6. Resultados das Avaliações Comportamentais.....	60
6.DISSCUSSÃO.....	65
7.CONCLUSÕES.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

O álcool etílico é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, especialmente por possuir uma conotação diferenciada, relativamente à outras drogas psicoativas. Na maioria dos países possui caráter lícito, baixo custo e acesso extremamente facilitado (Room et al., 2005). Segundo dados da OMS, anualmente cerca de dois bilhões de pessoas com idade superior a 15 anos consomem bebidas alcoólicas com regularidade (consumo acumulativo de no mínimo dois litros de etanol puro anualmente). Em 2013 o consumo médio *per capita* no Brasil, nesta mesma faixa etária, foi de 8,5 litros de etanol, enquanto em 2001 o valor era de 5,1 litros (WHO, 2014).

Dados do Ministério da Saúde sugerem que este aumento se deve a elevação na forma de consumo, e não no número de indivíduos consumidores, pois nos últimos anos tem aumentado o percentual de brasileiros que consomem bebidas etílicas de forma abusiva. Tais dados são baseados na pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), e mostraram que o percentual de consumo abusivo de álcool foi de 19% da população em 2008, contra 17,5% em 2007, e de 16,1% em 2006. Sendo que a porcentagem dos interpelados que declararam ter ingerido algum tipo de bebida alcoólica foi de aproximadamente 38 % nos três anos avaliados (a OMS considera como consumo abusivo episódico, ou “Bing Drinking”, a ingestão eventual de quantidades superiores à 85 mL de etanol puro para mulheres e 100 mL para homens).

O amplo consumo social de bebidas alcoólicas por mulheres em idade reprodutiva e o papel do etanol como agente teratogênico tem sido a motivação de inúmeros estudos desde o início dos anos de 1960. Os efeitos embriotóxicos, resultantes da exposição pré-natal crônica ao etanol, foram formalmente descritos e classificados pela primeira vez em 1973 por Smith e Jones. Apesar destes efeitos serem relatados desde antes de Cristo. O consumo gestacional crônico de etanol determina um conjunto de alterações que incluem retardo do crescimento, deficiência cognitiva, assimetria do crânio e alterações na morfologia facial. Este conjunto de alterações caracterizam uma entidade clínica definida como Síndrome Alcoólica fetal (SAF).

Nos últimos anos um contingente crescente de autores, tem evidenciado que episódios curtos ou isolados de exposição do encéfalo em desenvolvimento ao etanol podem provocar anormalidades na estrutura e atividade do SNC, que persistem até a fase adulta do indivíduo. Recentemente, a comunidade científica internacional passou a utilizar o termo Desordem do Espectro da Síndrome Alcoólica Fetal (DESAF) para descrever o quadro de crianças cujas mães consumiram, episodicamente, doses elevadas de álcool e que apresentam distúrbios neurocognitivos, mas não expressam o fenótipo completo da SAF (Corrêa et al., 2000; Mukherjee et al., 2005; Caetano et al., 2006; Ethen et al., 2009). Mesmo sendo complexo o diagnóstico efetivo da DESAF, existem abordagens clínicas viáveis para a sua execução. E quando realizado, são relatados déficits de memória, agitação, dificuldade de concentração, rendimento escolar prejudicado, atraso na fala, entre outras disfunções cognitivas.

Embora ainda muito incipiente e controversa a questão acerca de qual seria a quantidade mínima de etanol que prejudicaria o conceito, muitos autores tem asseverado que a abstinência de bebidas alcoólicas durante a gestação seria a única forma segura de prevenir os efeitos embriotóxicos do etanol (Egeland et al., 1995; Olsen & Tuntiseranee, 1995; Koren, 1996; Koren et al., 1996; McGann & Spangler, 1997). Entretanto, muitos órgãos de saúde pública e de imprensa, em várias partes do mundo, alertam e divulgam apenas informações concernentes aos riscos do consumo crônico de etanol durante a gestação. Negligenciando os dados de pesquisas clínicas e pré-clínicas que demonstram que o conceito pode sofrer alterações neurocomportamentais, mesmo com um único evento de exposição ao etanol (Corrêa et al., 2000; Mukherjee et al., 2005; Caetano et al., 2006)

A utilização recreativa, altamente expansiva das bebidas alcoólicas, faz com que a exposição embrionária ao etanol seja comum durante o início da gestação (Corrêa et al., 2000; Mukherjee et al., 2005). Tal fato se deve, principalmente, pelo grande número de gestações não planejadas e diagnóstico tardio das gestações. Nas comunidades ocidentais, o consumo de bebidas alcoólicas por mulheres grávidas é de ocorrência relativamente comum e a prevalência de SAF pode variar de 4 casos a cada 1000 nascimentos nos EUA, e até 60 casos a cada 1000 na África do Sul (WHO, 2004). Algumas mulheres modificam o padrão de consumo após a confirmação da gravidez, passando do uso moderado frequente para eventuais casos de consumo abusivo durante o desenvolvimento da gestação, especialmente nos dois primeiros meses (Caetano et al., 2006).

Outro aspecto clínico relevante, no tangente aos efeitos do etanol na gestação, é a utilização abusiva pre-gestacional. Os níveis de consumo de álcool antes da gravidez são um forte preditor do uso de álcool durante a gravidez (Floyd et al., 1997; Caetano et al., 2006). Ademais, existe uma proporção de mulheres que usam álcool e mantém este hábito durante as primeiras semanas de gestação por não detectarem a gravidez. Aproximadamente 30% das mulheres percebem que estão grávidas a partir da sexta semana de gestação, um período crítico para o desenvolvimento embrionário (Floyd et al., 1999).

Cerca de metade de todos os nascimentos nos Estados Unidos não são planejados, fato que pode contribuir para a incidência de efeitos deletérios provocados por ação do etanol na vida intra-uterina (Maier & West, 2001; USA DHHS, 2005). Com o objetivo de caracterizar o perfil de ingestão alcoólica das mulheres americanas em idade fértil, e avaliar a prevalência do uso de álcool, como também o padrão de consumo entre mulheres grávidas e não grávidas, o CDC (Center for Disease Control Prevention, EUA) analisou inquéritos de avaliações pré-natais e pós-natais obtidos pelo Behavioral Risk Factor Surveillance System (BRFSS) de 1991 até 2005. A constatação clinicamente mais estarrecedora foi que cerca de 30% das mulheres se embriagaram (“*binge drinking*”) em algum momento do período gestacional (universo amostral do estudo incluiu mais de 2,5 milhões de gestantes e mães avaliadas nos cinquenta estados americanos). Sendo que 60% das mulheres avaliadas consomem frequentemente bebidas alcoólicas e 40% das gestantes ou mães avaliadas detectaram a gestação após o final da oitava semana (Maier & West, 2001; USA DHHS, 2005).

No Brasil não existem avaliações semelhantes, apenas trabalhos com grupos sócio-econômicos restritos e/ou com o universo amostral inconclusivo, em termos de representatividade. Assim como, não existem publicações na literatura científica dos efeitos gestacionais do etanol sobre os mecanismos de controle hidroeletrólítico da prole. Então, associando a necessidade de informações sobre os efeitos agudos do consumo de bebidas alcoólicas na gestação, e a possível interferência deste agente neuroembriotóxico sobre os mecanismos centrais que regulam a homeostase hidroeletrólítica, além de outros comportamentos, este projeto foi desenvolvido com o intuito de elucidar estas indagações a cerca desta associação (Etanol gestacional e as consequências no controle hidroeletrólítico).

Como os efeitos episódicos do etanol e outros xenobióticos durante a fase embriônica podem afetar sistemas específicos de neurotransmissores (Druse et al., 1991; Sundstrom et al., 1993; Tajuddin and Druse, 2001; Hofmann, 2002; Panhuysen et al., 2004; Suter et al., 2007; Zhou et al., 2010; Coffey et al., 2013; Agila et al, 2014), conjecturamos, então, a possibilidade do etanol alterar o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos. Nosso escopo hipotético de embasamento foi instaurado a partir da proposta de que o desenvolvimento do sistema serotoninérgico encefálico, poderia ser afetado de forma indelével, caso exposto ao etanol em um período crítico de formação deste tipo de neurônio. A partir desta premissa, nos dedicamos à avaliar o apetite ao sódio e outros comportamentos que sofrem influência das projeções serotoninérgicas que se originam no mesencéfalo e no

rombocéfalo, pois estas estruturas iniciam a migração celular na data em que submetemos as ratas grávidas ao tratamento com álcool.

1.1 Influências do Etanol na Neurogênese Embrionária

A formação de conexões efetivamente funcionais no SNC adulto e o modo como as células se organizarão dependem diretamente dos processos de neurogênese e migração celular durante o período embrionário (Miller, 1993, Velez-Domingues, 1998). A formação integral da complexa citoarquitetura neural, presente no animal saudável, é de capital importância para que as funções do sistema neural sejam executadas plenamente. Em função disto, a migração neuronal, a partir da camada do manto do encéfalo em desenvolvimento, é considerada um processo extremamente delicado e crítico para que as funções do SNC possam ser plenamente executadas. Distúrbios durante esta fase podem gerar prejuízos morfofisiológicos que persistirão por toda a vida do indivíduo (Chevassus-Au-Louis et al., 1998; Luhmann et al., 1998; Redecker et al., 1998; Aversi-Ferreira et al., 2004 e 2008; Gorbin et al., 2008).

Os eventos histológicos da migração neuronal são de um modo geral bem estabelecidos em roedores. Em ratos e camundongos o processo de migração neuronal transcorre predominantemente durante o período pré-natal, entre o décimo primeiro (E11) e décimo sétimo dia de gestação (E17), compreendendo 11 ciclos completos de divisão celular (Miller, 1993; Takahashi et al., 1996; Kornblum et al., 1997; Supèr et al., 1998). Mas em algumas regiões do sistema neural estes fenômenos se completam após o nascimento, como no cerebelo (Fujita et al., 1966), no bulbo olfatório (Bedard & Parent, 2004), no hipocampo (Bayer et al., 1972) e na zona sub-ventricular telencefálica (Altman, 1969; Kishi, 1987; Luskin, 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1994).

Todo o processo de estruturação dos agrupamentos neurais encefálicos e a laminação sequencial das camadas neocorticais é iniciado no embrião com a geração de neurônios no epitélio pseudoestratificado ventricular e nas margens da cavidade ventricular do tubo neural. Os neuroblastos formados a partir de células do epitélio pseudoestratificado, nascem dentro de um cronograma geneticamente determinado e migram longas distâncias, a partir das zonas ventricular e subventricular, até alcançarem seus alvos nas vesículas encefálicas em formação (Miller, 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Takahashi et al., 1996; Supèr et al., 1998; Shem et al., 2006, Gorbin et al., 2008; Caviness Jr. et al., 2009).

No epitélio pseudoestratificado ventricular, os neuroblastos sofrem os processos de divisão celular e diferenciação, momento que ocorre intensa síntese de material genético. Todos os futuros neurônios partirão desse epitélio para formarem o córtex cerebral e demais estruturas encefálicas (Takahashi et al., 1996). As diferentes classes de neuroblastos migram em diferentes estágios, alguns partem antes do processo de crescimento do axônio, e outros só migram após o desenvolvimento axonal. Após estes eventos iniciais, as vesículas telencefálicas apresentam três camadas primárias de desenvolvimento: 1) a camada germinal, 2) a camada do manto e 3) a camada marginal. A camada germinal, chamada de zona ventricular, ou camada ependimal, forma o tubo neural original. Nessa camada, as células precursoras dos neurônios dividem-se próximas à luz do tubo neural e, depois de sofrerem o processo de diferenciação, (que constitui o processo em que a divisão de um precursor alcança a etapa final do ciclo de mitoses programadas, para originar um neurônio pós-mitótico) começam a migração da luz para a porção externa do tubo neural, formando a camada do manto, que possui neuroblastos e glia (Takahashi et al., 1996; Supèr et al., 1998).

A migração neuronal é orientada por diferentes populações de células precursoras, como a glia radial, células de Cajal-Retzius, neurônios da sub-placa cortical, entre outras. Diversos mecanismos celulares como interação por contato, controle do ciclo celular, liberação de neurotransmissores e fatores de crescimento também estão envolvidos na

orientação do processo de migração neuronal. A orientação da migração têm o papel de definir as futuras conexões sinápticas e o sítio de estabelecimento do neuroblasto no encéfalo (Edelman & Jones, 1998; Gressens, 2000; Suter et al., 2007; Gorbin et al., 2008). Os neuroblastos que se estabelecem no córtex cerebral se organizam em camadas bem distintas usando a glia radial para chegarem ao seu destino final. O processo de estruturação das camadas de neurônios no córtex é chamado de laminação e é fundamental para a fisiologia normal do cérebro adulto (Takahashi et al., 1996; Gorbin et al., 2008; Caviness Jr.; et al., 2009).

Embora a sinalização molecular que direciona a estruturação do sistema neural ainda não esteja completamente elucidada, várias moléculas sinalizadoras e mecanismos efetores já foram reportados. Interação celular por contato, programação gênica, apoptose, moléculas de adesão, fatores de crescimento, neurotransmissão, promotores gênicos e receptores de membrana são alguns dos mecanismos/moléculas que possuem participação bem estabelecida no desenvolvimento embrionário do SNC (Martinez et al., 1991; Takahashi et al., 1996; Lewis, 1998; Nakagawa et al., 1999; Perron & Harris, 2000; Morrow et al., 2001; Nadarajah et al., 2003; Panhuysen et al., 2004; Shen et al., 2006; Suter et al., 2007; Gorbin et al., 2008; Caviness Jr. et al., 2009; Poon et al., 2010; Joksimovic et al.; 2012, Aguila et al., 2014).

De forma geral, o neuroepitélio de vertebrados pode ser subdivididos em células periféricas, localizadas na borda da placa neural, e células não-limítrofes centrais. As células periféricas atuam como centros de sinalização que induzem a neurogênese em células vizinhas. A sinalização entre estes conjuntos celulares é mediada através de receptores de contato do tipo Notch e fatores protéicos solúveis de curto espectro, como os ligantes Delta, proteína morfogenética óssea (BMP), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), neurogeninas, neurotrofinas e derivados retinóides (Simpson, 1997; Ohtsuka et al., 1999; Perron & Harris, 2000; Bertrand et al., 2002; Gorbin et al., 2008; Caviness Jr. et al., 2009; Poon et al.; 2010; Joksimovic et al., 2012). Este processo mantém uma população de células progenitores e coordena a geração de novos neurônios ao longo da placa neural em desenvolvimento (Lewis, 1998; Louvi & Artavanis-Tsakonas, 2006). Durante o fechamento do tubo neural e da formação das vesículas encefálicas genes de expressão loco-temporal definida (como os genes da família de proto-oncogenes Wnt1, Otx2, Gbx2, FGF8, Pax2 e Pax5) são responsáveis pela formação de grupos de neuroblastos multipotentes que produzem fatores de transcrição específicos, modificando o fenótipo das células vizinhas (Caviness Jr. et al., 2009; Poon et al., 2010, Aguila, et al., 2014)

A formação de grupos definidos de neurônios é um processo padronizado que envolve várias etapas em que sinais indutores inicialmente dividem a placa neural em compartimentos com potencial neuroblastogênico. Estes aglomerados são substituídos por múltiplos centros organizadores locais, que se diferenciam uns dos outros e irão determinar os vários tipos distintos de fenótipos neuronais (Joksimovic et al., 2012). Hynes e colaboradores (1995), por exemplo, demonstraram que a diferenciação de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos é dependente da interação dos neurônios progenitores da linha média do embrião com o neuropóro rostral. Um dos mecanismos relacionados a este efeito é a liberação do fator de diferenciação SHH-N (fragmento aminoterminal resultante da autoclivagem do peptídeo Sonic Hedgehog).

O tratamento de culturas de neuroblastos imaturos com SHH-N promove a formação de neurônios com fenótipo típico de motoneurônios dopaminérgicos da substância negra mesencefálica. Explantes do neuropóro rostral transferidos para a vesícula prosencefálica ou em culturas neurais exerce o mesmo fenômeno indutor, e altera padrão de expressão genômica nos tecidos implantados. Camundongos nocaute para um alelo do gene Wnt1, responsável pela síntese de SHH, apresentam um número extremamente baixo de neurônios

dopaminérgicos no mesencéfalo (Marin & Puelles, 1994; Hynes et al., 1995; Wang et al., 1995; Prakash & Wurst, 2004; Prakash et al., 2006).

Um dos mecanismos para a manutenção do estado indiferenciado das células progenitoras multipotentes é a expressão de receptores Notch, que quando ativados pela interação por contato impedem a expressão de grupos de genes chamados de pro-neurogenitores ou pro-neurais (Ohtsuka et al., 1999; Bertrand et al., 2002; Geling et al., 2006; Gorbin et al., 2008). Em culturas de células embrionárias que não expressam os genes para os receptores Notch1 o neuroepitélio forma um número aberrante de neurônios e rapidamente perde a reserva funcional de células progenitoras (Gorbin et al., 2008; Caviness Jr. et al., 2009). A atividade de proteínas da família CKI (inibidores de ciclina quinase-dependente) também constitui outro importante fator regulador na neurogênese. Camundongos que possuem um alelo mutante não funcional do gene para proteína CKI-p57KIP1 ou CKI-p57KIP2 desenvolvem macrocefalia, displasia, heterotopia e hiperplasia corticais durante a embriogênese e no período pós-natal. Nestes animais ainda é possível notar que o produto destes dois genes participa da orientação da estratificação cortical. Pois mutantes para o gene CKI-p57KIP1 apresentam hiperplasia cortical desde segunda até sexta camada, enquanto os mutantes CKI-p57KIP2 apenas na segunda e quinta camadas (Mairet-Coelho, 2012).

A capacidade indutora das células progenitoras é estritamente limitada à uma janela temporal pré-determinada e específica para cada classe de neuroblasto multipotente (Wurst & Bally-Cuif, 2001; Prakash & Wurst, 2004; Prakash et al., 2006; Shen et al., 2006; Joksimovic et al., 2009; Aguila et al., 2014). O modelo mais amplamente utilizado para descrever esta dinâmica de sinalização, proposto inicialmente por Wolpert em 1961, postula que os centros de sinalização que operam ao longo dos dois eixos principais do tubo neural se estabelecem em função de uma rede de coordenadas epigenéticas e cartesianas. Sendo que os progenitores neurais assumem destinos celulares distintos, de acordo com sua localização nesta rede (Wolpert, 1969; Rubenstein et al., 1994).

Vários experimentos com culturas de embriões segmentados neurotopograficamente amparam este postulado, mostrando que os segmentos de vesículas encefálicas produzem fatores locais com capacidade de indução fenotípica e indispensáveis para a diferenciação neural naquele segmento, mas que perdem ou alteraram o padrão de indução celular quando aplicados em outros segmentos. O FGF8, por exemplo, é necessário para a formação de neurônios dopaminérgicos na porção embrionária que engloba o mesencéfalo e a parte cranial do rombencéfalo, mas não influencia a maturação de progenitores dopaminérgicos no segmento rombencefálico caudal, e ainda é capaz de induzir a formação deste tipo de fenótipo em segmentos prosencefálicos médio-caudais, que caracteristicamente não formam este tipo de neurônio (Ye et al., 1998). Semelhantemente, o peptídeo SHH é capaz de induzir a formação de neurônios dopaminérgicos ectópicos na porção dorsal mesencefálica, e rostral prosencefálica, mas não possui esta atividade na porção mesencefálica ventral (Hynes et al., 1995; Wang et al., 1995).

A migração neuronal para a formação do mesencéfalo é iniciada consuetudinariamente a partir do décimo primeiro dia de vida intra-uterina (E₁₁), e se entende até o décimo sexto dia (E₁₆), em murídeos. O gradiente celular que irá formar o núcleo dorsal da rafe possui um pico de migração e mitoses entre E₁₃ e E₁₄, e o maior pool de neurônios serotoninérgicos é gerado em E₁₄, quando o embrião de rato apresenta cerca de 12 mm de comprimento crânio-caudal, (Lauder & Bloom, 1974; Altman & Bayer, 1981; Lidov & Mollier, 1982; Pardo et al., 1994, Rubenstein, 1998). Os neuroblastos precursores serotoninérgicos se originam na região antero-dorsal do neurospóro rostral, por volta de E₁₁. Apartir deste ponto migram longas distâncias através da linha média do embrião até atingirem seus *loci* específicos ao longo do tronco cerebral. Imediatamente antes da formação dos primeiros neurônios serotoninérgicos, a região médio-caudal do tronco cerebral é transitoriamente sub-dividida ao longo do eixo

antero-posterior em 7 a 8 subcompartimentos, denominados de rombômeros. Sob a influência de diferentes fatores de transcrição locais, como os peptídeos Lmx1b, Pet-1, e Nkx2.2, os rombômeros geram grupos de neurônios fenotipicamente serotoninérgicos, e com destinação especificada (Lidov & Mollier, 1982; Rubenstein, 1998; Brodski et al., 2003).

Os neurônios 5-HT do DRN são os primeiros a se diferenciarem e se originam do primeiro rombômero (R1), localizado próximo ao istmo encefálico (Lidov & Mollier, 1982; Rubenstein, 1998; Brodski et al., 2003; Cheng et al., 2003; McInnes & Mchaud, 2005). Os precursores 5-HT dos outros núcleos da rafe surgem ligeiramente mais tarde à partir de R2-R3 e R5-R7. Os fatores indutores que promovem o surgimento de neurônios serotoninérgicos do DRN e dos outros núcleos da rafe mesencefálica, como o MRN, diferem qualitativa ou quantitativamente. A expressão do fator indutor FGF8, por exemplo, é requisitada em quantidades 5 vezes maiores no DRN do que no MRN para o desenvolvimento de neurônios 5-HT (Lidov & Mollier, 1982; Wallace & Lauder, 1983; Rubenstein, 1998; Brodski et al., 2003; Cheng et al., 2003; McInnes & Mchaud, 2005).

Os neuroblastos que se formam neste período se diferenciam em duas grandes populações, dopaminérgicos e serotoninérgicos. O processo de caracterização morfofuncional dos progenitores serotoninérgicos é engendrado pelo sinergismo entre os peptídeos FGF8, FGF4 e SHH. Esta interação é o fator determinante na diferenciação dos neurônios produtores de serotonina do mesencéfalo e do tronco cerebral, pois em embriões cultivados na presença de inibidores do gene para FGF4 não são detectados neuroblastos serotoninérgicos, e o número de neurônios dopaminérgicos aumenta consideravelmente. Em contrapartida o tratamento de culturas embrionárias com FGF4 e FGF2 eleva significativamente a proporção de células serotoninérgicas em relação às dopaminérgicas, embora FGF2 não seja necessário para este processo (Ye et al., 1998).

Um atraso na migração dos neuroblastos a partir da zona ventricular pode promover dessincronização do desenvolvimento dos vários circuitos encefálicos do adulto (Miller, 1993). A exposição do embrião ao etanol durante a migração neuronal ou quando os neurônios ainda estão situados na camada germinal pode causar prejuízos na estrutura e função de vários agrupamentos de neurônios do adulto (Shetty et al., 1992; Miller, 1993; Liesi, 1997). Reconhecidamente o etanol acarreta atrasos na migração fazendo com que neurônios pós-mitóticos não se estabeleçam adequadamente no loco pré-determinado geneticamente (ectopia e heterotopia neuroniais). Isto ocorre devido ao processo de estruturação dos núcleos cerebrais e do córtex ser dependente de fatores de desenvolvimento que são produzidos e secretados em períodos específicos durante a neuroembriogênese (Miller et al., 1993; Ferreira et al., 2004; Aversi-ferreira et al., 2005; Gorbin et al., 2008).

Outro efeito crônico do etanol sobre o embrião é alteração no padrão de expressão neuronal de neurotrofinas como BDNF e NGF e de seus receptores no córtex e tronco cerebral (Seabold et al., 1998; Heaton et al., 2000; Light et al., 2001; Climent et al., 2002; Miller et al., 2003). O álcool pode afetar a progressão do ciclo celular devido a interferências na sinalização que envolve os fatores de crescimento (Caviness et al., 1999; Miller, 2003). Isto pode ser mediado através da inibição de mediadores pro-mitóticos de crescimento, como por exemplo FGF2 (Luo & Miller, 1997; Siegenthaler & Miller, 2004; Ohrtam et al., 2006), como também pela potenciação de agentes anti-mitogênicos, por exemplo Fator de Crescimento Transformante β 1, resultando em menor número de células formadas (Luo & Miller, 1999; Siegenthaler & Miller, 2005).

Distúrbios neurológicos provocados pelo consumo crônico de álcool ou por repetidos episódios de altas doses etílicas são estudados desde o início dos anos de 1970 (Jones & Smith, 1973; Miller & Robertson, 1993). A exposição pré-natal crônica de ratas e mulheres grávidas está vinculada a várias anormalidades no feto e neonato, como alterações na densidade neuronal no neocórtex, microencefalia, perda da seletividade das células

neuroniais, assimetria facial, ativação da astróglia no córtex cerebral, displasia focal, heterotopia sub-cortical, laminação imprópria e lisencefalia, retardo do desenvolvimento pós-natal, entre outras alterações que caracterizam a Síndrome Alcoólica Fetal (Liesi, 1971; Streissguth et al., 1980; Miller, 1987 e 1993; Miller & Robertson, 1993; Chevassus-Au-Louis et al., 1998; Sanna et al., 2004; Riley & Mcgee, 2005).

Embora seja exígua a quantidade de trabalhos e o conhecimento acerca dos mecanismos que envolvem a exposição aguda ao etanol sobre a neuroembriogênese, algumas lesões e déficits comportamentais característicos do DESAF (Distúrbio do espectro da Síndrome Alcolica Fetal) e da SAF (Síndrome Alcolica Fetal) podem ser observados experimentalmente. Utilizando-se camundongos, ratas ou macacas, em protocolos de alcoolização gestacional aguda, vários dos sintomas da DESAF podem ser reproduzidos. Os efeitos deletérios em protocolos de exposição etílica aguda incluem redução da densidade neuronal, em vários núcleos prosencefálicos e do tronco cerebral (Fulginiti et al., 1994; Ashwell & Zang, 1996; Dunty et al., 2002; Miller, 2007; Mooney & Miller, 2007 e 2009); defeitos na formação do crânio (Sulik et al., 1981; Eduwards & Dow-Eduwards, 1991; Pernell et al., 2009), heterotopia e ectopia no bulbo olfatório (Aversi-Ferreira et al., 2006) e no córtex pré-frontal (Ferreira et al., 2004), displasia e redução da densidade neuronal nos córtices (Kotkoskie & Norton, 1989. Aversi-Ferreira & Penha-Silva, 2005), malformação do hipocampo e prejuízos de memória (Minetti et al., 1996; Livi et al., 2003), comportamento relacionado à ansiedade (Mooney & Varlinskaya, 2011) e diminuição da interação social em ratas (Varlinskaya & Mooney, 2014).

Miller (2007) observou que o tratamento de macacas prenhes (*Macaca nemestrina*) com uma dose semanal de álcool (1.8 g/kg, intragástrica), durante as 24 semanas de gestação desta espécie, promove diminuição da densidade cortical total e do número de neurônios gabaérgicos e glutamatérgicos em todas as camadas corticais exceto na camada piramidal externa. Na prole de fêmeas que receberam este mesmo tratamento apenas nas seis primeiras semana de gestação os danos foram significativamente semelhantes.

Paulatinamente os resultados de trabalhos com exposição gestacional aguda ao etanol tem efetivamente demonstrado que existem janelas temporais de elevada susceptibilidade específica, relacionadas ao período de formação das diferentes estruturas do sistema neural. E este tem se tornando o paradigma científico frente a este tipo de abordagem neuroembriotoxicológica, ou seja, os danos causados pela exposição aguda ao etanol são dependentes da relação entre o período de exposição e os eventos neurogênicos em transcurso (Dunty et al., 2002; Heaton et al., 2004; Aversi-Ferreira et al., 2006; Miller, 2006; Mooney & Miller, 2002, 2007; Lopes et al., 2009; Mooney & Varlinskaya, 2011; Tyller & Allan, 2014; Varlinskaya & Mooney, 2014). Vários resultados de experimentos ressaltam as afirmações deste paradigma.

Dunty e colaboradores demonstraram que duas aplicações de 2.9 g/kg/ip de etanol em E₈ exerce indução mais intensa de apoptoses no tronco cerebral, do que quando este tratamento é realizado em E₁₀. O protocolo de alcoolização utilizado por Aversi-Ferreira e colaboradores (2005 e 2006) em E₁₂ produz sérios danos na citoarquitetura do neocórtex e bulbo olfatório, mas este mesmo protocolo não resulta em alterações morfológicas no cerebelo, mesencéfalo e ponte (Souza et al., 2006; Lopes et al., 2009). O grupo do professor Michael Miller da Universidade do Estado de Nova York demonstrou a existência de uma fase inicial e tardia de susceptibilidade aos efeitos agudos do álcool em macacos e ratos, no que se refere a formação de diversos núcleos no tronco cerebral que dão origem a nervos cranianos. Ocorrendo um período refratário entre estes dois extremos, e que estes períodos diferem para os núcleos associados à motricidade ou função sensitiva (Miller, 2001; Mooney & Miller, 2002, 2007 e 2009; Miller, 2009).

Os efeitos gestacionais perniciosos do álcool em protocolos sub-agudos e agudos envolvem não somente morte de neurônios e bloqueio da migração, mas inclui alterações na expressão e atividade de receptores e neurotransmissores (Caviness Jr. et al., 2009). Um grupo de pesquisadores sul-coreanos demonstrou que ninhadas de ratos provenientes de mães que receberam etanol a partir de E₁₅ até o final da gestação (0.5, 1 ou 2g/kg, sc) apresentam redução dose-dependente da expressão de triptofano hidroxilase e da quantidade de 5-HT no DRN. Os autores avaliaram filhotes com três semanas e cinco semanas de vida, e constataram que a redução é mais intensa nas ninhadas mais velhas, o que sugere um efeito envolvendo os mecanismos de regulação da expressão gênica (Kim et al., 2005). Anteriormente, já havia sido demonstrado que este e outros protocolos de alcoolização reduzem a densidade de receptores 5-HT_{1A} e a concentração de 5-HT e do ácido 5-hidroxi-indolacético (seu principal metabólito) no córtex frontal, parietal e no tronco encefálico (Kuriyama et al., 1971; Gothoni & Ahtee, 1980; Tajuddin & Druse, 1988; Druse et al., 1991).

Além de afetar diretamente os processos celulares importantes para o desenvolvimento neural (tais como interação celular, migração e diferenciação neuronal, divisão celular, ativação de receptores), o etanol intrinsecamente possui a capacidade de afetar a expressão de genes por interação direta com o genoma e por meio de mecanismos epigenéticos e (Hsieh & Gage, 2004; Hicks et al., 2010). O termo epigenética definido, inicialmente por Waddington em 1942, refere-se às mudanças na expressão gênica que ocorrem sem mudanças na sequência gênica. Os mecanismos de regulação epigenética desempenham papel fundamental na regulação do desenvolvimento em eucariotos multicelulares, permitindo ocorrência de processos como a expressão tecido-específica de alguns genes, a manutenção de células multipotentes e o *imprinting* genômico. O controle da expressão de genes que são expressos especificamente em certos tecidos é estabelecido e mantido através de modificações estruturais na cromatina (metilação, acetilação, modificações de histonas) e pela atividade dos RNAs de interferência (ex, microRNAs, RNAsn). As modificações estruturais da cromatina regulam a transcrição, enquanto os RNAs de interferência atuam ao nível pós-transcricional. (Reik et al., 2001; Ooi & Henikoff, 2007; Waddington, 2012).

A molécula de álcool e os metabólitos gerados durante seu metabolismo podem interagir com fatores de transcrição e/ou modificar a estrutura da cromatina, alterando, assim, os padrões de expressão de genes. A atividade de enzimas que executam modificações epigenéticas, tais como as metilases e acetilases do DNA e das histonas, é influenciada pela concentração de metabólitos do etanol como o NAD, ATP, e S-adenosilmetionina. O consumo de álcool eleva os níveis destas substâncias. Vários trabalhos tem demonstrado que a exposição aguda e crônica ao etanol promovem alterações na metilação do DNA. A placenta e os filhotes de camundongas tratadas entre E₉-E₁₁ demonstram hipometilação ao longo do genoma e níveis significativamente reduzidos de atividade da DNA-metilase (Garro, 1991; Haycock & Ramsay 2009). A administração pré-natal crônica de etanol promove redução da metilação no giro denteado de ratos. E esta alteração epigenética está correlacionada com retardo do desenvolvimento nestes animais (Chen et al., 2013). Em células que estão na fase de divisão celular é relatado o efeito oposto, hipermetilação (Hicks et al., 2010).

A presença de etanol na fase intra-uterina pode promover a redução da expressão de microRNAs no córtex de camundongos (Sathyan et al., 2007) e pode aumentar quando se analisa o encéfalo todo ou em culturas de embrião (Wang et al., 2009). Outro efeito bem reportado do álcool sobre os mecanismos de controle epigenético, é a influência desta droga na estrutura das histonas, interferindo de diferentes maneiras nas várias classes destas proteínas nucleares. Em hepatócitos de ratos, por exemplo, o etanol provoca acetilação dose-dependente da histona H3 (Park et al., 2003). Em camundongos as ninhadas submetidas à alcoolização intra-uterina apresentam acetilação das histonas H3 e H4 na amígdala, que subsequentemente leva a redução da expressão do gene que codifica neuropeptídeo Y (Pandey

et al., 2008). Embriões expostos a episódios agudos de álcool na metade da gestação apresentam acetilação aumentada das histonas H3K9/18, bem como a morte celular programada aumentada no pulmão fetal (Wang et al., 2010).

Embora o modelo hodológico para a compreensão do espectro de insultos, que agudamente, o etanol pode promover sobre a neuroembriogênese seja em grande parte tácito, e elaborado sobre muitas correlações com os incontáveis estudos crônicos, muitas evidências experimentais suscitam conclusões muito claras sobre a susceptibilidade do sistema neural ao consumo gestacional agudo de álcool. De forma sintética, os resultados de trabalhos que versam sobre os efeitos agudos do etanol na neuroembriogênese assinalam a existência de várias formas de interferência deletéria sobre o desenvolvimento do sistema neural. Tais como redução da expressão de genes pro-neurogênicos, da migração celular, da diferenciação dos neuroblastos, da atividade de fatores neurotróficos, e ainda causando prejuízo em sistemas específicos de neurotransmissores, além de diversos tipos diferentes de alterações epigenéticas (Webster et al., 1980; Sulik et al., 1981; Molina et al., 1985; Vigliecca et al., 1989; Garro, 1991; Fulginiti et al., 1994; Minetti et al., 1995; Ashwell & Zang, 1996; Haycock; Luo & Miller, 1999; Dunty et al., 2002; Park et al., 2003; Hsieh & Gage, 2004; Ferreira et al., 2004; Siegenthaler & Miller, 2004; Aversi-Ferreira & Penha-Silva, 2005; Kim et al., 2005; Ohrtam et al., 2006; Sathyan et al., 2007; Pandey et al., 2008; Caviness Jr. et al., 2009; Haycock & Ramsay 2009; Wang et al., 2009; Hicks et al., 2010; Chen et al., 2013; Tyller & Allan, 2014).

1.2. Controle Neuroendócrino do Equilíbrio Hidroeletrólítico

A capacidade de adaptação ao ambiente terrestre por parte dos vertebrados está efetivamente ligada ao desenvolvimento de mecanismos homeostáticos que permitiram a manutenção de um equilíbrio hidroeletrólítico dinâmico. Em função das pressões seletivas inerentes a este ambiente, em que ocorre constante desidratação e os íons sódio não estão prontamente disponíveis, desenvolveram-se nestes organismos, conjuntos de respostas neuroendócrinas e comportamentais capazes de compensar as flutuações intermitentes na quantidade de água e eletrólitos dos vários compartimentos celulares (Schmidt-Nielsen, 1997; Pough et al., 2008; Widmark et al., 2011). Os primeiros Tetrápodes do período Devoniano da era Paleozóica, sob a influência de tal pressão de seleção, desenvolveram a capacidade de detectar e responder rápida e apropriadamente às alterações na volemia e na osmolalidade dos fluídos extracelulares, por meio da ativação de complexos sistemas de controle osmorregulatório (Gilles, 1979; Johnson & Edwards, 1990; Denton et al., 1996; Takei, 2000; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Dijk, 2011).

Dentre tais adaptações, desenvolvidas pelos vertebrados nestes 450 milhões de anos de seleção, os comportamentos motivacionais que induzem a busca por água e por alimentos contendo sódio são de capital importância para a manutenção da homeostase. Estes comportamentos estão envolvidos na regulação de dois parâmetros homeostáticos que possuem uma estreita faixa de variação em seus limites fisiológicos compatíveis com vida, a volemia e a osmolalidade do líquido extracelular (LEC). O controle da osmolalidade e do volume dos líquidos corpóreos é coordenado por diversos mecanismos neurais, autonômico-viscerais, endócrinos e comportamentais. O apetite ao sódio, indutor da ingestão de sal, constitui um destes importantes mecanismos homeostáticos associados à regulação dos fluídos corporais e manutenção da vida (Johnson & Thunhorst, 1997; Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis, 2007; Bourque, 2008).

O meticuloso ajuste nas concentrações de Na^+ intra e extracelulares é preponderante na geração de componentes fisiológicos essencialmente vitais, tais como: a excitabilidade de células neurais e musculares, o turgor intracitoplasmático, a manutenção da volemia e o débito

cardíaco, e conseqüentemente, uma adequada perfusão tecidual (Anderson, 1971; Fitzsimons, 1998; Weisinger et al, 2004; Orlov & Mongin, 2007). O sódio intersticial e plasmático exerce força osmótica que se contrapõe a elevada pressão coloidosmótica do meio intracelular, que possui alta concentração de proteínas. Para exercer tal atividade regulatória sobre os volumes de fluídos nos líquidos intracelulares (LIC) e no líquido extracelular (LEC), a concentração extracelular de Na^+ deve ser cerca de 10 vezes superior à concentração intracelular. O potencial eletroquímico para o Na^+ promove tendência à difusão deste íon para o interior das células, sendo que a manutenção de níveis extracelulares de Na^+ vertiginosamente mais elevados que os níveis intracelulares é obtida às expensas de um enorme consumo de energia. Cerca de 25% de toda energia metabólica basal é dispendida no transporte ativo de sódio para o meio extracelular, e esta atividade é desempenhada por uma ATPase do tipo P que é ubíqua nas membranas celulares dos organismos do filo chordata, a Na^+/K^+ -ATPase (Bricker & Klahr, 1970; Brody & Akera, 1977; Verbalis, 1996; Hasler et al., 1998; Daniels & Fluharty, 2004, Aperia, 2007; Anderson et al., 2008).

Na natureza, a obtenção de sódio por parte dos mamíferos terrestres é efetuada exclusivamente através da ingestão de alimentos ricos neste elemento ou de fontes minerais de cloreto de sódio. No indivíduo hígido, a concentração plasmática deste íon é criticamente mantida entre 138-146 mmol/L, mesmo ocorrendo ampla variação diária no conteúdo de sódio corporal, decorrente de fatores como a eliminação de sódio via transpiração, o teor de Na^+ na dieta, modificações no padrão de absorção intestinal e na taxa de excreção urinária. Os limites inferiores e superiores, que transitoriamente, são compatíveis com a vida situam-se, aproximadamente, dentro dos valores de 115 mmol/L e 175 mmol/L, respectivamente (Geerling & Loewy, 2008; Esteva-Font et al., 2012; Koeppen & Stanton, 2012). Alterações fisiopatológicas como vômitos, diarreias, câimbras, hipo ou hiperreflexia, convulsões, apatia e coma começam a ser desencadeadas quando a concentração de sódio está abaixo de 135 mmol/L ou acima de 147 mmol/L (Arieff & Guisado, 1976; Friedler et al., 1977; Humes et al., 1979, Candela & Yucha, 2004, Naeini et al., 2006).

Conjecturando-se unicamente o papel majoritário que o sódio possui na manutenção dos volumes plasmático e intracelular, torna-se evidente a importância adaptativa de um estado motivacional que induz apetite seletivo a fontes de alimento que contenham este íon. Em diversas espécies, especialmente de mamíferos, a ativação deste comportamento motivacional inato, mas que também sofre influência de experiências prévias, é fundamental no reestabelecimento da homeostase hidroeletrolítica após os desafios ambientais que reduzem a concentração de sódio no LEC (Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Daniels & Fluharty, 2004; Geerling & Loewy, 2008)

A manutenção do volume de líquidos e do teor de sódio corporal é estabelecida pelo organismo equilibrando continuamente a aquisição e as perdas diárias do conteúdo hidromineral. As respostas homeostáticas (neuroendócrinas, autonômicas, renais, comportamentais) envolvidas no controle da osmolalidade plasmática e do volume extracelular coordenam primariamente a ingestão e a excreção urinária de água e eletrólitos (Denton, 1996; Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Candela & Yucha, 2004; Geerling & Loewy, 2008), mas outros fatores como a absorção e a excreção intestinal de sódio podem também ser modulados pelos efetores neuroendócrinos (Hosomi & Morita, 1996; Drummer et al., 1996; Koeppen & Stanton, 2012). As células sensoriais pertinentemente envolvidas no controle da homeostase hidrossalina avaliam continuamente as alterações no volume e na concentração de íons dos líquidos corporais. Que são os dois estímulos centrais na geração e modulação das respostas neuroendócrinas destinadas a preservar o equilíbrio hídrico e iônico.

Algumas das respostas adaptativas desencadeadas por perturbações hemodinâmicas e na osmolalidade envolvem a ativação de comportamentos operantes altamente preservados

em termos filogenéticos, a sede e o apetite ao sódio. Em face de privação alimentar de sódio, a redução da concentração corpórea deste ânion é capaz de impelir o animal a um estado de agitação psicomotora em busca de fontes de alimento que contenham cloreto de sódio, para que sejam restabelecidos vários parâmetros concernentes à homeostase hidroeletrólítica (Anderson, 1971; Fitts et al., 1990; Stellar, 1993; Fitzsimons, 1998; Menani et al., 2000; Daniels & Fluharty, 2004; Johnson, 2007; Reis et al., 2007; De Luca Jr. et al., 2010). Mas o apetite por sódio não é desencadeado apenas por hiponatremia isoladamente, é necessário que a diminuição na concentração de sódio do compartimento extracelular seja acompanhada por redução de volume dos líquidos extracelulares (Thunhorst & Johnson, 1994; Thornoton et al., 1995; Fitzsimons, 1998; Daniels & Fluharty, 2004; Geerling & Loewy, 2008; De Luca Jr. et al., 2010).

A redução do volume plasmático, entre outras respostas, promove a formação de um peptídeo com ação endócrina e parácrina que possui potente atividade dipsogênica e natriorexigência, a Angiotensina II (ANGII). Este octapeptídeo possui participação central no controle da função cardiovascular, afetando especialmente o balanço hidroeletrólítico e o tônus vascular, por meio de múltiplas ações em células alvo localizadas em vários tecidos diferentes. A infusão de ANG II sistemicamente ou intracerebroventricular (icv) é capaz de desencadear vigorosas respostas homeostáticas destinadas a preservar os níveis de sódio e água corporal, tais como: aumento da estimulação simpática renal, secreção de aldosterona, liberação de vasopressina, vasoconstrição e aumento da ingestão de água e sódio (Matsusaka & Ichikawa, 1997; Atlas, 1998; Fitzsimons, 1998; Campebell, 2003; Santos & Ferreira, 2007; Fyhrquist & Saijorunaa, 2008; Ferrario, 2010; Wright & Harding, 2011). As principais ações da ANG II envolvendo a regulação dos fluidos corporais são mediadas pela ativação dos receptores angiotensinérgicos do tipo AT1. Estes receptores são encontrados em várias áreas do SNC, nos vasos sanguíneos, pulmões, fígado, rins, coração, adrenais e outras glândulas endócrinas.

Embora a ANG II também atue em receptores AT2 (que também são extensamente distribuídos no hipotálamo, e possuem atividade contra-regulatória aos receptores AT1) (Van Esch et al., 2006; Coleman et al., 2009); é a ativação de AT1 que gera vasoconstrição, retenção renal de sódio e água, sede, apetite ao sódio, secreção de vasopressina e de aldosterona, (esta última com efeito mais pronunciado sobre a reabsorção renal de água e Na⁺) (Atlas, 1998; Fitzsimons, 1998, Campebell, 2003; Kaschina & Unger, 2003; Antunes-Rodrigues, 2004; Van Esch et al., 2006; Santos & Ferreira, 2007; Fyhrquist & Saijorunaa, 2008; Wright & Harding, 2011).

A despeito da ANG II possuir atividades dipsogênica e natriorexigência mediadas pelo mesmo receptor (AT1), existem algumas diferenças marcantes na geração e expressão destas respostas. Administração sistêmica de doses dipsogênicas de ANG II não possui efeito natriorexigênico (Sakei et al., 1990). A administração icv de ANGII pode induzir rapidamente apetite ao sódio, mas em doses muito mais elevadas que as necessárias para produzir efeito dipsogênico, neste mesmo contexto. Em todos os paradigmas experimentais que promovem desidratação extracelular, e por tanto evocam liberação de ANG II, a ingestão de sódio exibe uma latência de várias horas após o início da ingestão de água. Em parte, a existência desta janela temporal para o surgimento da ingestão de salina é justificada pela necessidade de inibição das vias neurais que bloqueiam tonicamente o apetite ao sódio em condições de normonatremia. E também, pela ação antinatriorexigência da ocitocina (OT), que é liberada pelos estímulos hipovolêmicos nas fases iniciais da ingestão de água (que em sequência é suprimida em função da diluição dos fluidos extracelulares, permitindo a expressão do apetite ao sódio). Outra consideração importante no modelo hodológico da sede e do apetite ao sódio induzidos pela ANG II é que estes dois comportamentos são processados por vias de sinalização intracelular diferentes. A formação intracelular de fosfatidil inositol induz sede,

enquanto a ativação da via das MAPKs conduz a expressão do apetite por sódio (Sakai et al., 1990; Stricker, 1992; Antunes-Rodrigues, 2004).

A liberação de ANG II na circulação envolve uma complexa interação entre moléculas protéicas sintetizadas por diferentes tecidos. A ativação deste sistema hormonal chamado de Sistema-Renina-Angiotensina (SRA) pode ser desencadeada por três condições diferentes, mas que podem apresentar-se concomitantemente e com envolvimento sinérgico. A estimulação simpática dos receptores β -1 adrenérgicos, a redução do fluxo sanguíneo na arteríola aferente renal e a diminuição da quantidade de sódio em contato com as células da mácula densa presentes no aparelho justaglomerular. Diante de tais condições, as células justaglomerulares promovem clivagem, ativação e secreção de uma pro-enzima armazenada em grânulos intracelulares denominada de Renina (Lorenz et al., 1991; Campebell, 2003; Santos & Ferreira, 2007; Batenburg et al., 2007; Ferrario, 2010; Peti-Peterdis & Harris, 2010).

Uma vez liberada no plasma sanguíneo a renina cliva uma α -globulina produzida pelo fígado, denominada de Angiotensinogênio (ANGT), que por sua vez possui níveis plasmáticos cerca de mil vezes superiores aos níveis de renina, sendo então, prontamente metabolizado quando as concentrações plasmáticas de renina se elevam. O produto desta reação, a ANG I, é um decapeptídeo com baixa afinidade pelos receptores AT1. A remoção dos dois últimos resíduos de aminoácidos desta molécula forma a ANG II. Esta reação é catalisada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), que possui atividade dipeptidil carboxipeptase. Embora esta clivagem possa ser eficientemente executada por outras proteases como a quimase, catepsina e a elastase, os níveis plasmáticos de ANG II são determinados efetivamente pela ação da ECA, que além de atuar sobre a Ang I para formar a Ang II também realiza a hidrólise de outros peptídeos circulantes, como a bradicinina (Atlas, 1998; Turner & Hooper, 2002; Campebell, 2003; Leung, 2008; Ferrario, 2010).

Esta enzima é uma metaloprotease de membrana encontrada abundantemente no endotélio dos vasos pulmonares, e pode ser detectada também na placenta, no intestino, no encéfalo, nos túbulos renais e no plasma. Em muitos órgãos ocorre produção intracelular de ANG II, que atua como agente parácrino e autócrino. Nestes órgãos, como o coração, o cérebro, pâncreas, gônadas e os rins, são expressos todos componentes do sistema-renina-angiotensina. (Matsusaka & Ichikawa, 1997; Atlas, 1998; Campebell, 2003; Batenburg et al., 2007; Santos & Ferreira, 2007; Feldt et al., 2008; Leung, 2008; Ferrario, 2010; Peti-Peterdis & Harris, 2010; Wright & Harding, 2011).

Recentemente foi demonstrado que a renina e a pro-renina circulantes podem ativar um receptor específico que estimula a via intracelular para a geração de ANG II, assim como também podem ativar outras vias de sinalização intracelular (Campebell, 2003; Feldt et al., 2008; Batenburg et al., 2007; Fyhrquist & Saijorunaa, 2008; Leung, 2008; Schefe et al., 2008; Ferrario, 2010, Wright & Harding, 2011). Tanto a formação sistêmica quanto neuronal de ANG II podem promover a sede e o apetite ao sódio, mediados pela ativação dos receptores AT1 cerebrais. Embora a ANG II plasmática não atravesse a barreira hematoencefálica, muitos neurônios implicados na geração destes comportamentos estão localizados em regiões encefálicas desprovidas deste isolamento vascular que os astrócitos protoplasmáticos formam; como o Órgão Subfornicial (SFO) e o Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT). Estas estruturas ainda possuem a capacidade de captar ANG I circulante para a formação de ANG II (Yang & Epstein, 1991; Beresford & Fitzsimons, 1992; Fitzsimons, 1998; Daniels & Fluharty, 2004; Fry & Ferguson, 2007; Wright & Harding, 2011).

Adicionalmente às ações diretas sobre a ingestão e a reabsorção renal de água e sódio, os efeitos da ANG II são potencializados pela liberação de aldosterona, tornando mais complexo este sistema hormonal osmorregulatório que é ativado pela liberação de renina. Chamado em conjunto de sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A liberação de aldosterona é estimulada principalmente por ativação direta dos receptores angiotensinérgicos

localizados na zona glomerulosa das glândulas adrenais e por elevações na concentração plasmática de potássio. O papel da aldosterona na regulação hidroeletrólítica envolve, especialmente, aumento da reabsorção de sódio e a excreção/secreção de potássio e íons hidrogênio no colón e nos rins. Mas outros órgãos como glândulas salivares e sudoríparas também são alvos das ações mineralocorticoide. Nestes tecidos a aldosterona promove o aumento da expressão dos canais epiteliais de sódio e da Na^+/K^+ -ATPase, que é ativada pela entrada de Na^+ na célula através dos canais de sódio, devolvendo-o para o meio extracelular (Galaverna et al., 1993; Zhang et al., 1993; Falkenstein et al., 2000; Sakai et al., 2000; Booth et al., 2002; Tait et al., 2004; Conell & Davis, 2005; Mello-Aires, 2008).

Estas respostas da aldosterona dependem da interação com o receptor citoplasmático de mineralocorticoide (RM). O complexo formado (aldosterona-receptor) é translocado para o núcleo, liga-se a sítios específicos de cromatina e induz alterações transcricionais e traducionais, alterando o padrão de expressão protéica das células que possuem estes receptores. Como os glicocorticóides também apresentam afinidade por receptores RM e são encontrados no plasma em concentrações 500 vezes maiores que os mineralocorticóides, as células alvo para a ação específica da aldosterona expressam constitutivamente a enzima 11β -hidroxi-esteróide desidrogenase do tipo 2 (HSD2), que promove inativação dos glicocorticóides (Falkenstein et al., 2000; Harvey et al., 2000; Odermatt et al., 2001; Conell & Davis, 2005; Geerling et al., 2006; Leite-Dellova et al., 2011; Braga-Sobrinho et al., 2012).

Esta enzima, peremptoriamente, encontrada nos tecidos responsáveis às ações da aldosterona, é considerada um marcador de tecidos sensíveis à ação mineralocorticoide, quando co-localizada com o RM (Geerling & Loewy, 2006). A HSD2 pode ser encontrada nas células dos tubos renais, do colón, nas parótidas, glândulas sudoríparas, em outros epitélios com capacidade de absorção de Na^+ , e recentemente foi encontrada em neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS) (Falkenstein et al., 2000; Harvey et al., 2000; Odermatt et al., 2001; Conell & Davis, 2005; Geerling et al., 2006; Geerling & Loewy, 2006; Leite-Dellova et al., 2011; Braga-Sobrinho et al., 2012).

As alterações genômicas dos mineralocorticóides iniciam-se cerca de 40 minutos após a estimulação dos receptores citoplasmáticos para mineralocorticóides. Mas estas respostas levam várias horas para que a expressão fenotípica esteja completa (inserção de moléculas transportadoras na membrana, aumento do número de canais Na^+ -sensíveis, etc.). Entretanto, a aldosterona também pode promover respostas rápidas na função cardíaca, no apetite ao sódio e na função renal, que não são afetadas por drogas que bloqueiam a transcrição (ex. actinomicina D) e a tradução gênica (ex. ciclohexamida), nem por antagonistas de RM como a espirolactona. (Falkenstein et al., 2000; Odermatt et al., 2001; Conell & Davis, 2005). Portanto, são consideradas repostas independentes dos mecanismos genômicos e estão associadas ao aumento da atividade das PKC, MAPK e ao influxo de íons Ca^{2+} . Em relação ao apetite ao sódio as repostas não-genômicas dependem da interação do metabólito hepático não-conjugado tetrahydroaldosterona, que se liga a receptores de membrana acoplados a canais iônicos (Sakai et al., 2000; Fluharty, 2002; Daniels & Fluharty, 2004)

Embora a aldosterona não seja imprescindível para que o apetite ao sódio seja desencadeado, visto que animais adrenalectomizados continuam a ingerir sódio sob diversas condições experimentais, evidências de vários trabalhos há muito, reportam a participação dos mineralocorticóides na modulação da ingestão de sódio. A administração de aldosterona aumenta a ingestão de salina em animais depletados de sódio e também a ingestão basal de sódio em ratos adrenalectomizados e intactos (Wolf, 1965; Fregley et al., 1966; McEwen et al., 1986). Rice e Richter em 1943 descreveram que a administração crônica de altas doses de desoxicorticosterona induz aumento da ingestão de salina em ratos. Fluharty e Epstein (1983) demonstraram que administração conjunta da aldosterona com a ANG II por via intracerebroventricular estimula o apetite ao Na^+ mais precocemente, em menores doses e

com maior magnitude comparativamente a indução deste comportamento usando as duas substâncias isoladamente.

Além do aumento da expressão e da sensibilização central dos receptores AT1 (Denton et al., 1994; Jonhson & Thunhorst, 1997; Geerling & Loewy, 2006), outras evidências sugerem a participação direta deste esteróide no apetite ao sódio envolvendo os núcleos medial e central da amígdala. Microinjeções de aldosterona nestas regiões aumentam a ingestão de sódio induzida pela administração periférica de aldosterona ou desoxicorticosterona. Enquanto a lesão eletrolítica ou a administração de sequências antisense de oligodesoxinucleotídeos que impedem a transcrição do RNAm para o RM nestes núcleos, caracteristicamente possuem a capacidade de abolir este comportamento. A administração de aldosterona ou corticosterona diretamente na amígdala induz a ingestão de salina hipertônica em ratos não-depletados (Nitabach et al., 1989; Schulkin et al., 1989; Galaverna et al., 1992; Zhang et al., 1993; Sakai et al., 1996 e 2000).

O conjunto de respostas ativado pelo SRAA é destinado a restaurar, principalmente, a volemia e a natremia após declínio destas variáveis plasmáticas. Entretanto, a resposta ingestiva de sódio pode sobrepujar o limiar necessário para reestabelecer a natremia gerando hiperosmolalidade. O aumento da osmolalidade caracteristicamente irá suscitar respostas neuroendócrinas no sentido de diminuir a concentração extracelular de íons, especialmente de Na^+ , promovendo inibição do apetite ao sódio, sede, reabsorção tubular de água e excreção renal de sódio. Estas respostas são mediadas principalmente por neurônios hipotalâmicos responsáveis pela síntese e liberação de OT, Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) e Vasopressina (AVP) ou Hormônio Antidiurético (ADH). Estando a atividade vasopressinérgica associada a indução da sede e da reabsorção de água, enquanto a OT e o ANP estimulam a natriurese e inibem a ingestão de sódio (Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Daniels & Fluharty, 2004).

Os osmorreceptores centrais e periféricos são ativados pela elevação da osmolalidade plasmática, e então enviam estes sinais para as regiões encefálicas que processam e integram estes estímulos, como os núcleos hipotalâmicos pré-óptico mediano (MnPO), paraventricular (PVN), supra-óptico (SON) e outras estruturas rombencefálicas e mesencefálicas como o Núcleo Lateral Parabraquial (NPBL), Área Póstrema (AP), Nucleo do Trato Solitário (NTS) e Núcleo Dorsal da Rafe (DRN). A confluência de sinais eferentes gerados pelo estímulo hiperosmótico, particularmente os que são oriundos de neurônios da lâmina terminal e do NTS, promovem a ativação de neurônios magnocelulares do PVN e SON, que por sua vez, liberam AVP e OT nas proximidades e na corrente sanguínea via axônios que se projetam para a neurohipófise (Fitzsimons 1998; McCann et al., 2003, Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis et al., 2007, Qiu et al., 2004; Chu et al., 2010).

A estimulação elétrica ou infusão de salina hipertônica na região anteroventral do terceiro ventrículo, importante sítio envolvido na avaliação da natremia, resulta em liberação de AVP e aumento da expressão de Fos no SON e no PVN (a proteína Fos é o produto de um protooncogene incluso numa família genes de expressão rápida, usada como indicador de ativação celular). Além da hiperosmolalidade, a ativação angiotensinérgica e reduções na pressão e/ou no volume plasmático são eficientes estímulos para a liberação de AVP. Em resposta a tais eventos ocorre ativação de neurônios vasopressinérgicos, seguida pela liberação de AVP na circulação. Elevação na osmolalidade plasmática na ordem de 2% é suficiente para promover a secreção de AVP e ainda estimular a síntese de mais moléculas deste peptídeo nos neurônios do SON (Verney, 1947; Walker et al., 1988; Langraf et al., 1992; Antunes-Rodrigues et al., 2004).

Estes neurônios vasopressinérgicos possuem a capacidade intrínseca de detectar alterações na concentração de Na^+ do meio extracelular e liberar AVP (Chu et al., 2010), que promove vasoconstrição e aumento da reabsorção de água nos ductos coletores (por meio da

transcrição do gene que regula síntese dos canais de aquaporina tipo 2 e aumento da translocação destes canais para a membrana apical da células epiteliais tubulares). A ação vasoconstritora é dependente da interação da AVP com receptores V1 e os efeitos antidiuréticos são dependentes dos receptores V2 expressos nos ductos coletores renais (Lolait et al., 1992; Thibonnier et al., 1994; Nielsen et al., 1995; Matsumura et al., 1997; Yamamoto et al., 1997; Mello-Aires, 2008). As células secretoras de AVP, encontradas em maior densidade no SON, podem ser seletivamente ativadas em resposta a redução do volume do LEC dissociada de hiperosmolalidade, condição em que não ocorre liberação concomitante de quantidades significativas de OT e AVP (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Qiu et al., 2004, Bourque, 2008).

A liberação de OT em resposta ao aumento da osmolalidade é resultante da atividade excitatória das projeções neurais que chegam ao PVN proveniente dos osmorreceptores centrais localizados na lâmina terminal (SFO, MnPO e OVLT) e das estações encefálicas de retransmissão da informação osmótica periférica, como NTS e NPBL. Estimulação dos receptores gustativos e viscerais pelo sódio é capaz de aumentar a liberação de OT no plasma. Estas informações são enviadas ao NTS que emite fibras de projeção para o NPBL e o DRN, e estes núcleos excitam neurônios magnocelulares do PVN que liberam OT. O NTS também emite projeções que cursam diretamente para o PVN (Conrad et al., 1993; Stricker & Verbalis, 1996; Gutkowska et al., 1997; Antunes-Rodrigues et al., 2013; Gutkowska et al., 2014). A OT promove osmorregulação por ação direta sobre os rins induzindo natriurese e caliurese, e sobre o SNC inibindo os principais núcleos envolvidos com o apetite ao sódio. Inúmeras manipulações experimentais podem ilustrar o efeito anti-natriorexigênico deste peptídeo. A administração icv de OT inibe a ingestão de sódio induzida por furosemida, enquanto que o bloqueio central dos receptores de OT aumenta a ingestão de salina induzida por desidratação extracelular e também em condições de hipertonicidade plasmática. Camundongos que não expressam o gene para síntese de ocitocina demonstram maior ingestão de salina após privação hídrica. (Conrad et al., 1993; Morris et al., 1994; Stricker & Verbalis, 1996; Puryer et al., 2001; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Gutkowska et al., 2014)

De forma indireta a OT ainda contribui para osmorregulação estimulando cardiomiócitos atriais e neurônios a liberarem ANP. Este hormônio/neuromodulador, de caráter peptídico, participa do controle cardiovascular e hidroeletrolítico atuando no SNC e em tecidos periféricos (Antunes-Rodrigues et al., 1991; Debold et al., 1996). Neurônios presentes na região Antero-Ventral do Terceiro Ventrículo (AV3V) e no PVN possuem um papel crítico na síntese de ANP cerebral. Estas estruturas secretam ANP em resposta a estimulação hiperosmótica, gerando natriurese e elevação da concentração plasmática do mesmo. Lesões eletrolíticas na região AV3V promovem redução da excreção renal de sódio e supressão da liberação aumentada deste hormônio em resposta a expansão do volume plasmático (Charles et al., 1991; Antunes-Rodrigues et al., 1993; Gutkowska et al., 1997; Gutkowska et al., 2014).

A concentração plasmática basal de ANP é coordenada pelas respostas reflexas decorrentes da distensão da parede atrial, enquanto o aumento da produção atrial e as elevações nos níveis de ANP sanguíneo (frente aos desafios proporcionados pelo aumento da osmolalidade e da volemia) dependem consideravelmente da liberação neuronal deste peptídeo pelo hipotálamo. Administração icv de ANP exerce pronunciada atividade sobre neurônios que possuem função osmorregulatória, determinando inibição da sede e do apetite ao sódio induzidos por aplicação central de ANG II, por privação hídrica e por depleção de sódio. Fora do SNC a ativação dos receptores ANPérgicos provoca inibição da liberação de renina, redução da síntese de aldosterona, natriurese, vasodilatação, efeito cardioprotetor, redução da atividade simpática, estimula a síntese de óxido nítrico, e uma miríade de outras

ações contrárias às exercidas pela ANG II (Antunes-Rodrigues et al., 1986, 1990 e 1993; Weisinger et al., 1992; McCann et al., 1994, Haanwinkel et al., 1995; Chrigher et al., 2001).

1.3 Ativação dos Neurônios Osmo/Sódio sensíveis e Apetite ao sódio

Operacionalmente definido como a ingestão de solução de NaCl hipertônica em concentrações usualmente aversivas ao paladar de roedores em normonatremia, o apetite ao sódio pode ser experimentalmente engendrado por privação hídrica, dieta hipossódica, adrenalectomia, aplicação subcutânea de coloides (que promovem retirada de líquido vascular), aplicação sistêmica ou icv de ANG II, tratamento crônico com mineralocorticoides, administração icv de soluções iso ou hipotônicas, hemorragia induzida, hipotensão, diálise peritoneal, depleção corpórea de sódio por meio do uso de fármacos diuréticos/natriuréticos, e a associação destas intervenções (Richter, 1936; Falk, 1965; Jalowiec, 1974; Sakai et al., 1986; Ferreyra & Chiaraviglio, 1976; Weisinger et al., 1985; Stricker et al., 1985; Thunhorst & Jonhson, 1994; Fitzsimons, 1998; De Luca Jr. et al., 2002; Mecawi, et al., 2008). Recentemente, Mecawi e colaboradores (2013) demonstram que quatro dias de dieta pobre em sódio é capaz de desencadear proeminente apetite ao sódio, envolvendo o sistema Renina-Angiotensina, sem provocar alterações cardiovasculares significativas.

Animais tratados com o diurético furosemida (10 mg/kg, s.c.) associado com captopril (5 mg/Kg, s.c), um inibidor ECA, apresentam um rápida resposta natriorexigência, cerca de uma hora após o tratamento. Este protocolo, sinteticamente denominado de FUROCAP no meio acadêmico, induz hipovolemia combinada com rápido aumento da formação de ANG II no SNC (Thunhorst & Jonhson, 1994; Fitzsimons, 1998; De Luca Jr. et al., 2002). Devido a facilidade de execução, reprodutibilidade, e curto tempo para geração dos efeitos dipsogênicos e natriorexigênicos, este é um dos modelos mais utilizados nos estudos que perscrutam a morfologia e fisiologia do sistema de regulação hidroeletrolítica. Fisiologicamente a geração do apetite ao sódio é resultado da detecção de sinais humorais e sensoriais específicos por células especializadas difusamente, distribuídas tanto no sistema neural central quanto periféricamente. Tais células promovem a transdução destes estímulos e se conectam com as regiões encefálicas que coordenam as respostas homeostáticas direcionadas a manter o equilíbrio hídrico e iônico.

Os neurônios sensitivos implicados na regulação hidroeletrolítica são responsáveis por traduzir as mudanças na pressão osmótica extracelular em sinais elétricos que ativam áreas encefálicas envolvidas no controle da ingestão de água e sal, e da excreção renal destes elementos. Estas células sensoriais, que podem estar localizadas tanto periféricamente quanto no SNC, tem a atividade diretamente influenciada por estímulos ligados ao status hidromineral do organismo, tais como a concentração plasmática de ANG II, flutuações na osmolalidade total do compartimento extracelular, variações no conteúdo específico de sódio no LEC/Líquor, alterações de volume e de pressão nos vasos sanguíneos. Todas estas categorias de estímulos sensoriais ativam duas classes distintas de receptores; os osmorreceptores- Na^+ (osmo/sódio receptores). Que são neurônios sensíveis as variações na osmolalidade e/ou na concentração extracelular de Na^+ ; e os receptores de volume/pressão. Estes últimos estão presentes em diversos leitos vasculares e são ativados em resposta as alterações na tensão ou no volume vascular, ou seja, detectam estímulos associados a deformação mecânica da membrana da célula sensorial em decorrência da distensão da parede vascular. (Rodrigues et al., 1985; Johnson & Edwards, 1990; Denton, 1996; Antunes-Rodrigues, 2004; Daniels & Fluharty, 2004; Orlov & Mongin, 2007; Bourque, 2008; Geerling & Loewy, 2008; Mohan & Campbell, 2009).

Os receptores de volume/pressão (barorreceptores e receptores de volume) estão localizados principalmente, nos corpos carotídeos, no arco aórtico, nas paredes atriais e no

leito vascular pulmonar, mas também são encontrados em praticamente em todos os grandes vasos (Armour, 1973; Lloyd & Friedman, 1977; Thames et al., 1992; Antunes-Rodrigues et al., 1992; Miura et al., 1996). Os osmorreceptores- Na^+ periféricos distribuem-se, de forma mais ampla na cavidade orofaríngea, no trato gastrointestinal, nos vasos renais, mesentéricos e do sistema porta-hepático. Os osmorreceptores- Na^+ centrais são encontrados principalmente nas estruturas do SNC localizadas em regiões desprovidas de barreira hematoencefálica e próximas das paredes dos ventrículos cerebrais, denominadas de órgãos circunventriculares (Bourque & Oliet, 1997; Antunes-Rodrigues, 2004; Daniels & Fluharty, 2004; Noda, 2006; Bourque, 2008; Geerling & Loewy, 2008; Xiong et al., 2011).

Embora o papel dos receptores de volume e dos barorreceptores sobre a gênese do apetite ao sódio não esteja completamente elucidado, é notório que a integridade da informação aferente transmitida por estes receptores ao SNC constitui um importante componente associado aos comportamentos de ingestão hídrica e salina. Além da redução da pressão arterial potencializar a ingestão de salina hipertônica (Thunhorst & Johnson, 1994; Bourque, 2008), a secção das fibras aferentes oriundas dos barorreceptores atriais e arteriais na região sinoaórtica (impedindo deste modo a transmissão sensorial até o NTS, que é o principal centro que recebe informações destes barorreceptores) reduz significativamente a ingestão de salina hipertônica induzida pela administração de furosemida (Thunhorst et al., 1994). O apetite ao sódio pode ser induzido por redução do volume plasmático circulante e/ou hipotensão independentemente das ações da ANG II. Em um modelo de apetite ao sódio induzido por hipotensão, dissociada de hipovolemia, Thornton e co-autores (1995) demonstram que o bloqueio dos receptores AT1 encefálicos, (através da administração icv de losartan), não reduz a ingestão de salina induzida pela administração intravenosa do agente hipotensor Pentonium (bloqueador ganglionar).

Schreihofe e seus colaboradores (1999) mostraram que lesões eletrolíticas crônicas na porção barorreceptiva do NTS não promove extinção da ingestão de água e do apetite ao sódio em resposta a hipovolemia induzida pela administração subcutânea de solução de Polietilenoglicol (PEG). Embora, em primeira instância, estes resultados possam suscitar conjecturas litigiosas concernentes ao papel dos barorreceptores nestes comportamentos, compelindo à falsa interpretação de que os barorreceptores não possuem participação no desencadeamento da ingestão de água e salina frente as perturbações na volemia; os próprios autores discutem objetivamente a importância de múltiplos estímulos neurais e endócrinos na indução destes comportamentos operantes. E ainda ressaltam que a eliminação isolada de um elemento sensorial não é capaz de abolir as respostas homeostáticas compensatórias que contribuem para a regulação do balanço hidroeletrólítico.

Adicionalmente, no trabalho supracitado o grupo lesionado mantém integra a capacidade de liberação de renina e de produção de ANGII em resposta a hipovolemia induzida por PEG ou hemorragia. Os autores aventam a hipótese da lesão conduzir a uma maior sensibilidade às ações da ANG II e também a possibilidade do SNC continuar recebendo informação sensorial pressórica proveniente das aferências dos nervos renais, pois estas não cursam através do NTS (Cirriello, 1998), e talvez de outras vias aferentes até então não descritas. No ano seguinte este grupo demonstrou que os ratos com lesão no NTS, efetivamente apresentam maior sensibilidade às ações da ANGII circulante. Visto que nestes animais a ingestão hídrica induzida pela infusão iv de ANG II desenvolve-se mais intensamente e com menor latência, em relação ao grupo controle (Schreihofe et al., 2000).

A informação gustatória desencadeada pelo contato do cloreto de sódio com os receptores gustativos presentes na língua, e em menor extensão no palato, na faringe, na epiglote e porção superior do esôfago, constitui outro importante elemento regulatório da ingestão salina (Daniels & Fluharty, 2004; Geerling & Loewy, 2008). Os potenciais de ação gerados nas células gustativas sensíveis ao Na^+ são transmitidos aos axônios gustativos

primários que ascendem ao encéfalo via nervos facial, glossofaríngeo ou vago. Sendo que os dois terços anteriores da língua e o palato emitem axônios que irão compor o nervo facial (ramo corda timpânica), o terço posterior da língua para o nervo glossofaríngeo, enquanto as regiões da laringe e faringe enviam axônios gustativos que irão fazer parte do nervo vago (Sugita, 2006; Krause & Sakai, 2007, Bear et al., 2008; Geerling & Loewy, 2008; Curi & Procópio, 2009).

Os estímulos gustatórios que alcançam o encéfalo através destes pares de nervos cranianos se projetam diretamente para o NTS, e desta região rombencefálica para o núcleo parabraquial, que após o processamento desta informação é capaz de promover a restrição da ingestão de sódio, além de retransmitir estes sinais para outras estruturas encefálicas envolvidas na regulação da ingestão salina e da percepção do sabor associado ao NaCl. Após injeção intragástrica de solução salina hipertônica ocorre um rápido aumento da expressão da proteína Fos na AP, NTS e NPBL, o que ilustra a participação dos mecanismos sensoriais pré-sistêmicos na modulação do consumo de sódio (Kobashi et al., 1993; Lindemann, 2001; Antunes-Rodrigues, 2004; Daniels & Fluharty, 2004; Krause & Sakai, 2007; Menani et al., 2014).

Neurônios responsáveis as alterações na pressão osmótica ou na concentração extracelular de sódio podem ser encontrados sobre a parede do trato gastrointestinal, na cavidade orofaríngea, nos vasos sanguíneos renais, mesentéricos e hepáticos, e também em muitas regiões do SNC (Linn et al., 1999; Lindemann, 2001; Sugita, 2006; Bear et al., 2008;). Particularmente nas estruturas localizadas na parede anterior do terceiro ventrículo que compõe a lâmina terminal, principal centro neural associado aos comportamentos que conduzem a ingestão de água e NaCl (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis, 2007). Embora estas respostas comportamentais sejam em parte moduladas por núcleos presentes no tronco cerebral como o NPBL, o NTS, AP e o DRN, a perfeita expressão fenotípica destes componentes comportamentais depende efetivamente da integridade de estruturas prosencefálicas, particularmente os núcleos da lâmina terminal, a amígdala e área septal (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Andrade-Franzé et al., 2010; Menani et al., 2014).

Um vasto contingente de trabalhos demonstra que lesões pontuais ou associadas em diferentes núcleos nos órgãos circunventriculares prosencefálicos (SFO e OVLT), promovem inibição/redução da sede e do apetite ao sódio em diversos paradigmas experimentais que utilizam privação hídrica, hipovolemia e/ou depleção de sódio (Antunes-Rodrigues & Covian, 1963; Covian et al., 1963; Fitts et al., 1990; Vivas & Chiaraviglio, 1992; De Luca Jr. et al., 1992; Johnson & Gross, 1993; Johnson & Thunhorst, 1997; Thunhorst et al., 1999; Mckinley et al., 1999; McCann et al., 2003). Outra abordagem experimental que demonstra o significado funcional do prosencéfalo na geração das respostas dipsogênica e natriorexigênica é a utilização de animais descerebrados, que perdem a capacidade de evocação destes comportamentos. Ratos cujo prosencéfalo é desconectado do tronco cerebral na altura dos colículos superiores não apresentam comportamento de ingestão de água e soluções salinas após desidratação (Schulkin, 1991; Flinn & Stricker, 2003).

Os Órgãos Circunventriculares (CVOs) são estruturas cerebrais especializadas, altamente vascularizadas e que possuem capilares fenestrados desprovidos de barreira hematoencefálica. Nos mamíferos incluem o SFO, o OVLT, AP, a Eminência Média (EM) e a Neurohipófise (NP). Dentre estas estruturas apenas o OVLT, o SFO e a AP possuem corpos celulares com fibras eferentes que se projetam para outras estruturas encefálicas. E por tanto, possuem participação na integração sensorial competente aos CVOs. Que atuam como sensores que detectam alterações na osmolalidade plasmática e do LCR, bem como respondendo a estimulação de fatores regulatórios séricos como ANG II, Interleucina 1 β , OT, ANP, entre outros (Hofe, 1958; Johnson & Gross, 1993; Oldfield & Mckinley, 1995; Mckinley et al., 2003; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Noda, 2006).

Juntamente com o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o OVLT e o SFO formam a lâmina terminal, uma delgada camada de tecido neuronal localizada na linha média periventricular, disposta entre o quiasma óptico e a comissura anterior que une os dois hemisférios cerebrais. Estes núcleos que integram a lâmina terminal além de concentrarem um vasto contingente de neurônios osmo/sódio-sensíveis, também são responsáveis por integrar e redistribuir os sinais originados em órgãos sensoriais viscerais. Gerando respostas neuroendócrinas coordenadas que evitam os efeitos perniciosos da desidratação e da hiponatremia. O MnPO fica situado entre o OVLT e SFO, e seus neurônios também são sensíveis às alterações da osmolaridade e da concentração de sódio nos fluidos extracelulares encefálicos. Além disto, o MnPO é um centro de integração da informação hidroeletrólítica. A informação detectada pelo OVLT e o SFO é transmitida ao MnPO que faz conexões bidirecionais com várias outras estruturas comprometidas com a manutenção da homeostase cardiovascular, como PVN, NTS, SON. O OVLT e a parte ventral do MnPO situam-se na porção anteroventral da parede do terceiro ventrículo, e por vezes são referidos conjuntamente na literatura científica simplesmente como região AV3V (Fitzsimons, 1998; Mckinley et al., 1999; Antunes-Rodrigues et al., 2004, Geerling & Loewy, 2008, Dijk, et al., 2011; Antunes-Rodrigues et al., 2013).

A lâmina terminal é considerada o circuito primário para o desencadeamento operacional do apetite ao sódio e da sede (Bourque et al., 2008; Dijk, 2011), pois nesta região existe alta densidade de neurônios que atuam como sensores específicos do conteúdo de sódio no meio extracelular, que possuem alta densidade de receptores AT1 e respondem apropriadamente às alterações na osmolalidade plasmática. E ainda se projetam para o córtex cingulado anterior, que é responsável pelo processamento cortical destas sensações (Oldfield et al., 1991; Mckinley & Johnson, 2004; Hiyama et al., 2004; Watanabe et al., 2006, Bourque et al., 2008; Tremblay et al., 2010; Dijk, 2011). Diversas manipulações experimentais utilizando-se de lesões eletroquímicas nestas estruturas podem sintetizar tais ilações. Quando o OVLT é lesionado ocorre diminuição significativa do apetite por sódio em animais depletados e diminuição da sede em animais privados de água (Johnson & Gross, 1993). Lesões no SFO promovem redução da ingestão de água e salina em animais hipovolêmicos (Fitzsimons, 1998; McKinley et al, 1999). A obliteração eletroquímica do MnPO reduz a ingestão de salina hipertônica em animais depletados de sódio (Mckinley et al., 1999).

Quando SFO e OVLT são lesionados, mas o MnPO é mantido intacto, o comportamento ingestivo hídrico e salino após privação de água não é completamente abolido, embora consideravelmente reduzido. Diferentemente dos animais em que as três estruturas são afetadas, que perdem completamente esta capacidade de resposta frente a desidratação (Mckinley et al., 1999). De fato, neurônios do MnPO possuem a capacidade intrínseca de responder às alterações na osmolalidade e recebem informações relacionadas à osmolalidade à partir de outros centros neurais que coletam informações dos osmorreceptores, como o NTS. Da mesma forma, lesões que preservam o SFO ou OVLT em detrimento às outras estruturas da lâmina terminal reduzem significativamente a ingestão de líquidos, mas não extinguem completamente estes comportamentos. A expressão do gene c-Fos nestas estruturas, induzida por depleção de sódio e por ANG II, também reforça o conceito de que a lâmina terminal possui papel central na ativação da sede e do apetite ao sódio (Fitts et al., 1990; Thunhorst, 1990; Weisinger et al., 1990; Vivas & Chiaraviglio, 1992; De Luca Jr. et al., 1992; Johnson & Gross, 1993; Rowland et al., 1996; Johnson & Thunhorst, 1997; Thunhorst et al., 1999, Mckinley et al., 1999; Antunes-Rodrigues et al., 2004).

A utilização de ferramentas farmacológicas envolvendo as estruturas da lâmina terminal corrobora com a interpretação dos resultados destes trabalhos. O uso de antagonistas dos receptores angiotensinérgicos AT1, como o losartan, diretamente aplicados no SFO ou no OVLT inibem a sede provocada por infusão intracerebroventricular de salina hipertônica ou

ANG II. O antagonismo dos receptores AT1 nestas estruturas também reduz o apetite ao sódio em animais tratados com furosemida, um diurético de alça que promove espoliação urinária de sódio. A microinjeção de losartan no MnPO de animais com depleção sistêmica de sódio provoca diminuição na ingestão de salina hipertônica, comparativamente a animais depletados que receberem microinjeções de ANG II ou salina isotônica neste núcleo. Bloqueio da formação de ANG II no SFO também inibe o apetite ao sódio após privação hídrica, quando a formação periférica de ANG II também está bloqueada ou diminuída.

Em consonância com estas informações, todas as estruturas da lâmina terminal, após privação hídrica, administração de ANG II ou depleção de sódio, apresentam aumento na expressão da proteína Fos. O uso de microinjeções de losartan diretamente nestas áreas reduz a expressão do gene c-Fos (Buggy & Jonklaas, 1984; Moe et al., 1985; Beresford & Fitzsimons, 1992; Vivas et al., 1995; Denton et al. 1996; Yang & Epstein, 1996; De Luca Jr. et al., 1996; Johnson & Thunhorst 1997; Patuskovas et al., 1997; Crews et al., 2005; Mecawi et al., 2008). A redução da expressão de receptores AT1 no SFO, por meio da administração *in loco* de sequências antisense de oligonucleotídeos, reduz significativamente as respostas homeostáticas desencadeadas pela liberação de ANG II sistêmica (Krause et al., 2008).

Os neurônios presentes na lâmina terminal demonstram presença de um grande número de receptores para ANG II (AT1) e alterações no padrão de disparo em resposta a mudanças na osmolaridade plasmática e do líquido (Vivas et al., 1990; Johnson et al., 1996; Pastuskovas & Vivas, 1997; Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Krause et al., 2008). Caracteristicamente, os neurônios osmosensíveis da lâmina terminal possuem conexões entre si e também conexões bidirecionais com outros centros que participam da modulação das respostas desencadeadas pelos desafios osmoeletrolíticos. Principalmente os núcleos hipotalâmicos Paraventriculares e Supraópticos (que produzem Vasopressina e Ocitocina), o tálamo, locus ceruleus, núcleo leito da estria terminal (BNST), DRN, como também para o Córtex Cingulado Anterior (CCA) onde esta modalidade de sensação é processada. Após a ativação e a integração da atividade destes neurônios osmo/sódio sensíveis do hipotálamo, ocorre intensa modulação sináptica por meio das fibras que chegam a lâmina terminal oriundas de neurônios da AP, do DRN, do NPBL, e que exercem ação antinatriorexigênica (Menani et al., 1996; Olivares et al., 2003; Reis, 2007; Geerling & Loewy, 2008; Hollis et al., 2007; Godino et al., 2009; De Luca Jr. et al., 2010; Bourque, 2011).

A existência neurônios encefálicos sensíveis às $[Na^+]$ e com capacidade específica de responder aos desequilíbrios na osmolaridade dos fluidos que banham os órgãos circumventriculares já era aventada na década de 1970 por Andersson, McCann e outros co-autores (Andersson & McCann, 1955; Anderson et al., 1966; Andersson, 1977). Desde então, o aperfeiçoamento e a acentuada tecnificação dos modelos experimentais permitiram a elucidação de muitos dos aspectos moleculares envolvendo os circuitos neurais que coordenam a homeostase hidroeletrolítica. Além da caracterização do papel dos receptores AT1 nos CVOs e no MnPO, referente a indução das respostas de sede e apetite ao sódio, muitos outros mecanismos de transdução dos neurônios osmo-sódio-sensíveis destas áreas foram elucidados na última década. Ampliando particularmente a compreensão concernente a interação entre os diversos fatores humorais e os elementos moleculares envolvidos na detecção dos desvios que ocorrem na osmolaridade.

No ano de 2000, o pesquisador do Duke Institute for Brain Sciences, Wolfgang Liedtke (que estuda a participação dos canais TRPVs, na nocicepção desencadeada por estímulos osmóticos e mecânicos), em parceria com um grupo de pesquisadores da Rockefeller University liderados pelo professor Jeffrey Friedman, demonstraram a expressão de TRPV4 (que é um canal iônico osmoticamente ativado) no OVLT e no MnPO de camundongos (Liedtke et al., 2000). Três anos mais tarde Liedtke e Friedman mostraram que camundongos

Knockout para TRPV4 apresentam algumas anormalidades nos mecanismos de regulação osmótica. Tais como: menor ingestão de água (tanto em condições basais quanto em resposta a um estímulo hiperosmótico), maior osmolalidade plasmática, e redução da secreção de ADH e da imunoreatividade para a proteína Fos nos CVOs após estimulação com salina hipertônica (Liedtke & Friedman, 2003). Os canais do tipo TRPV4 também são expressos em osmorreceptores periféricos localizados nos vasos hepáticos que são ativados pela redução da osmolalidade. Estes neurônios podem perceber pequenas declinações na osmolalidade dos vasos hepáticos após a ingestão de água e transmitir esta informação ao NTS. Esta capacidade é dependente da expressão de canais TRPV4, pois em animais que não expressam o gene para este canal mecanossensível a ativação destes neurônios osmoreceptivos é completamente abolida (Lechner et al., 2011).

Paralelamente, o grupo de pesquisa associado ao professor Charles W. Bourque da McGill University no Canadá, demonstrou a presença de uma variante do canal TRPV1 em neurônios osmossensíveis do OVLT e SON de camundongos, e reportou que animais Knockout para o gene TRPV1 apresentam os mesmos déficits de osmorregulação que os nocautes para TRPV4 (hipertonicidade plasmática, redução da sede e da produção de vasopressina em resposta ao aumento da hiperosmolalidade). E ainda demonstraram que os neurônios do OVLT e SON destes animais exibem redução significativa da condutância de cátions e da frequência de potenciais de ação evocados por hipertonicidade do meio. (Ciura & Bourque, 2006; Naeini et al, 2006; Bourque, 2008).

Canais de sódio seletivos (Nax) ativados quando as concentrações extracelulares deste íon estão acima de 150 mM foram descritos no SFO de camundongos por um grupo de pesquisadores japoneses, que posteriormente correlacionaram estes canais com a inibição da resposta ingestiva de salina induzida por privação hídrica de 48 horas (Watanabe et al., 2000; Hiyama et al., 2002 e 2004; Noda, 2006). Nos animais cujo o gene para o canal Nax foi nocauteado, além da excessiva ingestão de cloreto de Sódio sob condições de desidratação, é possível notar também ausência do comportamento de aversão à salina induzido por administração de solução salina hipertônica no terceiro ventrículo; além de hiperatividade neuronal no OVLT e no SFO (através do aumento da imunoreatividade para Fos). Quando o gene para a síntese dos canais Nax é diretamente transfetado para as células do SFO, os animais nocaute recuperam o fenótipo comportamental apresentado pelos animais das linhagens convencionais, reduzindo a ingestão de salina após privação hídrica.

O envolvimento do SFO numa resposta inibitória sobre a ingestão salina não é a única constatação mirífica deste grupo de pesquisa. Perscrutando os mecanismos envolvidos com esta resposta eles demonstraram que os canais Nax na verdade são expressos nos processos perineurais dos astrócitos e de células endoteliais que circundam os capilares do SFO. Sendo que, são estas células que possuem a efetiva capacidade de detectar a elevação da concentração extracelular de Na^+ , e por meio da liberação de lactato ativam neurônios gabaérgicos nas proximidades, promovendo a inibição da ingestão de solução salina. Nestas células o canal Nax está acoplado à Na^+/K^+ -ATPase da membrana celular. Quando ocorre influxo de Na^+ e esta enzima é ativada, a subunidade α -1 desta molécula, que possui atividade catalítica, promove ativação da via anaeróbia de degradação de glicose, levando a formação de lactato que se difunde para o meio extracelular (Watanabe et al., 2000; Hiyama et al., 2002 e 2004; Noda & Hiyama, 2005; Noda, 2006; Shimizu et al., 2006; Watanabe; 2006).

Tremblay e colaboradores (2010) num estudo eletrofisiológico com cortes da parte ventral do MnPO de ratos reportaram a existência de uma extensa população de neurônios capazes de alterar o padrão de deflagração de potenciais de ação em decorrência das alterações na tonicidade do fluido extracelular relacionadas a concentração de sódio. Os neurônios desta área aumentam a frequência de disparos quando a elevação da osmolalidade do meio é acompanhada por aumento na $[\text{Na}^+]$. Em contra partida, se a osmolalidade é aumentada por

adição de uma solução hiperosmótica impermeante que não contém sódio (no caso do trabalho manitol), esta resposta não é observada. Da mesma maneira a redução da concentração de sódio do meio extracelular promove hiperpolarização destas células. Este padrão de resposta e consequentemente a capacidade dos neurônios do MnPO identificarem modificações na $[Na^+]$ do meio extracelular, assim como no SFO, se deve a presença de canais Nax, que neste caso, são expressos peremptoriamente em neurônios (Tremblay et al., 2010).

Neurônios magnocelulares do SON também demonstram estas mesmas propriedades de despolarização em resposta às variações da osmolalidade extracelular devido a presença de canais mecanossensíveis que se abrem ou se fecham em resposta à hiperosmolalidade e hiposmolalidade, respectivamente (Bourque et al., 1994 e 1998). Neste núcleo hipotalâmico também foi caracterizado a participação da glia na modulação da atividade de neurônios que integram o sistema osmorregulatório. Neurônios magnocelulares desta área, em resposta à hipertonicidade, promovem a liberação de AVP e OT, reduzindo assim a osmolalidade plasmática. Em condições de hiposmolalidade a atividade destes neurônios é inibida. Um dos mecanismos inibitórios sobre a liberação destes hormônios/neuromoduladores envolve a ativação dos astrócitos que circundam os neurônios magnocelulares. A hipotonicidade do meio ativa canais iônicos sensíveis a variação de volume (VRAC) nos astrócitos, que em resposta liberam taurina. Este β -aminoácido ativa receptores glicinérgicos no SON aumentando o influxo de Cl^- gerando hiperpolarização neuronal (Hussy et al., 2000; Yuan et al., 2010).

1.4. Inibição da ingestão e Saciedade ao Sódio

O apetite ao sódio e a consequente ingestão compensatória de salina em decorrência da espoliação corporal deste íon, são desencadeados quando neurônios da lâmina terminal são ativados por hiponatremia e estimulação dos receptores AT1. Estes neurônios ativam o drive para a resposta operacional natriorexigênica e bloqueiam os mecanismos serotoninérgicos cerebrais, que tonicamente inibem a expressão deste comportamento. Durante a fase ingestiva, as concentrações extracelulares de sódio se elevam acima do ponto de ajuste fisiológico, então rapidamente desenvolvem-se respostas homeostáticas destinadas a evitar os efeitos perniciosos da hiperosmolalidade. Nestas condições, os ajustes comportamentais, neuroendócrinos e autonômico-viscerais que são efetuados tem por objetivo preservar o conteúdo de água corporal e reduzir a proporção de sódio no LEC (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis, 2007; Geerling & Loewy, 2008).

A inibição da ingestão de sódio é acompanhada da liberação de AVP, ANP e OT no plasma, entre outros ajustes osmorregulatórios. A secreção plasmática destes peptídeos promove reabsorção tubular de água, excreção urinária de sódio, inibição do SRAA e diminuição do tônus simpático renal. Adicionalmente, as respostas comportamentais ligadas a ingestão de sódio são suprimidas e é gerado um estado de saciedade especificamente vinculado ao íon sódio (Blackburn et al., 1995; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis, 2007; Geerling & Loewy, 2008; Vivas et al., 2013).

A integração sensorial entre as estruturas prosencefálicas com atividade natriorexigênica e os vários núcleos que modulam a ingestão de alimentos contendo sal, representa o substrato neurofisiológico capaz de restringir a ingestão e proporcionar o estado de saciedade ao sódio, evitando aquisição excessivamente prejudicial deste elemento. A toxicose por cloreto de sódio ilustra eloquentemente a importância homeostática dos sistemas inibitórios que regulam o apetite seletivo ao sódio. Esta condição ocorre comumente em animais de produção alimentados com subprodutos líquidos da indústria láctea (teor de NaCl entre 2-5%) e submetidos a situações em que o acesso à água é impedido ou inapropriado.

Animais neste contexto desfavorável ingerem grandes quantidade de sódio, desenvolvendo hiperosmolalidade entre 12 e 24h após a oferta destas soluções. Em seguida começam a apresentar distúrbios associados à incapacidade de manutenção da diferença de potencial em células excitáveis, (espasmos tônico-clônicos, rigidez, pressão de cabeça, ataxia, opstótono, convulsões) podendo rapidamente vir a óbito (Pearson & Kallfelz, 1982; Scarratt et al., 1985; Finne et al., 2010; Brum et al., 2013).

Os CVOs e o NTS são as duas principais estações encefálicas empenhadas no monitoramento dos fatores humorais (osmolalidade, concentração de sódio, ANG II, aldosterona), pressóricos (afetência dos barorreceptores arteriais, receptores de volume e receptores de baixa pressão) e prandiais (detecção de sódio pré e pós-absorção em toda extensão do TGI) que afetam a osmorregulação. A estimulação destas áreas (OVLT, SFO, AP e NTS) ativa um complexo e intricado circuito modulatório que inclui o MnPO, o PVN, SON, NPBL, DRN e os sistemas neuroquímicos que alicerçam a integração entre estas estruturas. Principalmente as vias angiotensinérgicas, ANPérgica, vasopressinérgicas, oxitocinérgicas e serotoninérgicas, que garantem que a quantidade de sódio ingerido não exceda o limiar superior de regulação fisiológica para o sódio.

O modelo teórico mais amplamente utilizado para explicar a indução do apetite e a saciedade ao sódio postula que estes estados comportamentais são expressos em função da interação e interpretação de sinais facilitadores e inibidores que chegam às várias estruturas neurais que participam da regulação hidromineral. Existindo uma inibição tônica da preferência por sódio, que é desativada quando a estimulação aferente sinaliza hiponatremia e/ou hipovolemia. Notoriamente, quando a redução do volume do LEC se desenvolve sem déficit de sódio o tônus inibitório é mantido até que o animal se hidrate de forma satisfatória, e em sequência os mecanismos antinatriorexigênicos são desativados permitindo a busca por sódio, necessária para restabelecer a osmolalidade após a ingestão de grandes volumes de água (Menani et al., 1998; Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis, 2007; Menani et al., 2014).

Esta hipótese é amparada por um vasto contingente de evidências experimentais eletrofisiológicas, imunohistoquímicas, farmacológicas e comportamentais que demonstram que a anulação individual de algum dos componentes do circuito que inibe o apetite ao sódio eleva, exacerbadamente, a ingestão basal e/ou induzida de salina em diferentes condições experimentais. O uso de agonistas GABAérgicos e α -2-adrenérgicos, por exemplo, que são drogas que provocam hiperpolarização neuronal, eleva a ingestão de salina em ratos depletados quando são diretamente aplicadas no NPBL (Ohman & Johnson, 1986; Edwards & Johnson, 1991; Edwards et al., 1993; Menani et al., 1998; Puryear et al., 2001; Andrade et al., 2004; Noda & Hiyama, 2005; Watanabe et al.; 2006; Reis, 2007; Colombari et al., 2008; Geerling & Loewy, 2008; Menani et al., 2014).

Neurônios sensitivos no SFO e OVLT, caracteristicamente envolvidos na indução do apetite ao sódio, também coordenam a fase inibitória da ingestão de sódio de duas diferentes maneiras, através de projeções diretas para o SON e PVN estimulando a liberação de OT e ANP, e por meio da interação com o MnPO que emite projeções para neurônios magnocelulares destes dois núcleos e também estimula a neurotransmissão ocitocinérgica e ANPérgica. De fato a infusão de salina hipertônica no OVLT eleva atividade elétrica das células no SON, o que não acontece com a infusão de salina isotônica (Richar & Bourque, 1992) e lesões no OVLT reduzem os níveis de OT liberada no plasma após a infusão de salina hipertônica no átrio direito (Negoro et al., 1988). A proeminente ação antinatriorexigênica central destes dois peptídeos é acompanhada de aumento em suas concentrações plasmáticas, resposta que incrementa a excreção renal de sódio. Sendo bem estabelecido na literatura que a produção neuronal de OT é o fator determinante para a secreção de OT no plasma, e que elevações substanciais de ANP na circulação dependem diretamente da estimulação das

células atriais efetuada pelo ANP produzido por neurônios hipotalâmicos (Antunes-Rodrigues et al., 1986 e 1991; Conrad et al., 1993; McCann et al., 1994, Haanwinkel et al., 1995; Blackburn et al., 1995; Verbalis et al., 1995; Debold et al., 1996; Stricker & Verbalis, 1996; Chriguier et al., 2001). Os próprios neurônios magnocelulares do PVN e do SON respondem à hipertonicidade aumentando a frequência de disparos e a magnitude de liberação de OT e ANP (Bourque et al., 1994 e 1998; Hussy et al., 2000; Yuan et al., 2010).

Outro mecanismo inibitório, inerente ao SFO, é a capacidade desta estrutura detectar concentrações extracelulares elevadas de sódio por meio de canais Nax presentes nos astrócitos perivasculares e nas células ependimárias. Diante de tal condição estas células gliais limitam a ingestão de sódio por meio da ativação interneurônios gabaérgicos no SFO. Similarmente, como descrito no tópico anterior deste concatenado teórico, o MnPO, o SON e o OVLt também possuem mecanismos moleculares intrínsecos que lhes confere capacidade de detectar hiperosmolalidade no meio extracelular e gerar respostas compensatórias que podem limitar a ingestão de sódio (Liedtke et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Hiyama et al., 2002; Liedtke & Friedman, 2003; Noda & Hiyama, 2005; Ciura & Bourque, 2006; Naeini et al., 2006; Shimizu et al., 2006; Bourque, 2008; Tremblay et al., 2010).

Nos modelos experimentais existe uma evidente inter-relação entre a ingestão de sal e a concentração plasmática de OT, que durante a fase apetitiva e de consumo está significativamente reduzida, ao passo que na etapa de saciedade apresenta níveis elevados (Blackburn et al., 1995; Verbalis et al., 1995; Stricker & Verbalis, 1996; Antunes-Rodrigues et al., 2004; Gutkowska et al., 2013). Mas algumas evidências sugerem que o sistema ocitocinérgico responde apenas a hipertonicidade e é destituído de atividade antinatriorexigênica nas situações em que a quantidade total de sódio corporal é repostada por ingestão de soluções isotônicas, participando apenas da inibição do apetite ao sódio em resposta a estímulos que conduzem a hipernatremia, principalmente durante a expansão hipertônica dos fluidos extracelulares. Godino e colaboradores (2007) utilizando o modelo de apetite ao sódio induzido por diálise peritoneal constataram que a reposição isotônica de sódio não promove a ativação de neurônios hipotalâmicos ocitocinérgicos e aumento da liberação de OT na circulação. Diferentemente dos animais que ingerem fluidos hipertônicos. Neste trabalho também é demonstrado que nas duas condições de reposição sódica os neurônios serotoninérgicos do DRN apresentam aumento da imunoreatividade para Fos.

Os sensores circunventriculares de sódio possuem conexões bidirecionais com os centros neurais que executam a inibição tônica e fásica do apetite ao sódio, tendo sua atividade intensamente modulada por estes grupamentos de neurônios, principalmente o NPBL e DRN, bem como alterando a influência inibitória exercida por estas estruturas. Fibras serotoninérgicas a partir do NPBL e do DRN cursam até OVLt, MnPO, PVN e SON, modulando, deste modo a entrada de sódio e água no organismo, e também a excreção renal destes elementos.

Além das conexões bidirecionais com a lâmina terminal e com o hipotálamo antero-medial, o NPBL e DRN também apresentam este tipo de interação axonal entre si. Neurônios da lâmina terminal, notadamente os do SFO sensíveis a ANG II, fazem conexões recíprocas com estes dois núcleos que processam e integram as aferências que conduzem informações a respeito das condições de volume, osmolalidade e natremia corporal (Azimta & Segal, 1978; Lind, 1986; Petrov et al., 1992; Johnson & Thunhorst, 1997; Tanaka et al., 1998, Reis 2007; Menani et al., 2014). O grupo de estudos do professor Junichi Tanaka demonstrou que a administração de ANG II na artéria carótida e diretamente no SFO ativa, nesta área, grupos de neurônios que se projetam para o DRN, e que as microinjeções de ANG II no SFO diminuem a atividade de neurônios serotoninérgicos do DRN, resultando em menor liberação de serotonina no órgão subfornical (Tanaka et al., 1998 e 2003).

A utilização de imunomarcacão dupla para a proteína Fos combinada com fluorogold (um traçador retrógrado de projeções axonais) permitiram a caracterização morfofuncional das respostas neuroniais que transcorrem durante o consumo induzido de soluções salinas. Badauê-Passos e co-autores demonstraram que quando o fluorogold é injetado iontoforéticamente no DRN as células da lâmina terminal que se projetam para o DRN estão ativadas durante a fase de consumo de salina em ratos depletados. Neste trabalho, além de ratificar a interação direta entre o DRN e os sensores circunventriculares durante a fase de reposição de sódio, os autores constataram que outras áreas que se projetam para o DRN também são ativadas durante o consumo de sódio. Incluindo o PVN, NPBL, o *locus ceruleus*, a AP e o NTS.

A presença de células duplamente marcadas nas áreas pontinas citadas neste trabalho apoiam o papel preponderante que o DRN exerce sobre a regulação hidroeletrólítica, integrando os circuitos de entrada de sinais osmorregulatórios periféricos que chegam no rombencéfalo com os estímulos centrais que ativam o prosencéfalo. Utilizando um delineamento experimental similar Godino e colaboradores (2010) após a injeção de fluorogold no NPBL identificaram grupos específicos de neurônios que são ativados durante a modulação do apetite ao sódio induzido por diálise peritoneal e que possuem conexões diretas com esta área. Neste trabalho células com dupla marcação para c-Fos+fluorogold foram visualizadas no complexo da amígdala estendida (especificamente na divisão lateral dos núcleos central e leito da estria terminal), no córtex insular, no DRN, NTS, AP, SFO, OVLT e PVN.

O grupo de pesquisa empenhado na elaboração dos dois trabalhos referidos no parágrafo anterior ainda caracterizou outro importante aspecto envolvendo a atividade inibitória do DRN e do NPBL durante a ingestão de sódio. Após indução do apetite ao sódio por diálise peritoneal animais que ingerem salina hipertônica apresentam a ativação celular (indicada pela expressão de Fos) no DRN, no NPBL, na AP, no NTS, no SON e no PVN, além de elevação da OT plasmática. Em contrapartida, dentre todas estas respostas, apenas a ativação do DRN é observada nos grupos de animais que consomem solução salina isotônica. Em conjunto estes resultados indicam que o DRN modula a ingestão de sódio independentemente da tonicidade da solução consumida, sendo sensível não apenas a estímulos hipertônicos mas também a quantidade total de sódio absorvida (Franchini e Vivas, 1999; Franchini et al., 2002; Godino et al., 2005 e 2007; Vivas et al., 2013).

Como em outros segmentos da neurociência, incluindo a elucidação das estruturas que promovem o apetite ao sódio, a utilização de lesões em grupos de neurônios específicos como instrumento de pesquisa contribui destacadamente na elucubração das respostas homeostáticas que previnem e corrigem a hipernatremia. Lesões no subnúcleo medial do NTS e na AP (estruturas que retransmitem os estímulos gustativos, viscerais e volêmicos para circuito neural de regulação hidroeletrólítica), promovem acentuados distúrbios na respostas inibitórias desencadeadas pelo consumo de sódio. Ratos submetidos a excisão cirúrgica da AP aumentam a ingestão espontânea de solução de Na⁺ 0.5 M, apresentam redução na excreção urinária de sódio e na secreção de AVP e OT em resposta a infusão intravenosa de salina hipertônica. Lesão eletrólítica no NTS comissural aumenta o consumo de salina hipertônica em animais depletados de sódio por meio da administração de furosemida (Contreras & Stetson, 1981; Ogihara et al., 2009; Curtis et al., 1996 e 1999). Da mesma forma, lesões eletrólíticas ou excitotóxicas direcionadas ao DRN, provocam nos animais, aumento do consumo espontâneo e induzido de salina hipertônica, bem como redução da concentração plasmática de ANP e diminuição da excreção renal de sódio (Reis et al., 1990; Olivares et al., 2003; Cavalcante-Lima et al., 2005).

Evidências farmacológicas fornecidas por um vasto conjunto de trabalhos corroboram a noção de um papel regulatório exercido pelos neurônios serotoninérgicos sobre a ingestão

de fluidos. A depleção dos estoques de serotonina neuronal causada pelo tratamento com paraclorofenilalanina (PCPA, i.p. 300 mg/kg/, por 2 dias) aumenta a ingestão de sódio induzida pelo tratamento com furosemida ou isoproterenol (que são protocolos que evocam liberação de ANG II). Quando os animais tratados com PCPA são reavaliados 14 dias após a primeira administração, nestes mesmos paradigmas experimentais, a ingestão de salina é semelhante ao grupo controle, o que sugere o reestabelecimento normal da atividade e/ou síntese de serotonina (Lima et al., 2004). Algumas das primeiras evidências do envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica na inibição do apetite ao sódio foram obtidas por Neill & Cooper (1989), que demonstraram redução da ingestão de salina hipertônica no modelo de privação hídrica em ratos tratados aguda e sistemicamente com fenfluramina (fármaco que promove a liberação de 5-HT), ou fluoxetina (inibidor da receptação de 5-HT) ou agonistas seletivos dos receptores 5-HT_{2C}. Com uma abordagem similar Rouah-Rosilio e colaboradores (1994) também reportaram a influência da liberação de 5-HT e dos receptores 5-HT₂ na saciedade ao sódio, pois o mesmo tratamento com fenfluramina reduz significativamente a ingestão basal e induzida de cloreto de sódio, enquanto tratamento com metergolina (antagonista dos receptores 5-HT₂) aumenta a ingestão basal de salina hipertônica.

Agonistas seletivos para os 5-HT₃ e 5-HT_{2B/C} injetados no terceiro ventrículo provocam redução dose-dependente da ingestão de NaCl em animais tratados com furosemida e submetidos a dieta pobre em sódio. Quando estes receptores são previamente bloqueados de forma seletiva, os efeitos antinatriorexigênicos dos agonistas é revertido (Castro et al., 2003). Cooper e colaboradores (1988) já haviam demonstrado que o tratamento agudo sistêmico com os agonistas seletivos 5-HT_{1A}, gepirona e 8-OH-DPAT, produz preferência dose-dependente por soluções salinas em ratos não-depletados. A infusão de serotonina e de 8-OH-DPAT diretamente no PVN diminui a ingestão de NaCl 1,8% em animais depletados, enquanto o pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptores 5-HT_{1A}, pMPPF, reverte completamente o efeito antinatriorexigênico do 8-OH-DPAT e parcialmente o efeito da 5-HT (Villa et al., 2007). Na rafe mesencefálica os receptores 5-HT_{1A} localizam-se principalmente no soma e dendritos dos neurônios, atuando caracteristicamente como autorreceptores que modulam a atividade dos neurônios serotoninérgicos mesencefálicos, evitando que os estímulos aferentes que chegam ao mesencéfalo provoquem ativação neuronal exacerbada (Sotelo et al., 1990; Albert et al., 1996).

A ativação destes receptores acoplados a proteína Gi promove abertura de canais de K⁺, hiperpolarizando a célula. Dados obtidos no nosso laboratório mostram que a utilização aguda sistêmica ou intra-DRN de 8-OH-DPAT aumenta a ingestão basal e induzida de sódio por estimulação β-adrenérgica, por depleção com furosemida ou protocolo FUROCAP. Enquanto o antagonista 5-HT_{1A}, WAY100135, reduz o consumo de cloreto de sódio nas mesmas condições experimentais. Interessantemente, repetidas aplicações de 8-OH-DPAT no DRN ou tratamento sub-crônico sistêmico com esta droga, resulta em diminuição do consumo de salina hipertônica nestas mesmas condições experimentais, sugerindo uma dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A}, tal como ocorre no mesmo período de com fármacos anti-depressivos (Fonseca et al., 2009).

A manipulação experimental dos receptores para serotonina presentes no NPBL e em núcleos do complexo amigdalóide que participam da geração do apetite ao sódio reitera a importância das projeções serotoninérgicas, principalmente do DRN, no controle tônico e fásico do apetite ao sódio. A administração direta do agonista 5-HT₃ m-clorofenilbiguanida (m-CPBG) no núcleo central da amígdala reduz a ingestão de sódio em animais depletados, sendo que o pré-tratamento com ondasetrona (antagonista 5-HT₃) reverte este efeito. A ondasetrona quando administrada isoladamente não gera nenhuma resposta ingestiva em ratos depletados e ratos normonatrêmicos (Luz et al., 2007). Neste trabalho os autores também reportaram que a ativação ou o bloqueio dos receptores 5-HT_{2C} não interfere nos mecanismos

natriorexigêncicos operados pelo núcleo central da amígdala. Entretanto, o bloqueio dos receptores 5-HT_{2C} no núcleo medial da amígdala desencadeia, em ratos depletados de sódio, aumento do consumo de solução salina hipertônica, enquanto injeção nesta área do agonista seletivo m-CPP para o receptor 5-HT_{2C} é incapaz de reduzir o consumo de sódio em animais que foram depletados (Luz et al., 2006).

O apetite ao sódio induzido pelo protocolo FUROCAP é consideravelmente reduzido em animais tratados com injeções bilaterais no NPBL do agonista 5-HT₂ conhecido como DOI (2,5-dimetoxi-4-iodoamfetamina) (Menani et al., 1996). Embora a administração de antagonistas serotoninérgicos no NPBL não produza aumento da ingestão de sódio em condições basais, quando os receptores de serotonina são bloqueados nesta área e um estímulo natriorexigênico é instituído, a quantidade de salina consumida é incrementada expressivamente. Quando ratos com livre acesso a água e NaCl 0,3 M, são concomitantemente injetados com ANG II icv e metisergida no NPBL (antagonista serotoninérgico), os animais demonstram uma insólita preferência pela solução salina, que em condições de normonatremia é aversiva ao paladar desta espécie (Menani et al., 1996).

O protocolo de infusão intragástrica de NaCl 2 M provoca desidratação intracelular, sede e inibição do apetite ao sódio. Contudo animais injetados com metisergida intra-NPBL apresentam uma ingestão paradoxal de salina neste contexto experimental (De Luca Jr. et al, 2003). Aplicação bilateral de metisergida no NPBL induz consumo de sódio por aplicação icv de doses tipicamente dipsogênicas de ANG II, e ainda eleva o apetite ao sódio induzido por ANG II diretamente aplicada no SFO, por dieta pobre em sódio, por administração de furosemida sub-cutânea, FUROCAP, por privação hídrica e Desoxicorticosterona (Colombari et al., 1996 e 2008; Menani et al., 1998b e 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral: Avaliar o espectro de possíveis alterações hidroeletrólíticas e comportamentais presentes em ratos Wistar adultos, que foram submetidos à exposição pré-natal aguda ao etanol. Sendo o protocolo agudo utilizado, translacionalmente relacionado ao consumo recreativo abusivo em finais de semana (“binge drinking”, CDC-USA), e durante um período correspondente a oitava semana de gestação, pois é fase da gestação em que cerca de 30 % das mulheres não sabem que estão gestantes (WHO, 2013), podendo consumir grandes quantidades de bebidas etílicas.

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Avaliar o efeito do protocolo de alcoolização selecionado sobre o consumo basal e induzido sódio e água.

2.2.2. Avaliar os principais parâmetros renais e hemodinâmicos (excreção renal de sódio, volume urinário, taxa de filtração glomerular, pressão sistólica, hematócrito, sódio e potássio plasmáticos) dos animais expostos ao etanol, antes e após a dieta hipossódica associada ao protocolo natriorexigênico utilizado.

2.2.3. Realizar avaliações comparativas do padrão de ativação neuronal, por meio de imunohistoquímica para proteína Fos, nas principais áreas encefálicas envolvidas com a ingestão e a saciedade ao sódio da prole de ratas alcoolizadas com a prole de ratas controle.

2.2.4. Avaliar os efeitos do tratamento gestacional etílico sobre o desenvolvimento ponderal, sensorio-motor e morfogênico (murinométrico) dos animais expostos.

2.2.5. Submeter a prole de ratas tratadas com etanol à diferentes modelos comportamentais (motricidade, ansiedade, depressão, memória) que possuam preditividade, relativamente aos principais distúrbios comportamentais observados em crianças e adolescentes diagnosticados com DESAF.

3. JUSTIFICATIVAS

Em função do crescente e elevado consumo de bebidas alcoólicas apresentado por mulheres em idade reprodutiva, associado ao padrão característico de diagnóstico tardio de gestação apresentado por aproximadamente um terço das mulheres e do alto número de gestações não planejadas, a integridade de desenvolvimento do sistema neural do concepto é efetivamente colocada em risco iminente na nossa sociedade. Poucos estudos avaliam os efeitos deletérios do uso gestacional agudo do álcool, embora existam dados contundentes e inequívocos.

Algumas evidências de trabalhos recentes demonstram que o consumo materno episódico de álcool é capaz de alterar a funcionalidade do sistema serotoninérgico do animal adulto. Esta informação levanta a possibilidade de muitas alterações comportamentais na prole, entre elas a regulação do apetite ao sódio. Até o momento não existem publicações que demonstrem que o consumo de álcool durante a gestação promova alterações nos mecanismos de regulação hidroeletrólica, e a associação deste tipo de embriotoxicidade ao consumo de sódio. Por isto, se faz necessário a averiguação desta hipótese. A interface entre estes dois grandes problemas da sociedade moderna, o consumo abusivo de álcool e a ingestão elevada de sódio, torna definitivamente a questão do consumo de álcool na gestação ainda mais crítica, e digna de avaliação neste contexto.

Visto que mesmo a ingestão aguda de etanol durante a gestação pode causar sérios déficits comportamentais e neuroendócrinos, são necessárias mais pesquisas associadas a este assunto, para que os segmentos governamentais pertinentes possam executar medidas de saúde pública que preservem a integridade do indivíduo em desenvolvimento; e para que os efeitos do consumo agudo de etanol, sobre o futuro ente, possam ser sistematicamente conhecidos e reavaliados, especialmente pelas proponentes a futuras mães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Apreciação Bioética do Presente Projeto

A conduta e a postura de manuseio dos animais foram sempre executadas seguindo as diretrizes preconizadas pelo Guide for the Use of Laboratory Animals of NIH (USA-NIH, publication nº 85-23). Todas as manipulações experimentais envolvendo animais foram realizadas sob a orientação e supervisão do professor Drº Luís Carlos Reis e executadas, por questões logísticas peculiares ao projeto, no laboratório de Farmacologia e Fisiologia da Reprodução do Instituto de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás, parceiro deste projeto. Sendo que as metodologias utilizadas estão inseridas em um projeto de pesquisa aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal daquela instituição denominado: Avaliação do desenvolvimento sensorial, motor, reprodutivo e comportamental de ratos expostos ao tratamento agudo com etanol durante o período de neurogênese embrionária (projeto ICB-UFG nº 36/2010).

4.2 Animais Utilizados

Para a realização dos cruzamentos destinados a obtenção das ninhadas, dos grupos controle e etanol utilizadas nos ensaios experimentais, ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Para este objetivo machos com idade entre 90-120 dias e peso variando de 300 a 400g foram selecionados. A idade selecionada para as fêmeas foi de 80-110 dias, e o peso de 180-230g. Após sete dias de aclimação no biotério laboratorial (livre acesso a água e a alimento, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiental de $22 \pm 0,5$ °C) os cruzamentos foram realizados utilizando-se o modelo de harém, onde ao final da tarde um macho era engaiolado com duas fêmeas em pro-estro. A presença de secreções vaginais contendo espermatozoides na manhã seguinte foi utilizada para caracterizar e confirmar a fecundação (E₀). As fêmeas prenhes logo então foram alojadas individualmente em gaiolas com livre acesso a água e alimento, não sendo manipuladas até E₁₄ quando receberam os devidos tratamentos (etanol ou salina). Ao todo foram utilizadas 45 fêmeas utilizadas nos cruzamentos destinados à produção das ninhadas dos diferentes grupos experimentais e vinte machos. Após o período de lactação as matrizes eram anestesiadas com isoflurano e decaptadas. Os machos utilizados nos cruzamentos eram destinados para a utilização por outros pesquisadores em protocolos que não fossem influenciados pela exposição ao coito prévio.

Para a realização de todos os protocolos comportamentais, mensurações bioquímicas e coletas de material histológico os animais utilizados foram machos adultos (90-150 dias de vida e peso entre 300-350g) provenientes das ninhadas dos grupos controle ou etanol. Os grupos experimentais (controle e etanol) sempre foram estabelecidos com no mínimo 10 animais, sempre provenientes de no mínimo seis ninhadas diferentes. Excetuando-se as avaliações ponderais e sensorio-motoras em que os animais foram testados a partir do nascimento até os sessenta dias de vida.

4.3 Protocolo de Alcoolização

Em E₁₄, período em que se inicia a formação dos primeiros neurônios serotoninérgicos em ratos (Lauder & Bloom, 1974), As ratas grávidas receberam injeções intraperitoneais de solução de etanol a 3 g/kg (20% p/v em solução salina), por três vezes, com intervalos de 8 horas entre cada administração. Na mesma data grupos de no mínimo sete fêmeas grávidas receberam injeções intraperitoneais de solução salina a 0,9% em volume, horários e

quantidades semelhantes ao grupo etanol. Imediatamente antes do segundo tratamento era administrado solução de glicose a 20% via oral em ambos os grupos (1 mL/100g), com intuito de previr hipoglicemia gerada pelo aumento de NADH⁺ resultante da metabolização do etanol.

O intervalo de oito horas entre as aplicações foi utilizado baseado na razão de eliminação do etanol após administração intravenosa em ratas com 12 semanas de idade, que é de aproximadamente 400mg/kg/h (Kim et al., 2003). Em mulheres o intervalo correspondente entre as três exposições ao etanol seria de 20 a 24 horas, em função da razão de eliminação do etanol que é 125-140 mg/kg/h (Mumenthaler et al., 1999). O conteúdo de álcool em cada tratamento é equivalente ao consumo por uma mulher de 55 kg de peso à dois copos de uísque ou vodka (40 % de álcool), quatro copos de vinho fortificado (20 % de álcool) ou oito latas de cerveja comum (4,5 % de álcool).

Após o tratamento, o nascimento das ninhadas era acompanhado atentando-se para alterações na data prevista para o parto, para que desvios no período gestacional não fossem incluídos na dinâmica de desenvolvimento. Ao nascimento, o número máximo de filhotes amamentados por fêmea foi preconizado em nove filhotes, retirando-se os excedentes e ainda utilizando-se somente as ninhadas com no mínimo sete filhotes. A integridade dos cuidados maternos também foi monitorada. Aos 22 dias de vida os filhotes eram desmamados e mantidos em caixas separadas de acordo com sexo e grupo experimental. Estes animais foram marcados com furo na orelha de acordo com o grupos experimental e mantidos com acesso livre a água e a alimento, com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiental de 22 ± 0,5 °C até atingirem a idade de 90 dias e/ou peso médio de 280 gr.

Para cada experimento realizado sempre adotou-se o critério de incluir animais provenientes de no mínimo seis ninhadas diferentes em cada grupo e nunca se utilizar de um mesmo animal para mais de um ensaio. Adicionalmente, o máximo de dados possíveis foi extraído de cada experimento objetivando-se otimizar os cruzamentos e as análises experimentais.

4.4 Avaliação da Ingestão Basal de Água e NaCl 0,3 M

Machos adultos dos grupos controle e etanol (idade 90-120 dias, peso 300-360 g) foram previamente adaptados por cinco dias em gaiolas metabólicas dotadas de bebedouros volumétricos. Após este período os animais tinham acesso à dois bebedouros que continham água ou solução salina 0,3 M (salina 1,8%). O consumo das duas soluções foi avaliado por cinco dias.

4.5 Protocolo FUROCAP Modificado

A avaliação da ingestão de água e solução de NaCl 0,3 M (normalmente aversiva ao paladar de ratos) foi realizada em gaiolas metabólicas contendo bebedouros volumétricos mediante estimulação experimental dipsogênica e natriorexigênica. Após cinco dias de adaptação às gaiolas metabólicas, o apetite ao sódio foi induzido utilizando-se uma variação do método FUROCAP modificado (Mecawi et al., dados em preparação), em que após curto período de dieta pobre em sódio (quatro dias) segue-se a aplicação do protocolo FUROCAP. Durante quatro dias os animais foram tratados com dieta pobre em sódio derivada de fubá de milho. No quinto dia após o início da alimentação hipossódica os diferentes grupos experimentais foram administrados com uma associação de furosemida (10 mg/kg, s.c.) + captopril (5 mg/kg, s.c.) e mantidos, em seguida, sem acesso à água e alimento por 60 minutos. Depois de transcorrido este período de tempo, bebedouros volumétricos contendo água destilada e NaCl 0,3 M foram simultaneamente inseridos nas gaiolas para que os animais

tivessem acesso aos dois fluidos. A medida da ingestão de líquidos foi realizada a cada 60 minutos até o período de 300 minutos a partir da oferta dos bebedouros e após 24 horas do início da apresentação dos líquidos.

Durante os quatro dias de dieta hipossódica foram aferidos o volume urinário e a concentração de sódio na urina gerados em 24 horas. No dia da estimulação farmacológica estes dois parâmetros foram avaliados após 60 min e 300 min da administração das drogas. O volume urinário e o consumo de água e solução salina foram expressos em mL/100g de peso corporal, e o consumo proporcional de sódio foi calculado pelo volume de salina ingerido dividido pelo volume total ingerido [salina / (água + salina)].

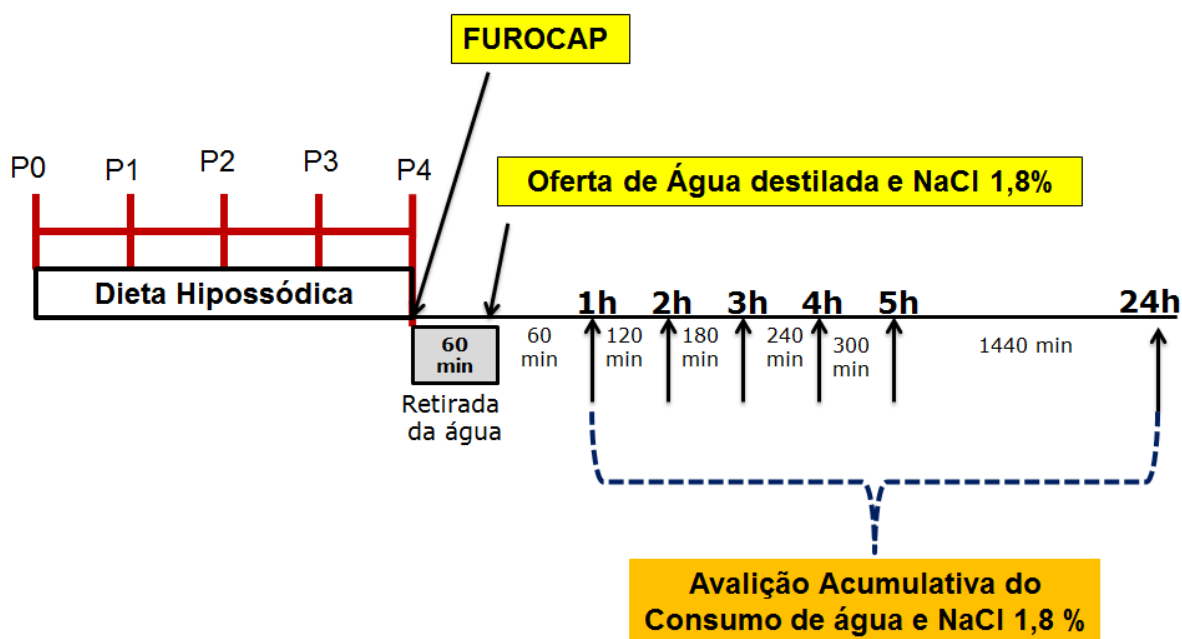


Figura 1. Esquema representativo do protocolo FUROCAP modificado utilizado nos experimentos para avaliação do apetite ao sódio dos grupos experimentais.

4.6 Parâmetros Renais e Hemodinâmicos Avaliados no Período de Dieta Hipossódica

Visto que as aferências periféricas que conduzem ao sistema neural central informações sobre tônus vascular e volume de líquido possuem importante papel na geração do apetite ao sódio, também perscrutamos alguns parâmetros hemodinâmicos tais como a pressão sistólica (avaliada por pletismografia de cauda 24 horas antes do início e ao final do período de dieta hipossódica), o hematócrito, os níveis séricos de sódio após quatro dias de dieta hipossódica e a concentração urinária deste íon durante todo o protocolo. O conteúdo de sódio plasmático e urinário foi quantificado por meio de fotometria de chama a partir de uma alíquota de 1 mL de urina ou de plasma, que posteriormente foram diluídos em água destilada (1:1000) e levados ao fotômetro de chama. Também foi avaliada a taxa de filtração glomerular após o período de ingestão de alimento pobre em sódio. Foram utilizados dez animais controle e dez animais etanol exclusivamente para a aquisição de todos os parâmetros hemodinâmicos. O sangue foi coletado na veia caudal lateral (1,5 mL) após a realização dos procedimentos para aferição da pressão sistólica.

A creatinina no plasma e na urina, utilizada para determinar a taxa de filtração glomerular, foi mensurada colorimetricamente, de acordo com o método de Jaffe modificado,

utilizando kit comercial CREATININA K016 - Bioclin®. No princípio da técnica colorimétrica de Ponto Final, a creatinina plasmática reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado creatinina-picrato, e, também com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devido à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromógenos. Por diferença entre as leituras obtidas no pH ácido, obtém-se o valor real da creatinina plasmática. A creatinina urinária foi obtida através da mesma técnica, porém, omitindo a segunda etapa (acidificação). As absorbâncias são medidas em espectrofotômetro (510 nm). O “clearance” de creatinina foi usado para medir o Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), através da seguinte fórmula: $RFG \text{ (mL/min)} = ([\text{Creatinina}] \text{ urina} \times \text{Fluxo urinário}) / [\text{Creatinina}] \text{ plasma}$.

A pletismografia de cauda foi realizada 24 h antes do início e ao final do período de dieta hipossódica. Para a realização deste procedimento os ratos foram contidos em um tubo cilíndrico de acrílico, então a cauda dos animais foi ajustada a um manguito de borracha adaptado na região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais gerados pelo fluxo arterial, que então eram enviados e registrados em computador. O experimento só teve início após um período de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca. No registro da pressão sanguínea por pletismografia de cauda ocorrem perdas intermitentes dos sinais de pulso, seguidas do retorno destes. Diante disto, o valor de pressão arterial sistólica considerada foi padronizado como o primeiro sinal de pulso de retorno. Para a análise da frequência cardíaca foram selecionados intervalos de dez segundos entre os ciclos de insuflação. A pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca foram consideradas como a média de no mínimo 7 medidas por animal. O sinal era captado e conectado a um amplificador de sinais (RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats and Mice, Kent Scientific Corporation) e conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). No sistema utilizado a comunicação de dados entre o PowerLab e o computador se dá através de um cabo conectado a uma placa SCSI onde o software Chart for Windows® gerava os registros de pulso, pressão da bomba e frequência cardíaca a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais e conversor analógico digital.

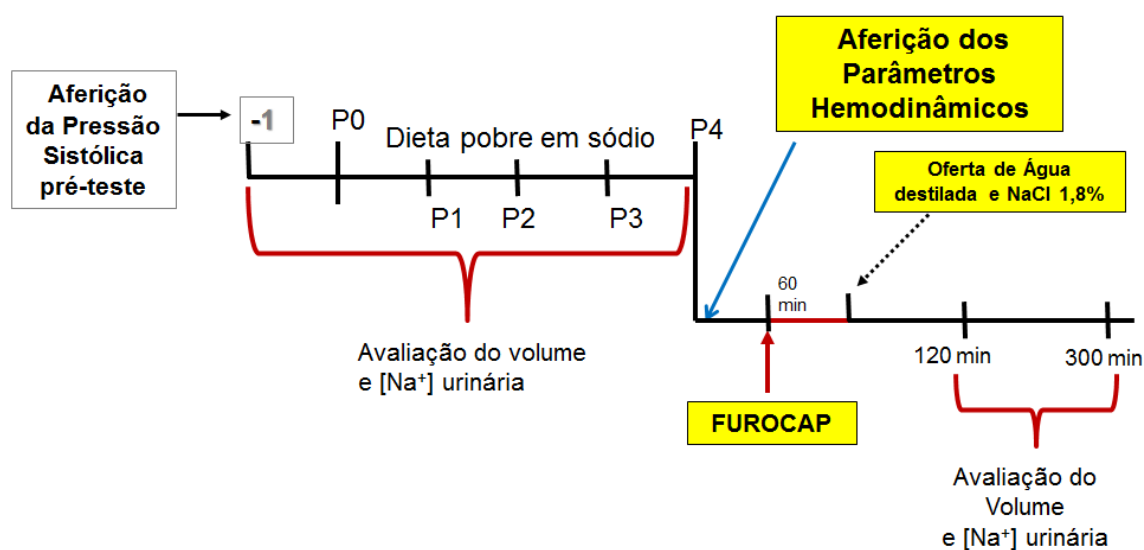


Figura 2. Esquema representativo da sequência temporal e dos pontos de aferição dos parâmetros renais e hemodinâmicos mensurados no transcurso do protocolo FUROCAP modificado.

4.7 Avaliação da ativação neurônial frente ao protocolo FUROCAP modificado

O padrão de ativação do SFO, OVLT, MnPO, SON, PVN e DRN de animais tratados com álcool no décimo quarto dia de gestação foi caracterizado através do protocolo de imunistoquímica para marcação da proteínas Fos (marcadora de ativação neuronal) e da dupla marcação com OT no hipotálamo ou com Triptofano Hidroxilase no DRN. Para tanto foi delineado um protocolo de perfusão para obter os seguintes grupos:

- 1-Controle + Dieta hipossódica + Furocap + Oferta de água e NaCl 0,3M (Controle estimulado)
- 2-Controle+Dieta hipossódica + Furocap + Sem oferta de água e NaCl 0,3M (Controle privado)
- 3-Controle + Dieta normossódica + Sem Furocap + Oferta de água (Controle basal)
- 4-Etanol + Dieta hipossódica + Furocap + Oferta de água e NaCl 0,3M (Etanol estimulado)
- 5- Etanol + Dieta hipossódica + Furocap + Sem oferta de água e NaCl 0,3M (Etanol privado)
- 6- Etanol + Dieta normossódica + Sem Furocap + Oferta de água (Etanol basal)

Decorridos 300 min. após a reapresentação dos fluidos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg), e após a confirmação do plano anestésico profundo a caixa torácica foi aberta e a aorta abdominal amarrada com fio de algodão. Em seguida realizou-se a perfusão intracardíaca com a infusão de 200 mL de solução fisiológica heparinizada (50 UI/mL) a 4°C e 400 mL de solução paraformaldeído 4% em tampão fosfato, também a 4°C. Após a retirada, os encéfalos passaram por um processo de pós-fixação em paraformaldeído 4% durante 4 horas e, logo em seguida, armazenado em solução de sacarose (30%) a 4 °C até o momento da confecção dos cortes.

Os cortes do material foram realizados em criostato Microm (modelo HM 5000M) em secções de 30 µm que foram armazenadas em solução anticongelante de propilenoglicol e acondicionadas em freezer (-20 C°) até a realização dos protocolos. Após o processo de lavagem dos cortes foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução H₂O₂ (0,3 %) e também o bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se albumina sérica bovina a 5%. Posteriormente, para visualização da expressão da proteína Fos os cortes foram incubados em temperatura ambiente, por 12-14 horas, com o anticorpo primário para a proteína Fos (Ab-5, rabbit, 1:10000, Oncogene, EUA) e a seguir, incubados com o anticorpo secundário biotinalado (anti-rabbit, 1:200, Vector Laboratories, EUA), por um período de 1 hora. A coloração foi evidenciada por ligação de anticorpo secundário associado ao complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, PK 6100, Vector Laboratories, EUA), e empregando-se diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, EUA), cloreto de cobalto 0,5% e sulfato de níquel 1% como cromógenos, cuja reação confere ao núcleo das células neuronais uma coloração de violeta escuro a preto.

No protocolo de dupla marcação do fenótipo celular com a expressão da proteína Fos, o protocolo básico de imunistoquímica descrito acima foi seguido. No segundo dia, após o término do protocolo descrito, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-OT (rabbit, 1:20000, Península, EUA) ou anti-Triptofano hidroxilase (mouse, 1:1000; Chemicon International, EUA) durante 48 horas a 4 °C e, em seguida, com anticorpo secundário biotinalado (anti-rabbit ou anti-mouse, 1:200, Vector Laboratories, EUA). Após esse período, os cortes foram incubados por mais uma hora com a solução ABC (PK 4000, Vector Laboratories, EUA) e, logo em seguida, a revelação foi realizada apenas com DAB o que conferiu a coloração caramelo a marrom às células imunorreativas aos antígenos citoplasmáticos em questão. Os cortes foram montados em lâminas histológicas gelatinizadas (1,5% gelatina/álcool 80%, Sigma-Albrecht, EUA) e após um período de 12 horas de secagem

à temperatura ambiente, as lamínulas foram fixadas com Entellan (Merck Chemicals, Alemanha).

A contagem dos neurônios imuno-marcados foi realizada bilateralmente para todas as áreas em análise e inicialmente sem a identificação do grupo experimental, e com padronização de parâmetros individuais de coloração e delimitação dos núcleos em cada corte. Após a contagem de células marcadas utilizando-se o Software IMAGE-J, foi calculada a média de neurônios marcados por seção e por animal. Para a mensuração dos neurônios imunorreativos à proteína Fos foram considerados aqueles que apresentaram núcleo visivelmente corado (violeta-escuro a preto). Enquanto que neurônios com citoplasmas imunorreativos para OT ou Triptofano hidroxilase foram identificados a partir da presença evidente de corpo celular neuronal (em coloração marrom-claro), e quando localizados na mesma célula com expressão de Fos, apresentavam ainda o núcleo escuro.

4.8 Avaliação do Desenvolvimento Ontogênico, Ponderal e Sensório-Motor

O desenvolvimento ponderal e sensório motor de 10 ninhadas controle e etanol foi acompanhado para caracterizar possíveis alterações provocados pelo tratamento com álcool. As ninhadas foram pesadas desde o primeiro dia para o acompanhamento da evolução do peso dos filhotes, a cada sete dias. A primeira e a segunda aferição do peso das ninhadas foi realizada conjuntamente. A partir do 14º dia ao 90º dia pós-natal os filhotes eram pesados individualmente. Todos os animais receberam marcação individual através da aplicação subcutânea de nanquim.

No 22º dia de vida pós-natal os filhotes foram desmamados e alocados em caixas de acordo com cada grupo experimental, até o término da avaliação sensório-motora e ponderal, e submetidos a eutanásia ao completar 90 dias de vida. As avaliações do desenvolvimento sensorial foram realizadas por meio de observações diretas, sendo anotado o dia em que apareceram os principais parâmetros de desenvolvimento morfológico, como o desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura de olhos, descida dos testículos e a abertura do canal vaginal. Para avaliar o desenvolvimento sensório-motor foram avaliados os reflexos de preensão palmar, de geotaxia negativa, de esquiva ao abismo, de queda livre, de sobressalto auditivo, de localização pelas vibrissas e do equilíbrio em borda, seguindo o método modificado de Smart & Dobbing de 1971 e de Fox 1965 (Alder & Zbinden, 1977; Alberts, 1984; Gerrish & Alberts, 1995; Maurissen et al., 2003; Kreider & Blumberg, 2005; Whishaw & Kolb, 2005).

A sequência cronológica de maturação dos principais caracteres morfológicos que se desenrolam na fase pós-natal incipiente dos roedores fornece informações consistentes sobre a integridade do desenvolvimento embrionário, e esta sequência é que é afetada por diversas injúrias e substâncias teratogênicas (De Smart & Dobbing de 1971; Alberts, 1984; Gerrish & Alberts, 1995; Maurissen et al., 2003). Normalmente as orelhas estão dobradas sobre o orifício auricular ao nascimento, o pavilhão auricular desfaz a dobra entre o 2º e o 5º dia de vida pós-natal. A ocorrência do desdobramento auricular foi considerada no dia em que a dobra, uma vez desfeita, tornava-se livre e podia ser palpada pelo pesquisador. Dentre estas características de desenvolvimento, chamadas de parâmetros murinométricos (Fox, 1965; Smart & Dobbing, 1971) a erupção dos dentes incisivos que surge por volta do 10º dia ao 15º dia de vida pós-natal, foi avaliada a partir do 6º dia de vida abrindo-se delicadamente a boca do animal, afastando-se os lábios e expondo deste modo a gengiva.

Considerou-se o rompimento da gengiva com exposição dos incisivos. A abertura dos olhos foi considerada a partir do dia no qual o animal apresentou uma fissura longitudinal nas pálpebras dos dois globos oculares, que caracteristicamente surge por volta do 12º ao 15º dia de vida pós-natal. A observação deste parâmetro foi iniciada no 10º dia de vida. A descida dos

testículos considerada a partir do momento em que os dois testículos puderam ser apalpados na bolsa escrotal. Esta observação foi feita a partir do 15º dia pós-natal. A observação da abertura do canal vaginal foi realizada a partir do 30º dia de vida até ser constatada a presença do orifício na região genital das fêmeas.

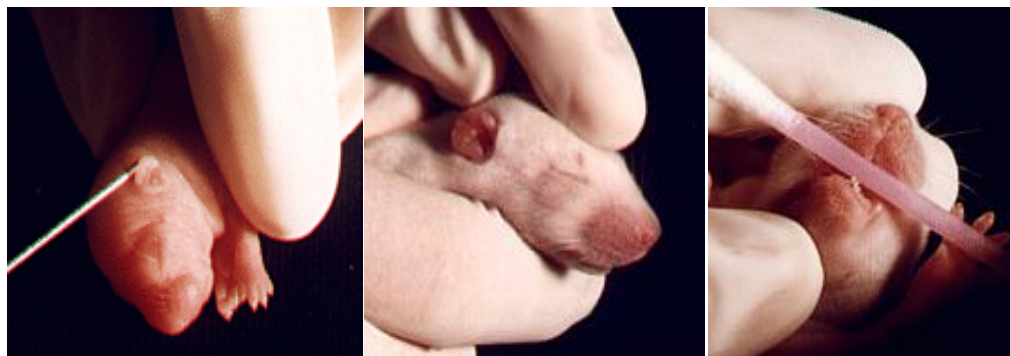


Figura 3. Fotografias representando o estágio de abertura do pavilhão auditivo, aparecimento da fissura longitudinal nos olhos e irrupção dos incisivos, respectivamente (Fonte: Autor)

Em roedores o desenvolvimento ontogênico padronizado de vários comportamentos e reflexos sensório-motores, durante o início do período pós-natal, permite a execução de protocolos capazes de mensurar déficits de motricidade e sensoriais provocados por insultos durante o desenvolvimento pré-natal (Fox, 1965; Alder, 1983; Kreider & Blumberg, 2005; Whishaw & Kolb, 2005). Pautado neste contexto, cada animal dos diferentes grupos foi submetido à avaliação reflexológica a partir do 1º dia pós-natal, sempre iniciando às 11 horas da manhã, o desenvolvimento dos seguintes reflexos foi acompanhado: preensão palmar, reflexo postural, geotaxia negativa, esquiva ao abismo, reflexo postural em queda livre, reflexo de sobressalto auditivo, equilíbrio em borda e teste de localização pelas vibrissas. Para cada um destes reflexos, o dia da consolidação foi considerado o primeiro dia da sequência de três dias consecutivos do aparecimento completo da resposta reflexa esperada. A avaliação do desenvolvimento sensório-motor foi realizada até que todos os filhotes de cada ninhada apresentassem os reflexos. Nos casos negativos, os testes foram repetidos nos dias subsequentes até a ocorrência do reflexo observado. A duração de cada observação foi de 15 segundos para cada filhote, exceto para o teste de equilíbrio de borda, no qual o animal teve 60 segundos para completá-lo. Nos primeiros 14 dias de experimento, os filhotes foram mantidos aquecidos durante os testes para evitar hipotermia, pois nessa fase os filhotes têm dificuldade de manter a temperatura corporal.

Para a observação da preensão palmar o animal foi colocado em uma das mãos do pesquisador e suas patas dianteiras apoiadas em um bastonete de metal de aproximadamente 5 cm de comprimento por 2 mm de diâmetro, observando-se o dia no qual desapareceu a esta resposta de agarrar o objeto, que é inata e desaparece com a maturação das vias motoras. A avaliação do reflexo postural foi realizada colocando-se o animal em decúbito dorsal, sobre uma superfície lisa, verificando-se a ocorrência ou não da resposta de girar o corpo para a posição de decúbito ventral, com as 4 patas apoiadas na superfície. O reflexo de geotaxia negativa é avaliado posicionando-se o animal em um plano inclinado de 30º com a cabeça voltada para baixo, a ocorrência ou abstenção da resposta motora em que o filhote retorna à posição diametralmente oposta com a cabeça voltada para cima é o parâmetro aferido.

O reflexo de esquiva ao abismo foi realizado com animal posicionado com as patas dianteiras tocando a borda de uma mesa, verificando-se a ocorrência ou não de resposta reflexa de afastamento da borda do abismo. A capacidade do filhote virar-se durante a queda

para cair em decúbito ventral na superfície é avaliada no teste de reflexo postural em queda livre. Para tanto, cada filhote foi solto a partir de uma altura de 35 cm em decúbito dorsal sobre uma superfície macia, e a resposta reflexa pode ser observada. No teste que avalia o reflexo de sobressalto auditivo os filhotes eram colocados próximos a um objeto capaz de emitir estalos altos e observa-se o reflexo ou não de sobressalto de cada indivíduo ao estalo emitido. Para a realização do teste de localização pelas vibrissas colocou-se cada filhote em suspensão pela cauda de forma que suas vibrissas tocassem a borda da mesa. Assim era verificada a resposta, ou não, de reposicionamento corporal em direção a mesa. Para o teste de equilíbrio em borda o animal foi colocado sobre a borda de um béquer de 2 L localizado de frente para uma plataforma, era observado então o dia em que o animal atingiu a plataforma, e a latência em segundos para fazê-lo era aferida.

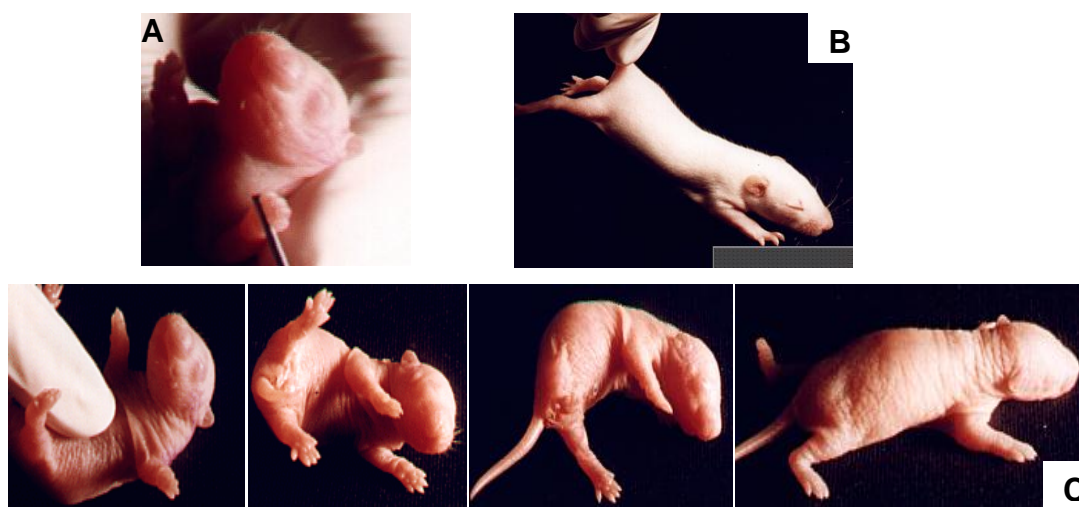


Figura 4. Procedimento para avaliação dos reflexos de (A) preensão palmar, (B) localização pelas vibrissas e reflexo de reposicionamento corporal (C). (Fonte: Autor).

4.9 Teste da Preferência por Sacarose

Para avaliar o componente hedônico dos animais expostos ao tratamento gestacional agudo com etanol foi utilizado o teste de preferência pela sacarose. Este modelo descrito inicialmente por Willner e colaboradores (1987) caracteriza-se pela redução do consumo espontâneo de solução de sacarose em animais com hipofunção dos componentes motivacionais encefálicos. Os animais dos grupos controle e etanol, acondicionados em caixas de polietileno (16 x 45 x 30 cm) contendo três indivíduos com peso e idade aproximadamente iguais, foram inicialmente habituados com a presença de duas garrafas de água com mesmo tamanho, mesmo padrão estético e tipo de bico por 3 dias. Após a habituação foi oferecido aos ratos a escolha entre uma garrafa com água ou uma garrafa com solução à 0,8% de sacarose por 24 horas. O peso das garrafas de água pura e solução de sacarose foi mensurado antes de serem ofertadas aos grupos experimentais e após um período de 24 horas. O consumo, tanto de água como de sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final dos recipientes (Willner et al., 1987 e 1991; Bolaños et al., 2003). A preferência foi determinada por caixa (n = 8 caixas por grupo) em valores percentuais, obtida pela razão entre o consumo de sacarose e o consumo total de líquidos multiplicando por 100 (Preferência = $\text{Consumo de Sacarose} / [\text{Consumo de Sacarose} + \text{Consumo de Água}] \times 100$).

4.10 Teste do Campo-Aberto

Foram realizados testes comportamentais e de motricidade nos animais adultos com o objetivo de averiguar a existência de possíveis alterações comportamentais e/ou incoordenação motora, que pudessem afetar inespecificamente o comportamento natriorexigênico. O teste do campo-aberto constitui-se num excelente instrumento metodológico capaz de pontuar indícios de alterações comportamentais como medo e comportamento correlacionado a ansiedade e/ou de motricidade ocasionados por uma miríade de condições experimentais farmacológicas, etológicas, toxicológicas, ontogênicas, genéticas (Xavier, 1999; Prut & Belzung, 2003). Este teste foi utilizado para avaliar o comportamento exploratório e a movimentação espontânea dos animais adultos que receberam o tratamento com álcool durante a gestão, e foi realizado seguindo o modelo proposto inicialmente por Arche em 1973. Os animais dos diferentes grupos foram submetidos individualmente à análise de sua capacidade locomotora/exploratória e avaliados através de diferentes parâmetros.

O ensaio experimental foi realizado em uma sala escura com luz vermelha, sem a presença do experimentador, onde os ratos foram individualmente inseridos em uma caixa circular de madeira branca (100 cm de diâmetro x 40 cm de altura). A área da caixa é formada por três círculos concêntricos com 12 raios entre o círculo mais externo e o mediano, e seis raios entre o círculo mediano e o central. Cada animal foi colocado no centro da arena experimental, permanecendo explorando o ambiente por 5 minutos. Durante este tempo, a atividade locomotora foi gravada e os principais elementos da atividade exploratória foram pontuados pela observação e contados *a posteriori*. Os parâmetros comportamentais mensurados foram: (1) número total de quadrantes percorridos ou atravessados, (2) quadrantes percorridos no centro na arena, (3) número de levantadas ou *Rearing*, (4) números de comportamento de auto-limpeza ou *Grooming*, (5) tempo de imobilidade e (6) número de bolos fecais. Também foram utilizados como controle positivo do experimento, animais não manipulados na gestação tratados com Diazepam (1,5 mg/kg, i.p) ou Pentilenotetrazol (30 mg/kg, i.p), 60 minutos antes do teste.

4.11 Teste da Barra-Giratória (Rota-Rod)

A coordenação motora dos animais adultos dos grupos controle e etanol foi avaliada através do teste do rota-rod. O Rotarod, introduzido por Dunham e Miya (1957), é um dos testes mais utilizados para avaliar a função motora de roedores por ser considerado um dos mais sensíveis para isto. Neste experimento, foi empregado um aparelho automatizado (Insight®, EFF-411), instalado em uma sala fechada e mantida à temperatura de aproximadamente 25°C. O aparelho consiste em uma caixa de acrílico com uma barra giratória de 10 cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 30 cm do chão, e mantido em rotação através de um motor, que pode trabalhar com velocidade constante ou com aceleração crescente. A barra é dividida em quatro compartimentos com 12 cm de largura cada, porém apenas um animal foi avaliado por vez. Cada animal foi posicionado na barra e durante cinco minutos de teste mensurou-se o tempo para a primeira queda e o número de quedas em cinco minutos cronometrados sobre a barra-giratória. A velocidade de rotação estabelecida foi de 10 rpm/min. Um grupo de animais tratados com diazepam (4 mg/kg i.p., trinta minutos antes do teste) foi utilizado como controle positivo do teste.

4.12 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um método validado para explorar as bases neurobiológicas da ansiedade (Torres & Escarabajal, 2002). O labirinto em cruz elevado usado para testes com ratos é um aparelho elevado à 50 cm do chão que consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central de 10 x 10 cm. Os animais não submetidos a nenhum tratamento, demonstram neste modelo preferência intrínseca pelos braços fechados, permanecendo um percentual maior neste segmento na ausência de alteração da atividade locomotora. Embora os animais apresentem predileção de estado pelos braços fechados, uma tendência inata à exploração de ambientes novos impele o animal a explorar também os seguimentos abertos, e procedimentos e tratamentos que promovem redução da ansiedade está interligado ao aumento da exploração dos braços abertos fechados (Handley, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986; Ho et al., 2002).



Figura 5. Fotografia representando o modelo do Aparelho de Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos testes.

Os experimentos foram conduzidos sem a presença do experimentador em sala escura com luz vermelha e temperatura regulada em 25°C. Os animais eram colocados na plataforma central voltados para um dos braços fechados e observados durante cinco minutos, sendo avaliados o percentual de tempo nos braços abertos e nos braços fechados. Dois grupos de controles positivos foram utilizados neste ensaio, formados por ratos sem qualquer manipulação na fase gestacional, que foram tratados com pentilenotetrazol (30 mg/kg i.p., n = 10) ou diazepam (1,5 mg/kg i.p., n = 10) 30 minutos antes de cada animal ser colocado no aparelho.

4.13 Teste do Nado Forçado

Com o intuito de avaliar possíveis efeitos do tratamento gestacional com álcool sobre os sistemas motivacionais da prole na fase adulta, submetemos grupos de animais controle

(n=10) e etanol (n=12) ao teste do nado forçado, que foi executado de acordo com a metodologia proposta por Porsolt e colaboradores (1978). Este é um dos modelos mais utilizados na triagem pré-clínica de drogas antidepressivas, que possui elevada confiabilidade no resultado e se baseia na observação de que ratos colocados num cilindro com água, após tentativas iniciais de fuga, rapidamente mostram imobilidade numa exposição subsequente. O comportamento de imobilidade é interpretado como prejuízo do comportamento esperado de fuga ou como desenvolvimento de comportamento passivo capaz de reduzir o padrão comportamental ativo de enfrentamento em situações estressoras. O tratamento com fármacos antidepressivos entre as duas exposições, resulta em comportamento mais ativo, fazendo com que o animal persista na tentativa de escapar por tempo um período mais prolongado, quando comparado à animais controle.

Animais controle e etanol foram submetidos à uma sessão pré-teste, com duração de 15 minutos. Após 24 horas, os animais foram submetidos à sessão teste, com duração de 5 minutos. Nas duas sessões, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de PVC (20 cm x 40 cm), contendo água limpa à 24 ± 1 C°, e profundidade de 50 cm. Ao término das sessões, os animais foram retirados do cilindro, secos com o auxílio de uma flanela e deixados por 15 minutos sob uma lâmpada (60W). Em seguida, foram colocados novamente em suas caixas-moradia. A água foi trocada e o cilindro limpo com álcool 10% antes de cada animal ser submetido às sessões. As sessões de pré-teste e teste foram gravadas por uma câmera localizada na sala experimental e conectada à um sistema de monitor e gravador de DVD localizados na sala adjacente, possibilitando a análise posterior dos comportamentos realizados pelos animais.

4.14 Teste da esQUIVA inibitória (Step-down)

Avaliamos os efeitos da alcolização intra-uterina sobre a aquisição e consolidação da memória, utilizando para isto o teste de esQUIVA passiva ou esQUIVA inibitória. Neste modelo o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição ao aparelho de teste, o animal suprime o comportamento inato de explorar o ambiente e evita descer da plataforma (Blanchard & Blanchard, 1970; Gold, 1986). O aprendizado é caracterizado pelo aumento na latência para que o animal abandone a plataforma e comece a explorar a caixa. A aquisição da memória neste modelo envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade á dor, além da interação destas informações sensoriais com o componente emocional, que é intensamente modulado por hormônios e neurotransmissores relacionados ao estresse (Gold, 1986; Izquierdo, 1986; Izquierdo & Medina, 1997).

O aparelho de teste consiste em uma caixa de metal e acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (EP-104 INSIGHT). Parte do piso do aparelho possui grades com barras de bronze medindo 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas, e de uma plataforma metálica compacta elevada cerca a 5 cm e que possui 8 cm de largura e 25 cm de comprimento. Para avaliação da aquisição da memória os animais dos diferentes grupos foram colocados sobre a plataforma e cronometrado o tempo para descer, e imediatamente após o animal descer sobre a grade com as quatro patas, um leve choque de 0.3 mA foi aplicado nas patas (sessão treino). Vinte e quatro horas após o estímulo elétrico, cada animal foi recolocado sobre a plataforma e a latência para descer sobre a grade foi cronometrada. Sendo que o tempo máximo de permanência é limitado em cinco minutos.

Para avaliarmos a retenção e a evocação da memória grupos diferentes de animais controle e etanol foram testados no modelo de esQUIVA-passiva. Para atingir este objetivo, a sessão treino foi efetuada com a aplicação de 1 mA de voltagem. Em sequência os animais foram recolocados no aparelho, sussecivamente, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a

sessão treino. Sob estas condições experimentais é possível investigar se o comportamento aprendido é mantido após uma segunda exposição (evocação/consolidação) e por quanto tempo é mantido (retenção).



Figura 6. Fotografia representando o aparelho de Step-Down utilizado nas avaliações de memória.

4.15 Análise Estatística

Os resultados de testes com apenas dois grupos envolvidos e uma variável em julgo foram submetidos ao teste de “t” de Student. A comparação entre mais de dois grupos analisados sob a interferência de uma mesma variável isoladamente foi feita através da análise de variância para variáveis paramétricas de uma via (One-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni, utilizado para determinação da significância das diferenças entre os grupos. Nos ensaios em que um número superior a dois grupos estavam submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação, os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias (Two-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Todos os resultados obtidos foram expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e o nível de significância adotado para admitir-se diferenças estatisticamente significativas entre as médias foi sempre o mesmo ($p < 0,05$). Detalhes adicionais necessários estão expressos nas legendas dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1 Mensuração do Consumo Espontâneo de Água e Salina 0,3 M

Após cinco dias de adaptação nas gaiolas metabólicas a ingestão de fluidos (água e salina hipertônica) foi avaliada nos dois grupos em estudo, sem que quaisquer manipulações experimentais fossem realizadas no sentido de promover sede ou apetite ao sódio. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na ingestão de água (Figura 7A) ou de solução salina (Figura 7B), durante cinco dias de avaliação. Nos grupos analisados o consumo de solução salina não diferiu significativamente durante os cinco dias de mensuração.

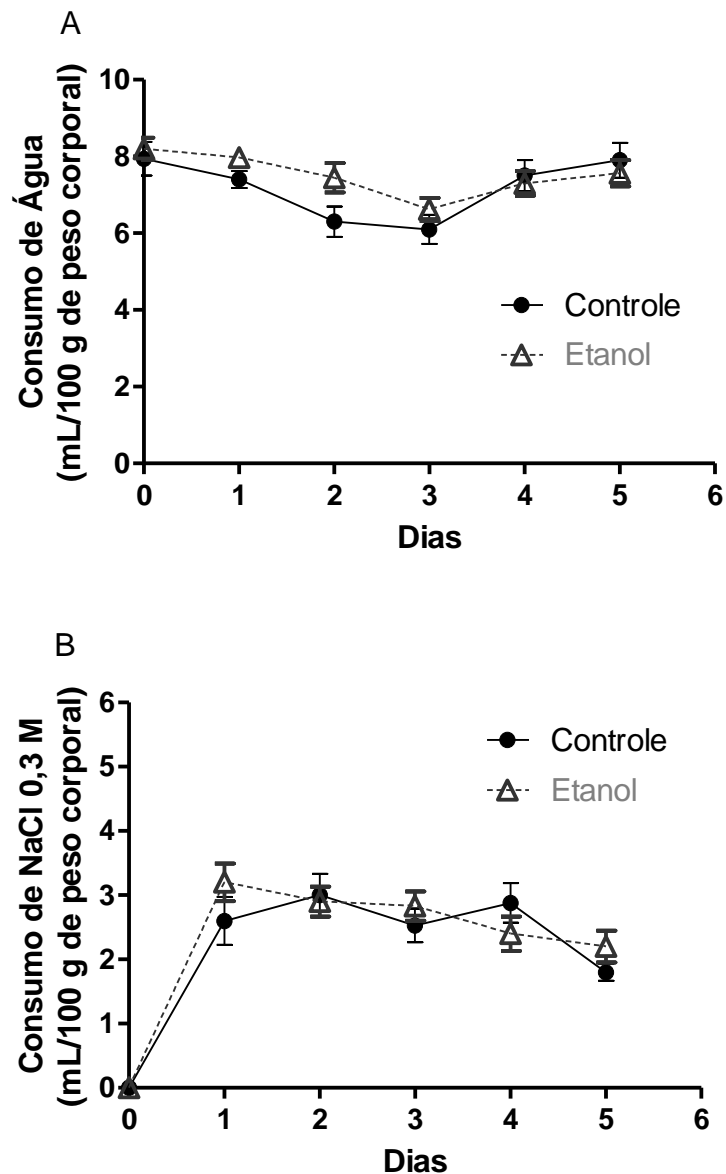


Figura 7. Avaliação do consumo de fluidos sob condições Basais. Os dados estão expressos como a média \pm o EPM ($n = 10$ / grupo). (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

5.2 Avaliação da Ingestão de Fluidos pelo Protocolo FUROCAP Modificado

O tratamento gestacional com etanol não alterou a ingestão de água no modelo FUROCAP modificado em todo o período avaliado, relativamente ao grupo controle (Figura 8). A ingestão acumulativa de sódio nas quatro primeiras horas de avaliação não diferiu entre os grupos controle e etanol. Após cinco e vinte quatro horas da reapresentação dos fluidos o consumo de salina hipertônica foi maior no grupo exposto à alcoolização gestacional aguda (Figura 9A) (5horas \rightarrow C=5,583 \pm 0,489 mL/100g, EtOH = 7,850 \pm 0,617 mL/100g; 24h \rightarrow C= 10,004 \pm 1,056 mL/100g, EtOH = 14,757 \pm 0,915 mL/100g). O consumo proporcional de salina hipertônica, em relação à água, também apresentou este mesmo padrão de diferença entre os grupos, ou seja, a proporção de solução salina consumida nestes períodos de avaliação foi mais elevada nos animais etanol. Aos 300 min (5h) de avaliação no grupo controle, o consumo de solução salina foi de 65,72 % \pm 2,1 proporcionalmente ao consumo de água, enquanto no grupo etanol foi de 74,95 % \pm 3,2. Na mensuração realizada 24 horas após a reapresentação dos líquidos os grupos controle e etanol apresentaram, respectivamente, 55,07 % \pm 2,1 e 66,6 % \pm 2,7 de consumo proporcional de solução salina.

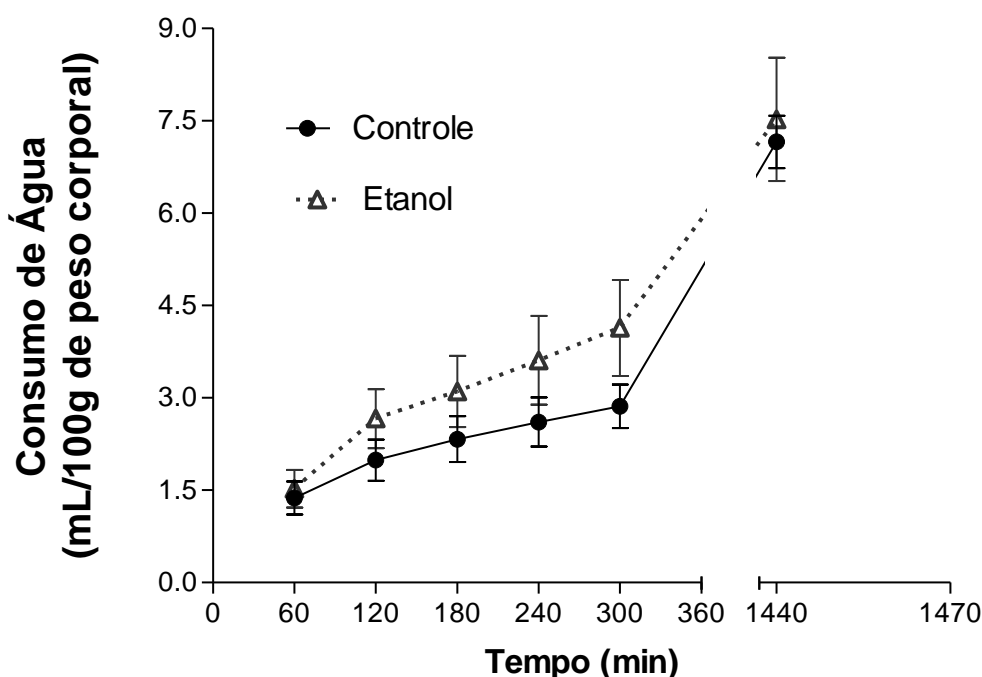


Figura 8. Ingestão acumulativa de água de animais controle e etanol sub-metidos ao protocolo FUROCAP modificado para avaliação da ingestão de água e salina hipertônica (n= 14/grupo experimental). (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

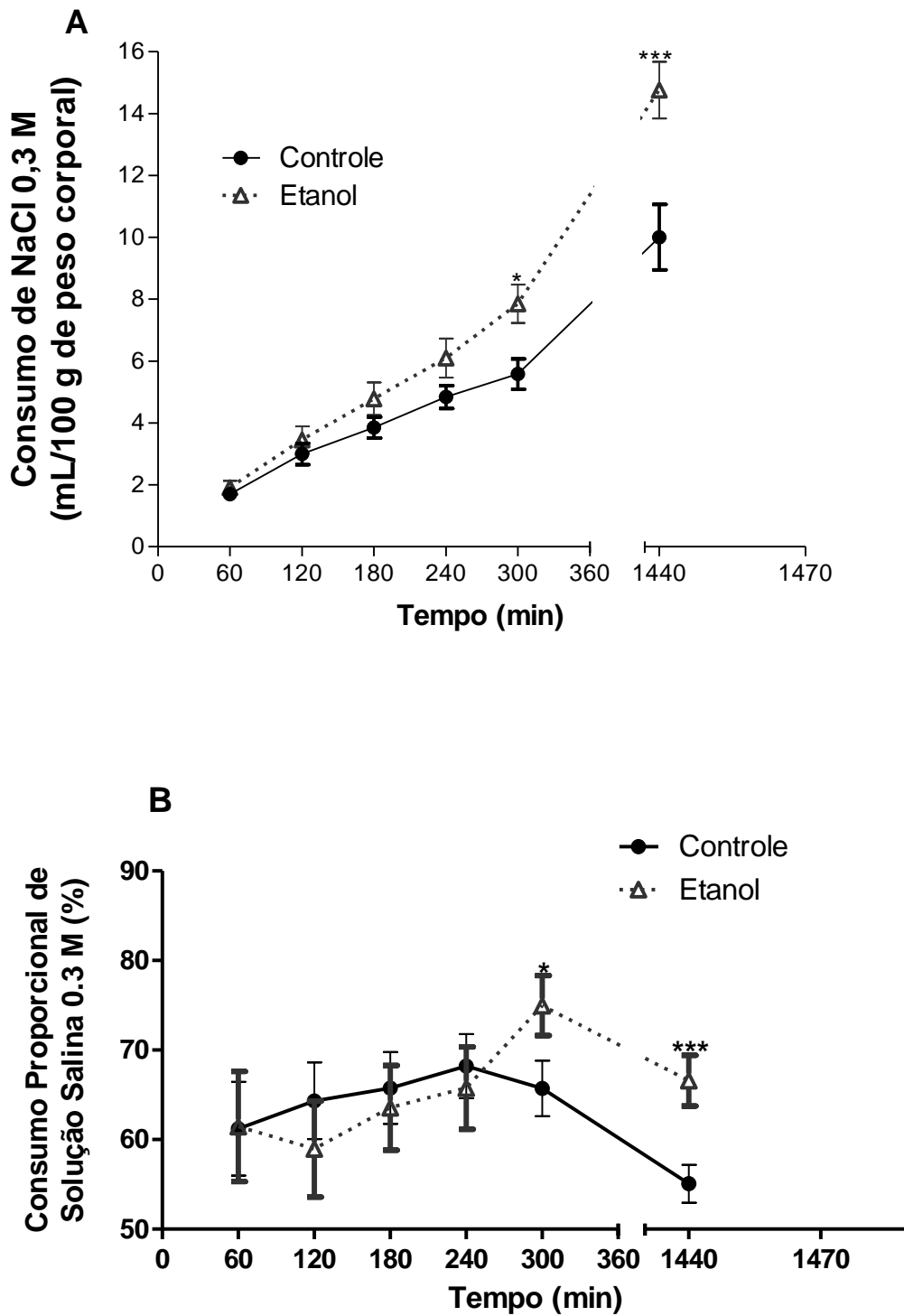


Figura 9. Ingestão acumulativa de solução de NaCl 0,3 M (A) e proporção de NaCl 0,3 M consumido relativamente à água (B), dos grupos controle e etanol submetidos ao protocolo FUROCAP. Os dados estão expressos como a média \pm o EPM. (*) Estatisticamente diferente do grupo controle. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

5.3 Parâmetros Renais e Hemodinâmicos Avaliados Durante a Dieta Hipossódica

Após observarmos diferenças na ingestão de sódio induzida pelo protocolo FUROCAP modificado (entre os animais controle e tratados durante a gestação com etanol) submetemos um novo pool de animais a este modelo. Esta nova bateria foi realizada com intuito de investigar a possibilidade da ingestão aumentada de sódio nos animais etanol ser decorrente de prejuízos na manutenção da pressão arterial e/ou da natremia, em face ao desafio homeostático gerado pela dieta pobre em sódio associada ao tratamento com furosemida (10 mg/kg sc.) e captopril (5 mg/kg sc.). Comparativamente ao grupo controle, os animais do grupo etanol não demonstraram alterações estaticamente significativas na pressão sistólica 24 horas antes (C = $90,81 \pm 4,43$ mmHg; EtOH = $95,33 \pm 3,96$ mmHg, Figura 10) e ao final da dieta hipossódica (C = $82,73 \pm 3,28$ mmHg, EtOH = $92,56 \pm 3,24$ mmHg, Figura 10). O volume urinário e a natriuresse durante o período de alimentação deficiente em sódio não diferiram entre os dois grupos, tanto em condições basais como após administração de furosemida e captopril (Figura 11). Também não foram observadas diferenças entre os grupos na variação de peso no decurso do ensaio (Figura 14, C = $309 \pm 16,6$ g em D0 e $301,5 \pm 17,35$ g em D4, enquanto EtOH = $320,9 \pm 6,867$ g em D0 e $317,2 \pm 7,104$ g em D4).

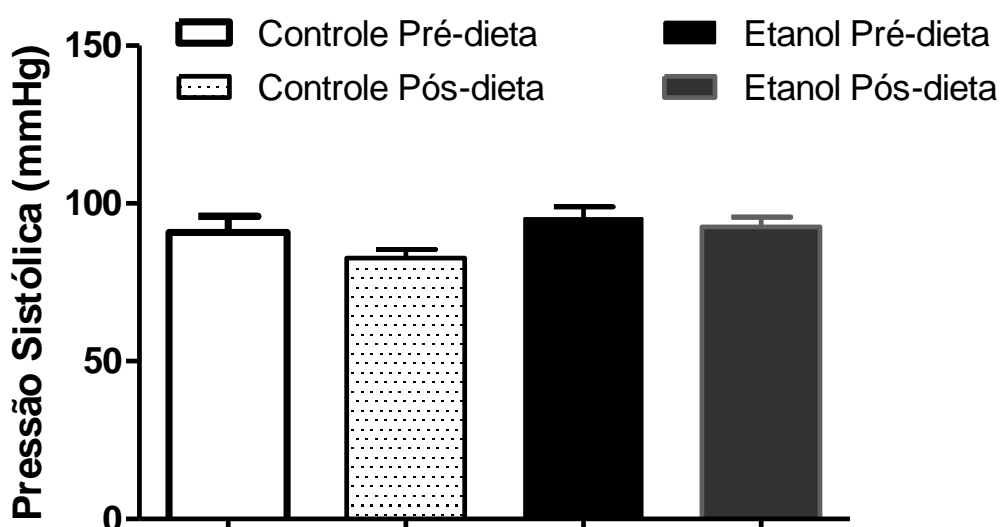


Figura 10. Média de Pressão Sistólica de animais dos grupos controle (n = 10) ou etanol (n = 10) 24 horas antes do início e ao final de quatro dias do período de dieta pobre em sódio vinculado ao protocolo FUROCAP modificado. Os dados estão expressos como a média \pm EPM. (Teste “t” de Student, condição pré-dieta X condição pós-dieta para cada grupo experimental).

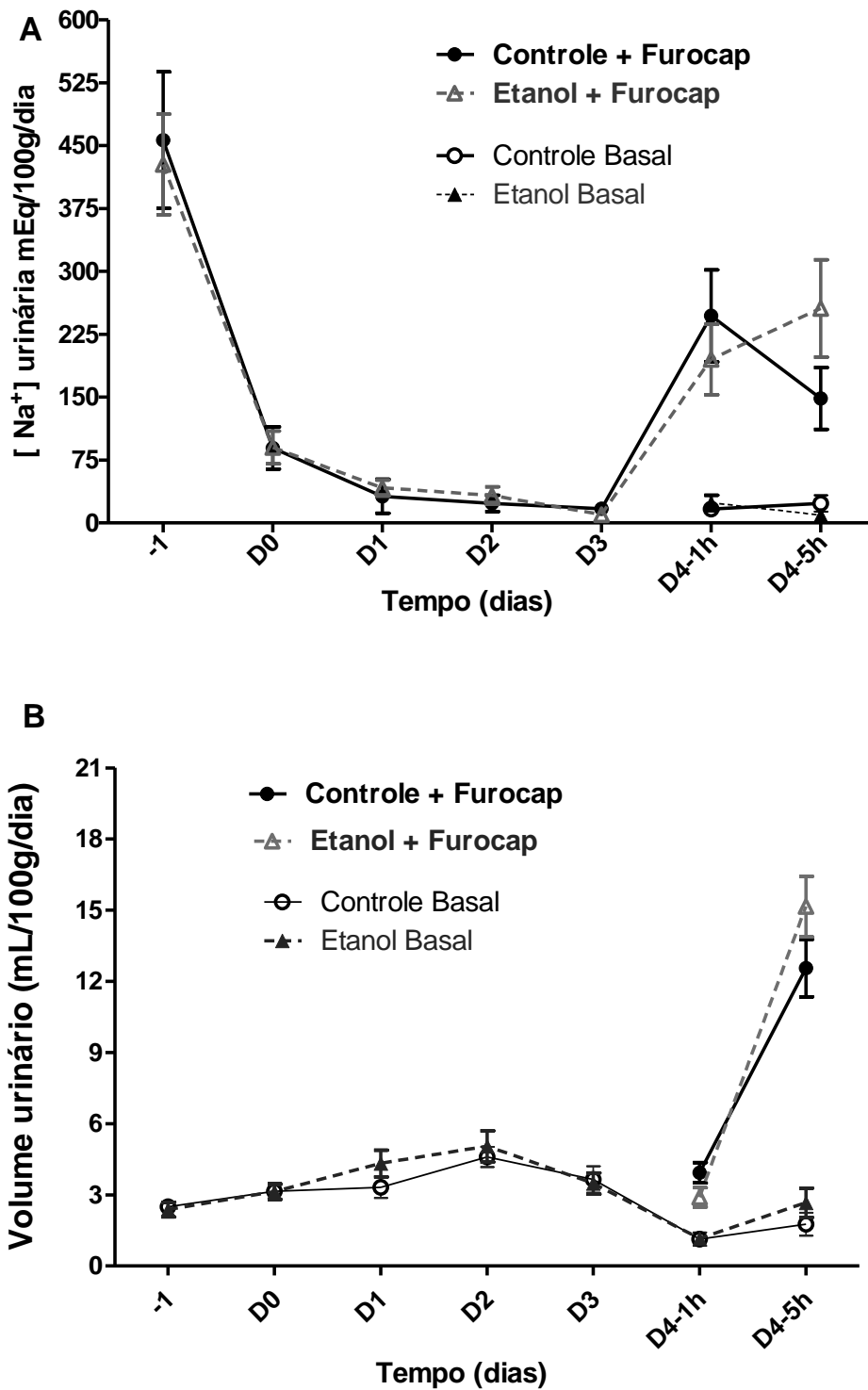


Figura 11. Em A está representando a concentração de sódio na urina dos animais controle e etanol durante o período de execução do Protocolo FUROCAP modificado. Em B o volume urinário durante o mesmo protocolo. Os dados estão expressos como a média \pm o EPM. As médias dos animais de ambos os grupos em condições basais não são estatisticamente diferentes nos pontos anteriores ao tratamento com furosemda e captopril. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

Após a dieta hipossódica não foram observadas alterações na taxa de filtração glomerular (Figura 12), no hematócrito e nas concentrações plasmática de sódio e potássio entre os grupos analisados (Figura 13). No último dia do período de dieta hipossódica utilizamos a depuração renal de creatinina (“clearance” de creatinina) para medir o Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) dos grupos estudados que foram mantidos sob condições basais no modelo FUROCAP modificado, ou seja, que não receberam tratamento com furosemida e captopril. O RFG expresso em mililitros de urina produzida por minuto é o resultado do produto da concentração urinária de creatinina pelo fluxo urinário (em vinte quatro horas) dividido pela concentração plasmática de creatinina. Após quatro dias de dieta pobre em sódio o ritmo de filtração glomerular não diferiu entre os grupos avaliados (C = $1,27 \pm 0,3$ mL/min, EtOH = $2 \pm 0,58$ mL/min) (Figura 12). Sob estas mesmas condições os níveis plasmáticos dos íons sódio (C = $133,18 \pm 3,04$ mEq/L; EtOH = $134,4 \pm 3,34$) e potássio (C = $4,4 \pm 0,12$ mEq/L; EtOH = $4,42 \pm 0,20$ mEq/L), não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Figura 13 A e B, respectivamente). Os valores do hematócrito também não foram estatisticamente diferentes entre os grupos no mesmo contexto experimental (C = $46,69 \pm 1,02$ %; EtOH = $45,49 \pm 0,74$ %) (Figura 13 C).

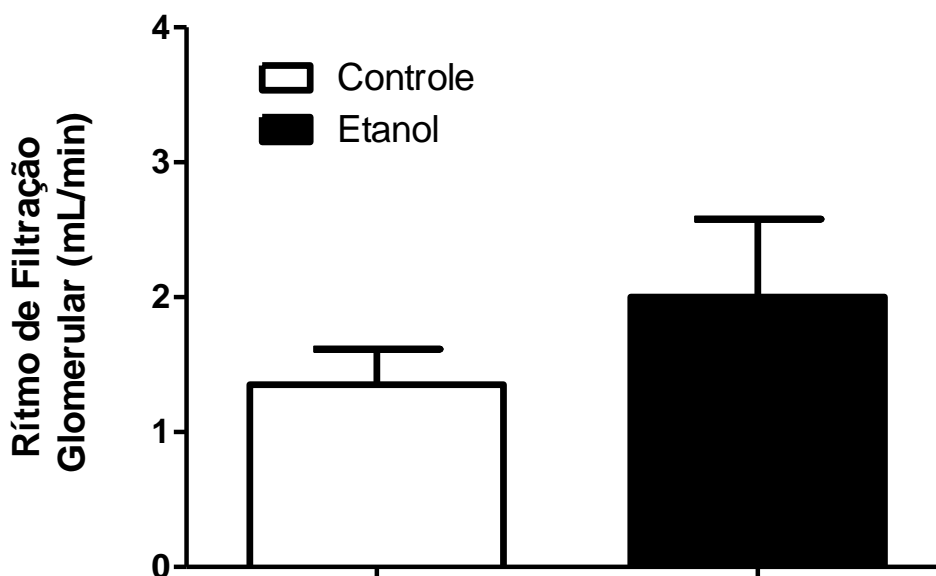


Figura 12. Média do Ritmo de Filtração Glomerular de animais controle e etanol submetidos ao período de quatro dias de dieta pobre em sódio ligado ao protocolo FUROCAP modificado. Os dados estão expressos como a média \pm o EPM de dez animais por grupo. (Teste “*t*” Student).

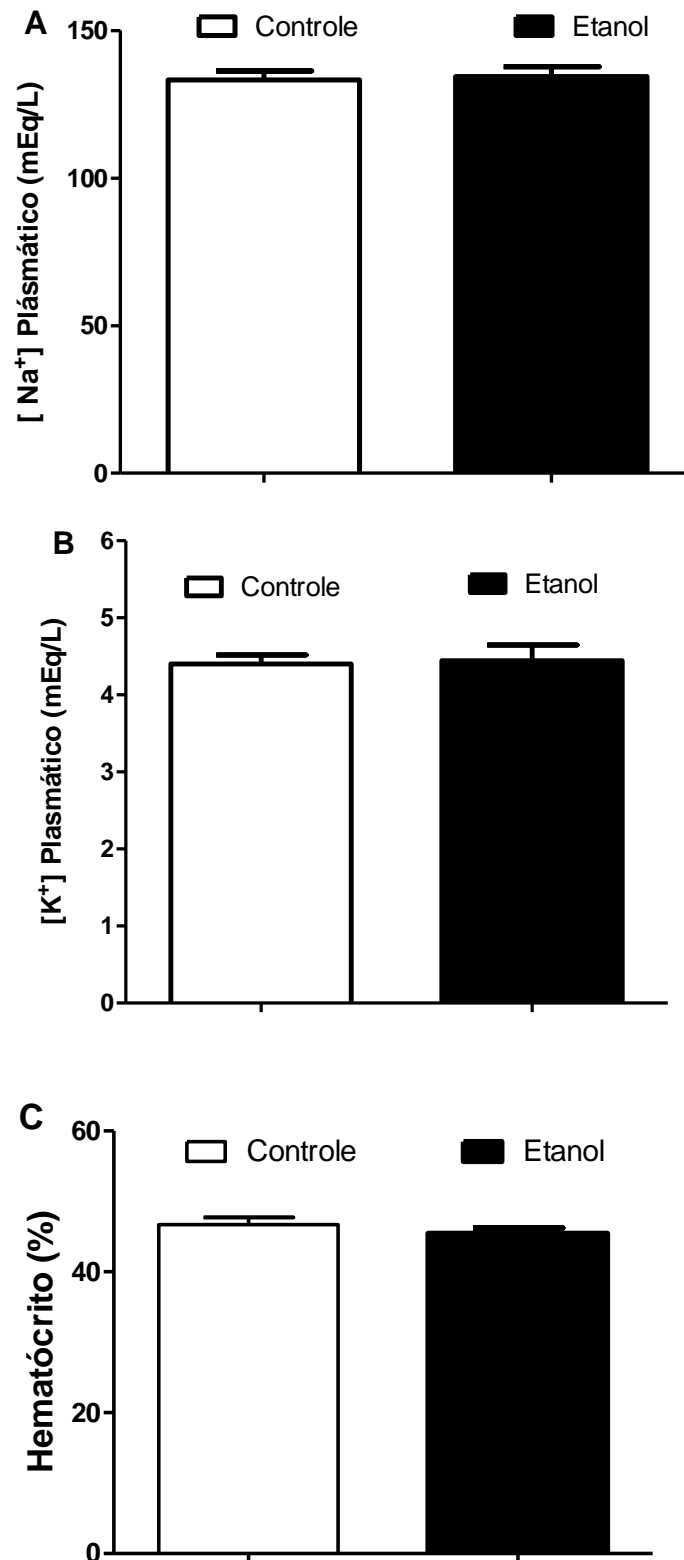


Figura 13. Em A está representado a concentração plasmática de sódio, em B a concentração plasmática de potássio e em C o hematócrito de animais dos grupos controle e etanol após quatro dias de dieta hipossódica. Os dados estão expressos como a média \pm o EPM (n=10 animais por grupo). (Teste “t” Student).

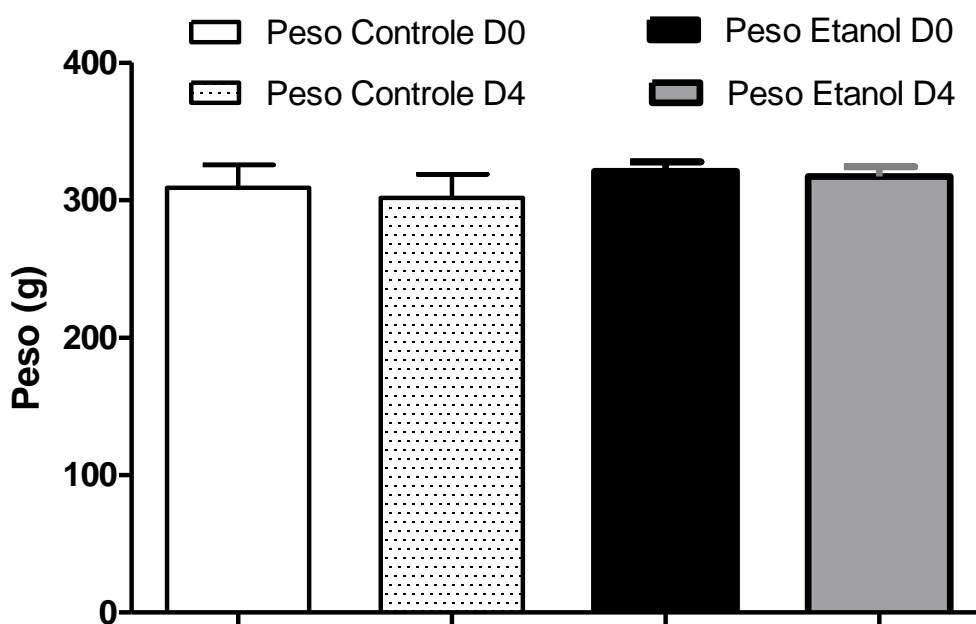


Figura 14. Variação do peso corporal após quatro dias de dieta pobre em Sódio nos diferentes grupos experimentais. Os dados estão expressos como a média \pm o EPM do peso de dez animais por grupo. (Teste “*t*” Student, condição pré-dieta X condição pós-dieta para cada grupo experimental).

5.4 Avaliação da ativação neuronal frente ao protocolo FUROCAP modificado

O número de neurônios imunorreativos para proteína Fos não foi significativamente diferente entre os animais dos grupos controle basal e etanol basal, em nenhuma das áreas estudadas (SFO, OVLT, MnPO Dorsal, MnPo Ventral, DRN, SON e PVN nas porções PaLM, PaMM, PaMP, PaPo).

Nos animais etanol e controle, depletados e sem acesso à salina e água (grupo privado), foi observado uma intensa elevação no número de células imunorreativas no SFO e OVLT (Figura 15, $p < 0,001$), comparativamente aos seus respectivos grupos basais (SFO \rightarrow CB = $14,5 \pm 1,1$; CP = $91,1 \pm 3,4$; EB = $13,75 \pm 1,2$; EP = $82,5 \pm 3,26$; OVLT \rightarrow CB = $16,4 \pm 1,1$; CP = $107,6 \pm 12,2$; EB = $16,2 \pm 1,2$; EP = $105,75 \pm 5,03$). Também no OVLT e no SFO, observou-se redução do número de neurônios Fos positivos nos animais controle e etanol submetido à estimulação experimental (depletados e com acesso aos fluidos), relativamente aos seus respectivos grupos privados (Figura 15, SFO \rightarrow CE = $42,1 \pm 2,3$; EE = $57,8 \pm 5,2$, OVLT \rightarrow CE = $35,5 \pm 1,11$; EE = $57,875 \pm 3,5$). Na condição de privação os grupos controle e etanol não diferem entre si. Entre tanto, quando analisamos o número de células Fos-positivas nos animais dos dois grupos que foram depletados e tiveram acesso aos bebedouros com água e salina (grupos estimulados), nós observamos que o grupo etanol apresentou maior número de neurônios imunorreativos à Fos (Figura 15 e Figura 16).

Nas porções dorsal e ventral do MnPO não houve diferença no número de células imunorreativa à proteína Fos entre os dois grupos, sob nenhuma das condições avaliadas (figura 15). Nos animais do grupo controle e do grupo etanol não ocorreu aumento da expressão de Fos tanto em condições basais, como sob privação de fluidos após a estimulação. Nos dois grupos experimentais ocorreu aumento de neurônios imunorreativos

após a reapresentação dos fluidos nas duas porções do MnPO. Mas não foram observadas diferenças significativas entre o número de neurônios Fos-positivos entre os dois grupos durante a condição de estimulação.

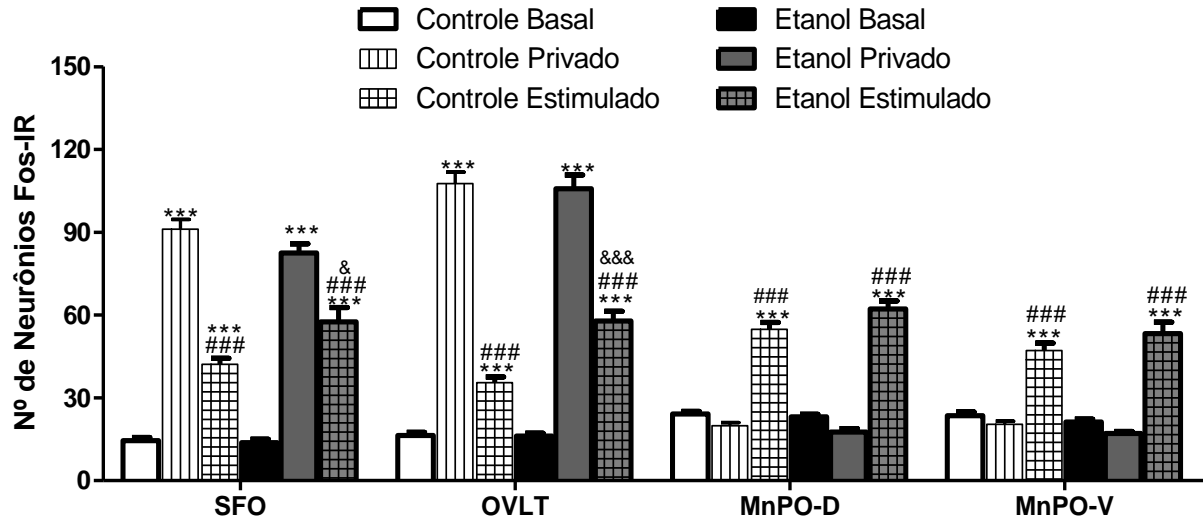


Figura 15. Número de neurônios imunorreativos à proteína Fos na lâmina terminal de animais controle ou etanol após o modelo FUROCAP modificado sob diferentes condições (Basal, Privado ou Estimulado, $n = 8/\text{grupo}$). (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

(*) Estatisticamente diferente da condição basal do respectivo grupo, $*** p < 0,001$.

(#) Estatisticamente diferente da condição Privada do respectivo grupo, $### p < 0,001$.

(&) Estatisticamente diferente do controle sob a mesma condição, $& p < 0,05$; $&&& p < 0,001$.

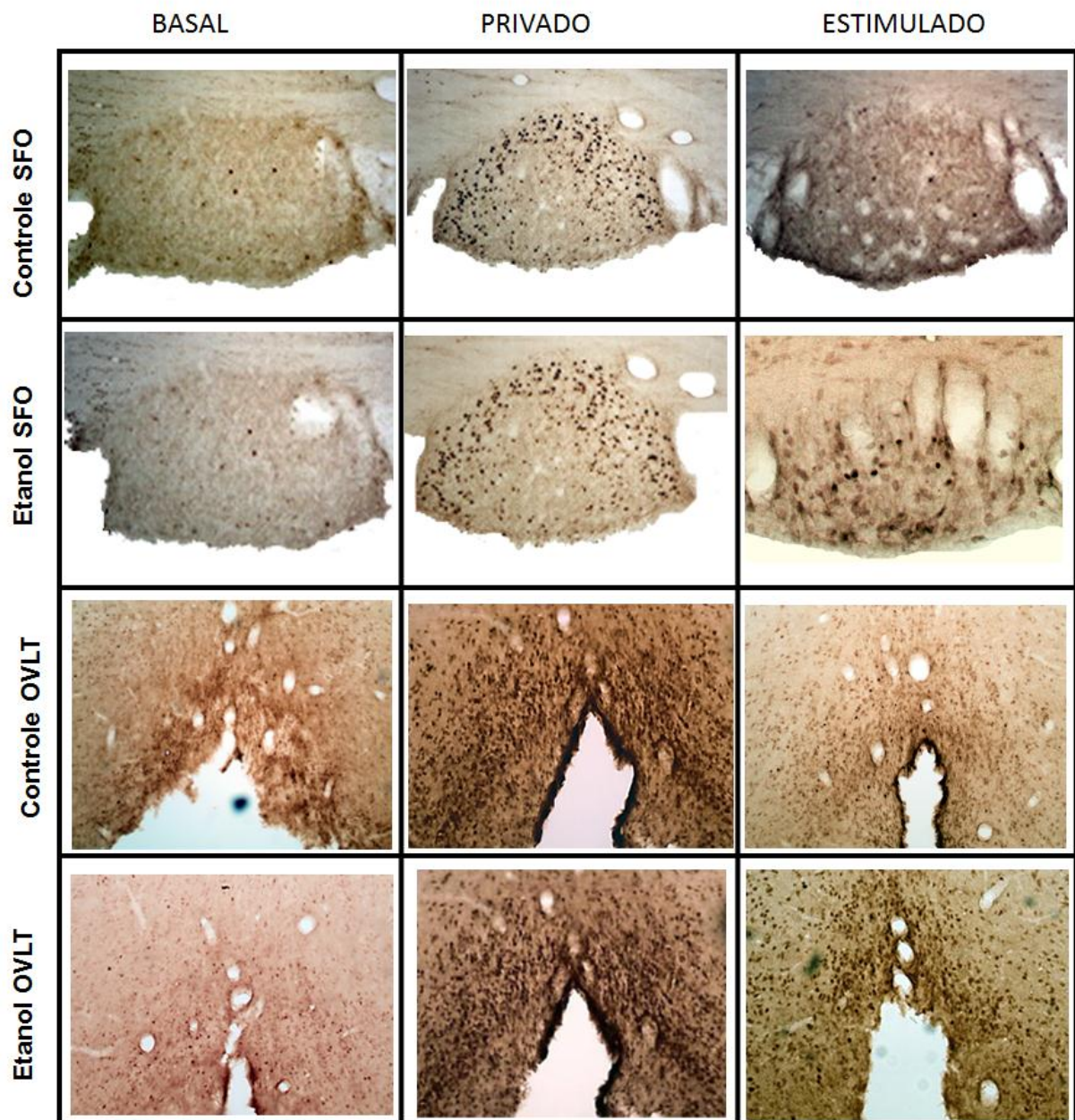


Figura 16. Fotomicrografias de secções coronais do SFO e do OVLT dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos de animais avaliados sob condição basal, depletados com Furocap + dieta hipossódica sem acesso à salina e água, ou depletados e com acesso à água mais solução salina. Aumento de 10x.

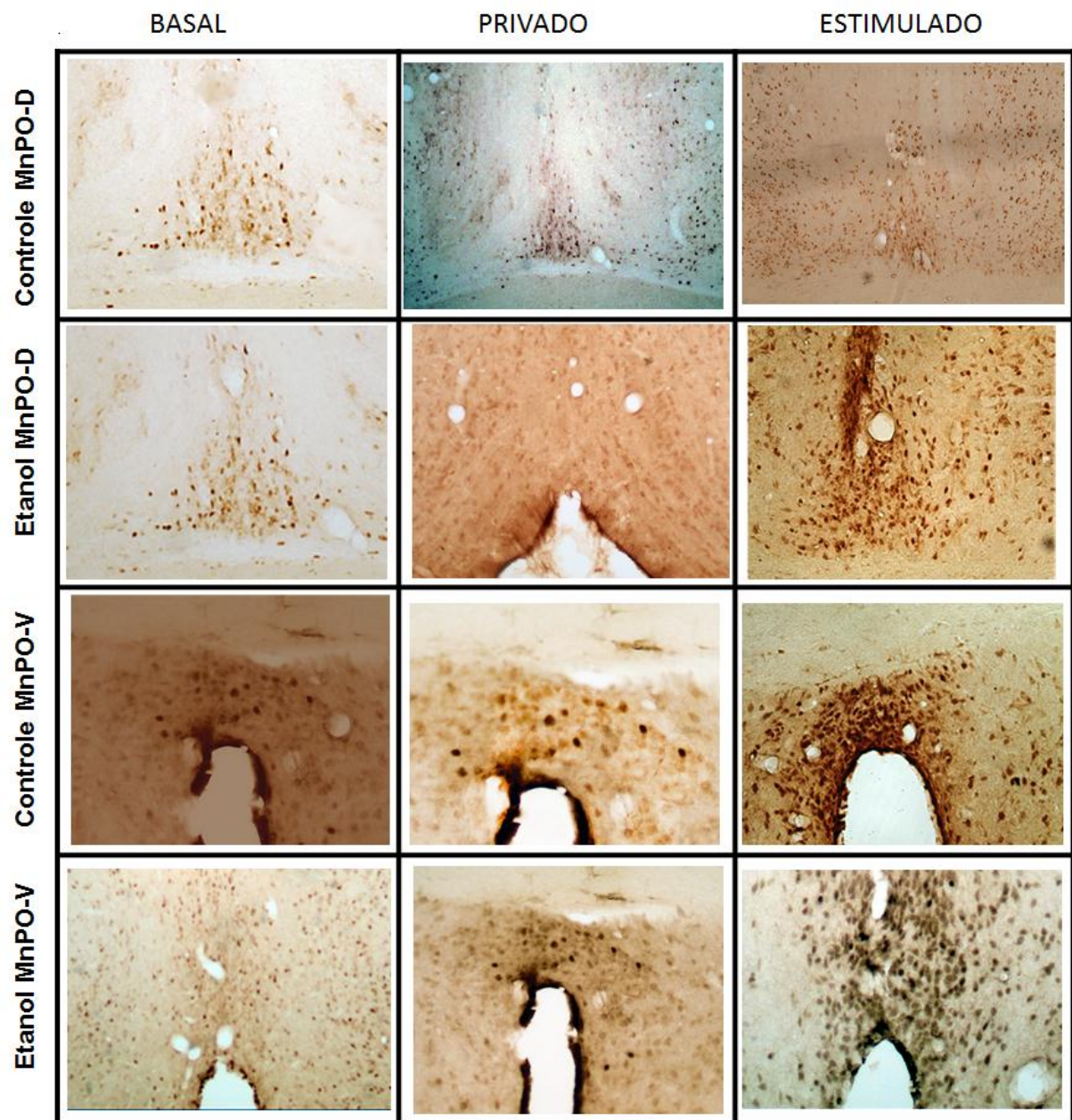


Figura 17. Fotomicrografias de secções coronais das porções dorsal e ventral do MnPO dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos de animais avaliados sob condição basal, depletados com Furocap + dieta hipossódica sem acesso à salina e água, ou depletados e com acesso à água mais solução salina. Aumento de 10x.

Cinco horas após o início do consumo de solução salina observamos que existe menor número de neurônios imunorreativos à proteína Fos (Fos-ir) no SON dos animais etanol estimulados, relativamente ao grupo controle estimulado (que também consumiu salina) (figura 18). A dupla marcação de células imureativos para Fos-OT também foi significativamente menor nos animais etanol estimulados, comparativamente à mesma condição do controle (figura 19, $p < 0,01$). No SON não houve diferença entre os dois grupos em condições de privação ou em condição basal. Em ambos os grupos grupos não

encontramos diferenças no número de células Fos-positivas e Fos-OT-positivas quando comparamos os animais em condição de privação com os animais em condição basal.

Quando analisados os sub-núcleos do PVN dos animais controle e etanol, observamos que a condição de privação reduz o número de células Fos-ir nas porções magnocelular medial, magnocelular lateral e parvocelular posterior, em relação aos respectivos grupos basais, mas não foram verificadas diferenças significativas na porção parvocelular medial (figura 18). Quando comparamos o controle estimulado e etanol estimulado (animais que consumiram salina após a depleção), encontramos redução significativa da média de neurônios Fos-ir nas nas porções magnocelulares (PaML e PaMM) nos animais etanol. Ainda comparando estes dois grupos nesta condição, também encontramos menor número de células duplamente marcadas Fos+OT em todas as porções do PVN analisadas dos animais etanol (figura 19), incluindo a porção periventricular não apresentada na figura 19 (CE= $46,7 \pm 8,3$; EE = $28,4 \pm 9,6$; $p < 0,05$).

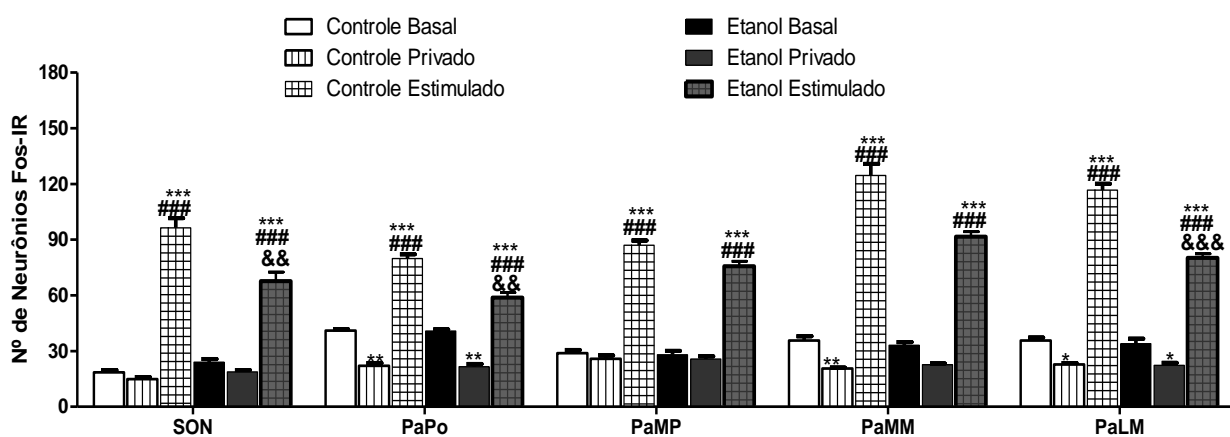


Figura 18. Número de neurônios imunorreativos à proteína Fos no SON e nos sub-núcleos Medial Magno (PaMM), Lateral Magno (PaLM), Medial Parvo (PaMP) e Parvo Posterior do PVN de animais controle ou etanol após o modelo FUROCAP modificado sob diferentes condições (Basal, Privado ou Estimulado, n = 8/grupo).

(* Estatisticamente diferente da condição basal do respectivo grupo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. (#) Estatisticamente diferente da condição Privada do respectivo grupo, ### $p < 0,001$. (&) Estatisticamente diferente do grupo controle estimulado (depletado com acesso a solução salina) & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,01$. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

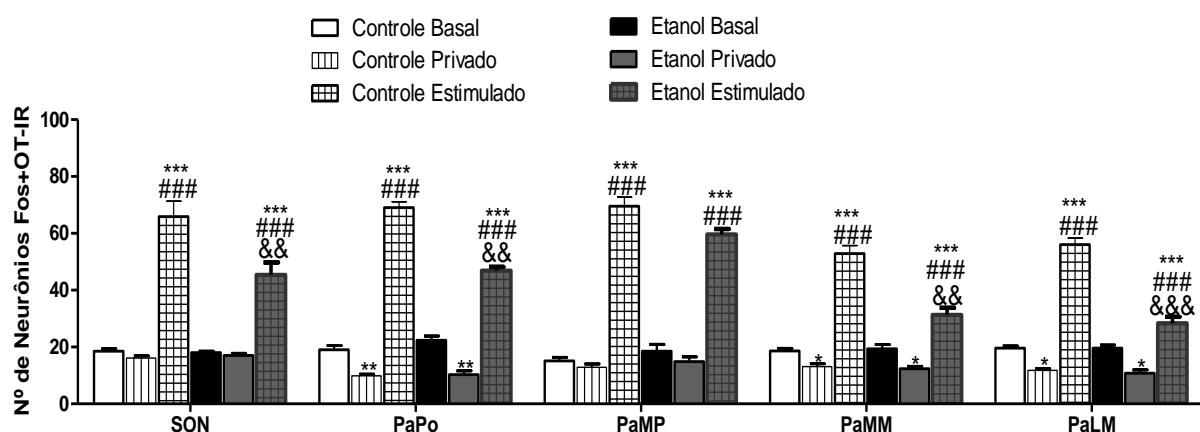


Figura 19. Número células com dupla marcação para Fos+OT no SON e nos sub-núcleos Medial Magno (PaMM), Lateral Magno (PaLM), Medial Parvo (PaMP) e Parvo Posterior do PVN de animais controle ou etanol após o modelo FUROCAP modificado sob diferentes condições (Basal, Privado ou Estimulado, n = 8/grupo).

(*) Estatisticamente diferente da condição basal do respectivo grupo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. (#) Estatisticamente diferente da condição Privada do respectivo grupo, ### $p < 0,001$. (&) Estatisticamente diferente do grupo controle estimulado, & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,01$ (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

A contagem de neurônios Fos-positivos no DRN foi efetuada considerando em conjunto as porções ventral, dorsal e ventro-lateral deste núcleo. Os animais do grupo controle basal e etanol basal não apresentaram diferenças na média de neurônios Fos-positivos (Figura 21A) e na média do número de células com dupla marcação da proteína Fos+TPH-2 (Figura 21B). Não foram observadas diferenças entre os animais, dos dois grupos experimentais, submetidos à privação de fluidos após aplicação de FUROCAP, tanto na contagem total de neurônios Fos-ir como na dupla marcação Fos+TPH-2 (Figura 21). Nos dois grupos experimentais a condição de privação promoveu menor imunorreatividade à proteína Fos e redução da dupla marcação de Fos+TPH-2, relativamente a condição basal. Após transcorrido cinco horas da oferta de água e solução salina, ocorreu um acentuado aumento do número de neurônios Fos-positivos e Fos+TPH-2 positivos, nos animais estimulados de ambos os grupos (Figura 21). Ainda assim, a média de neurônios Fos positivos foi significativamente maior no grupo controle ($p < 0,001$, figura 21), relativamente aos animais etanol submetidos à esta mesma condição experimental. O número de células com dupla marcação Fos-TPH-2, também foi significativamente maior no grupo controle estimulado (Figura 21B).

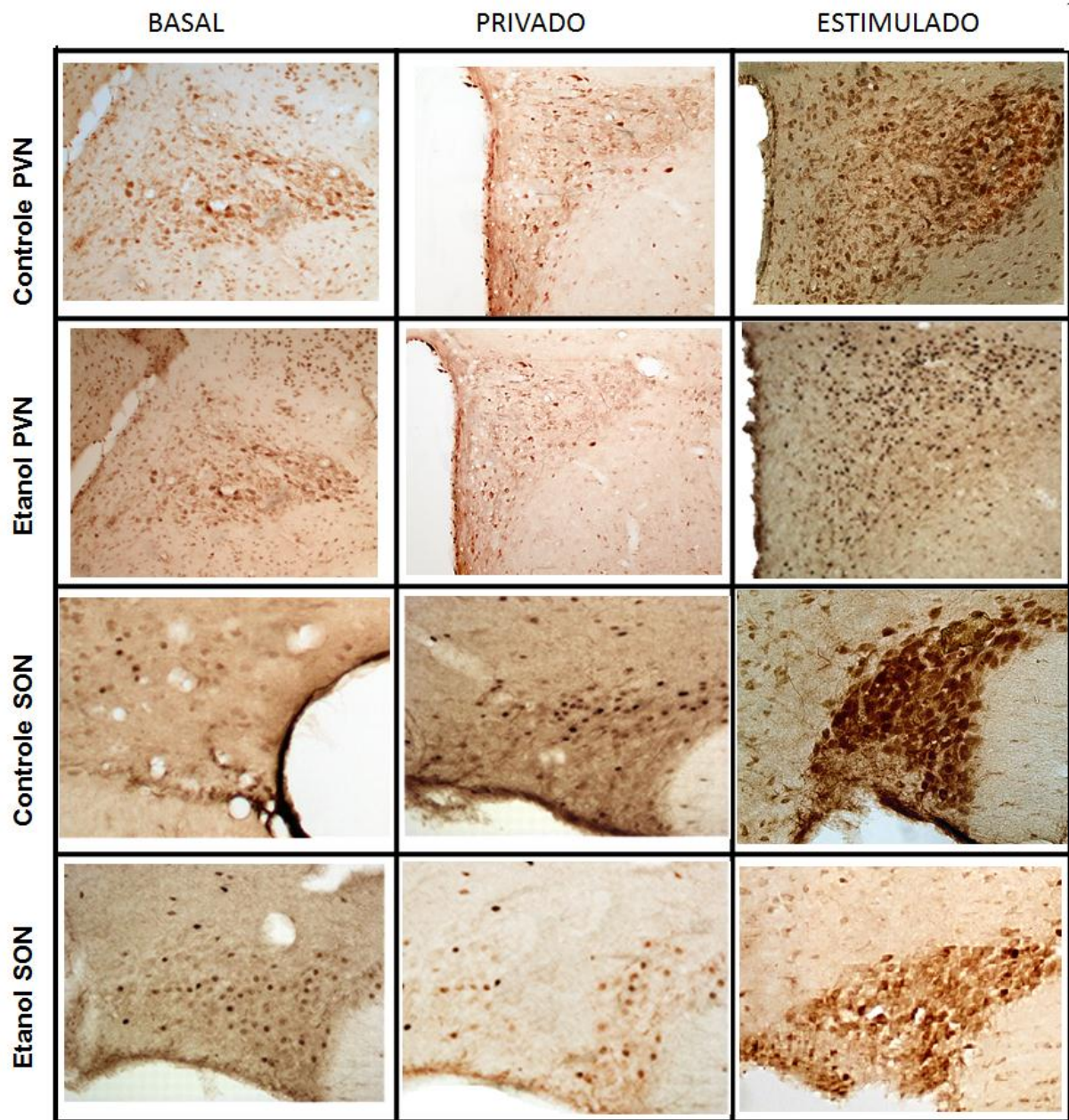


Figura 20. Fotomicrografias de secções coronais do PVN e SON dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos de animais avaliados sob condição basal, depletados com Furocap + dieta hipossódica sem acesso à salina e água, ou depletados e com acesso à água mais solução salina. Aumento de 10x.

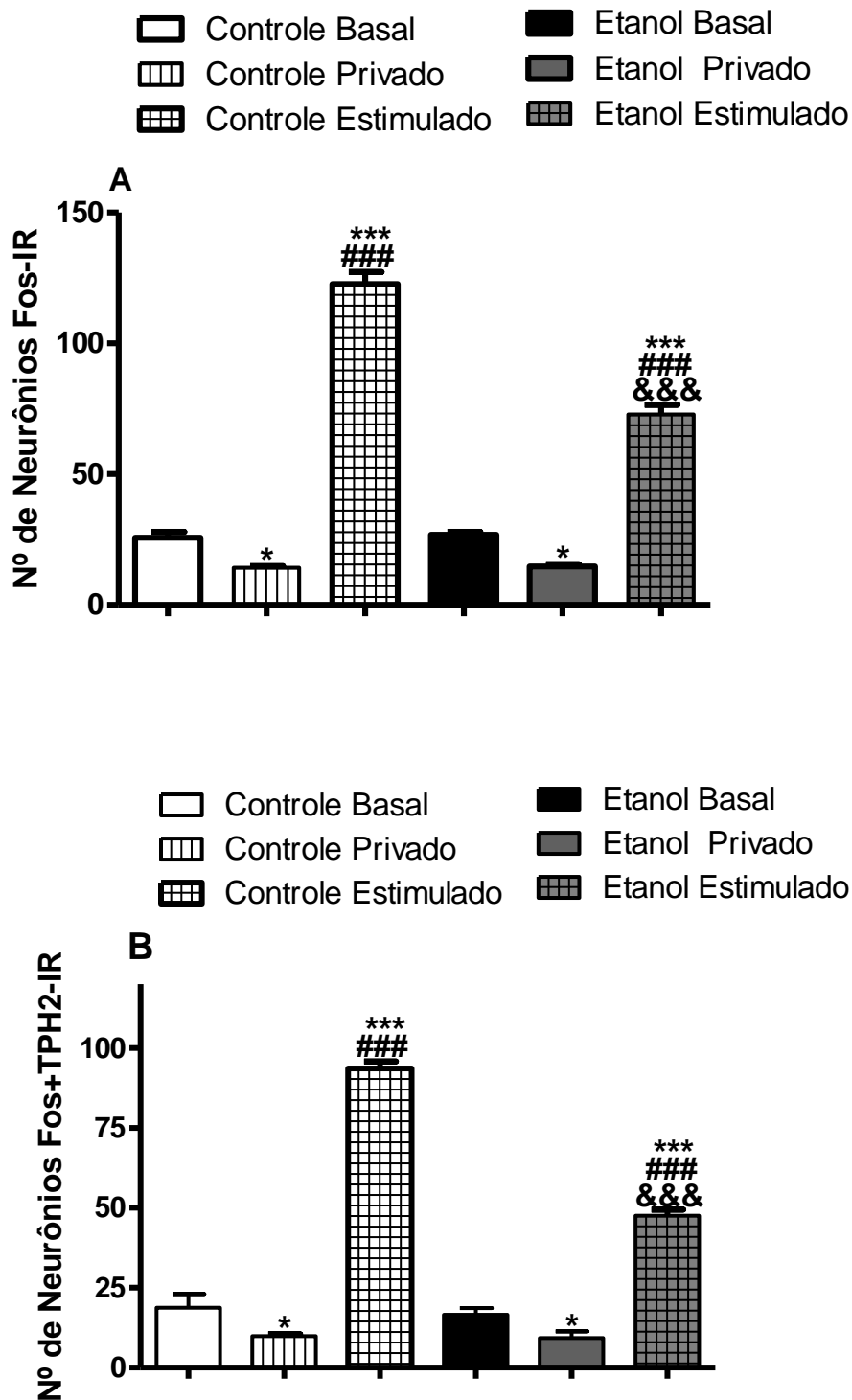


Figura 21. Número de neurônios imunorreativos para Fos (A) e para Fos+TPH (B) no DRN de animais controle ou etanol após o modelo FUROCAP modificado sob diferentes condições (Basal, Privado ou Estimulado, n = 8/grupo). (*) Estatisticamente diferente da condição basal do respectivo grupo, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (#) Estatisticamente diferente da condição Privada do respectivo grupo, ### $p < 0,001$. (&) Estatisticamente diferente do grupo controle estimulado, &&& $p < 0,001$ (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

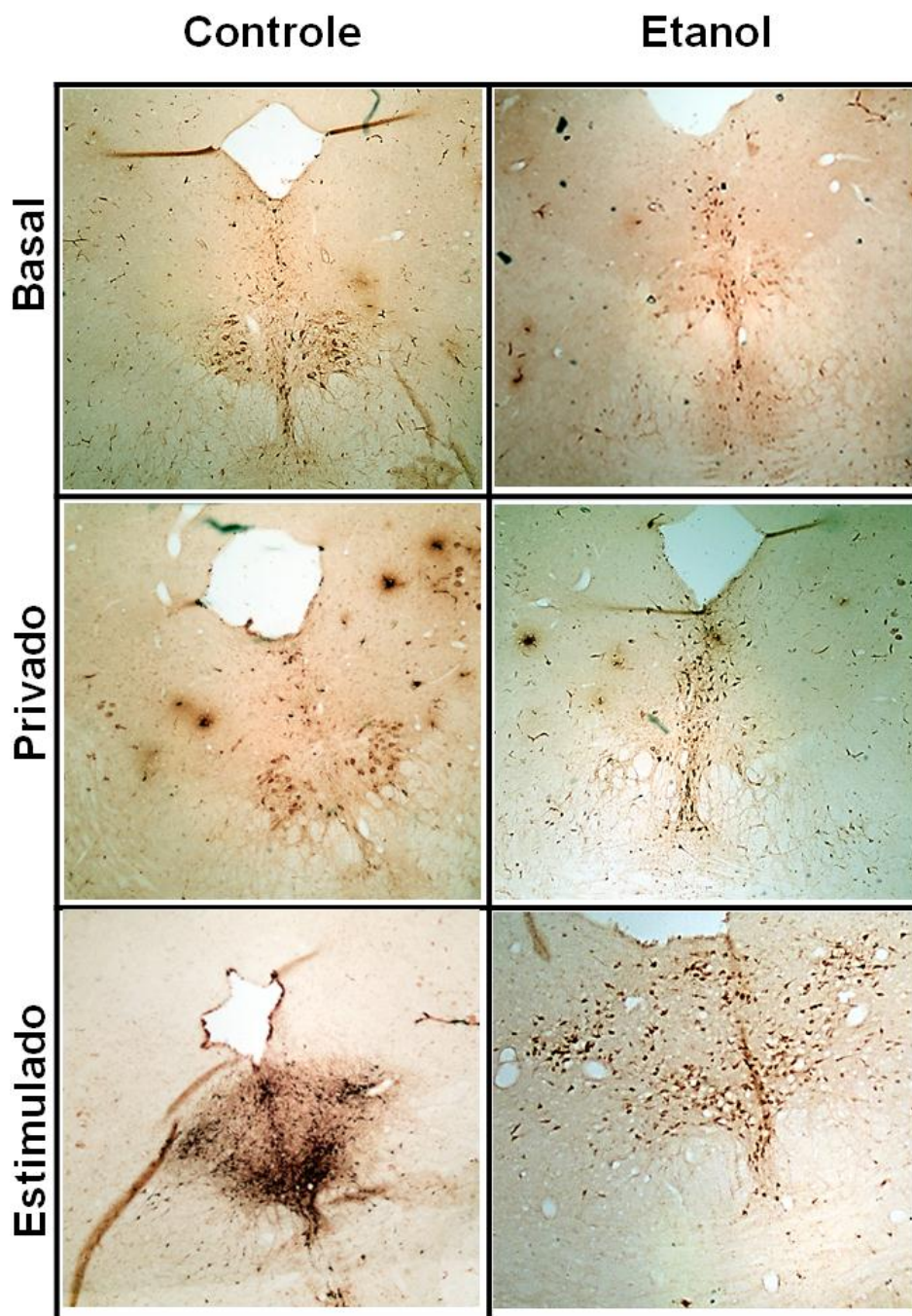


Figura 22. Fotomicrografias de secções coronais do DRN dos grupos em estudo ilustrando o padrão de imunorreatividade à proteína Fos de animais avaliados sob condição basal, depletados com Furocap + dieta hipossódica sem acesso à salina e água, ou depletados e com acesso à água mais solução salina. Aumento de 4x

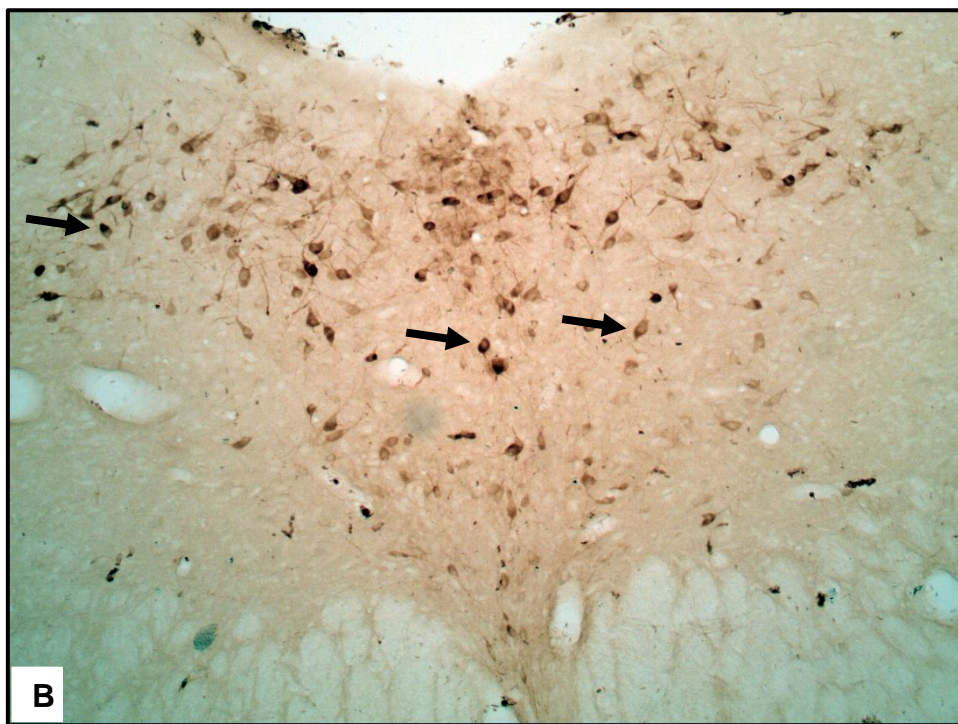
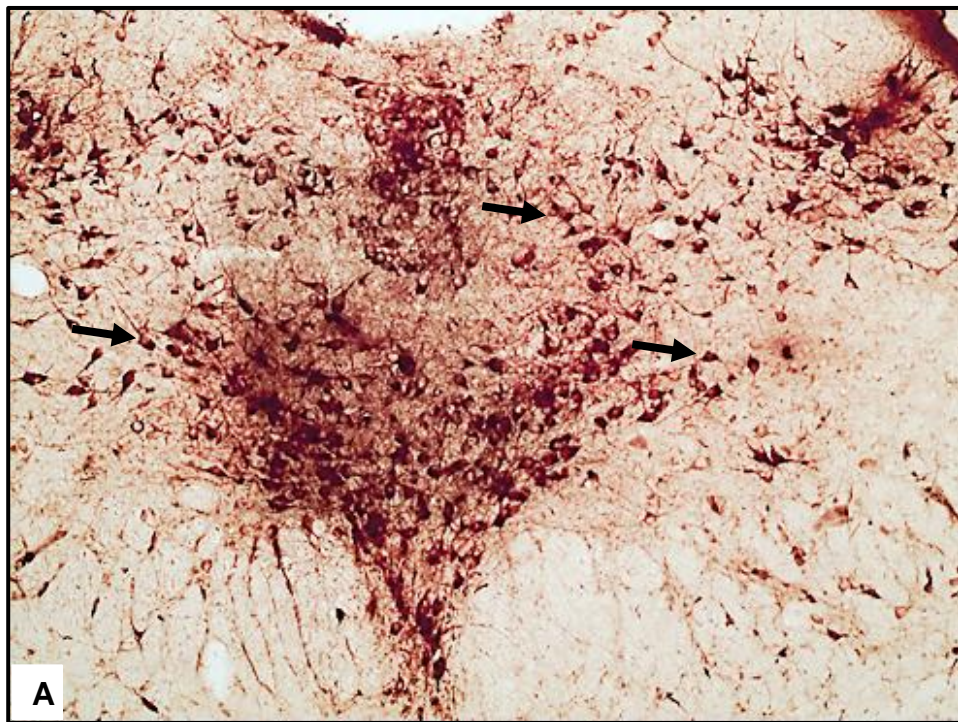


Figura 23. Fotomicrografias de secções coronais do DRN ilustrando a dupla-marcação para proteína Fos+Triptofano Hidroxilase (setas) em neurônios do DRN de animais controle (A) e etanol (B) cinco horas após o início do consumo de salina hipertônica. Aumento 10x

5.5 Desenvolvimento Ontogênico, Ponderal e Sensorio-Motor

O protocolo de alcoolização pré-natal ao qual submetemos as ninhadas não produziu alterações detectáveis nos testes reflexológicos e sensoriais (Tabelas 1), bem como não alterou a evolução ponderal dos animais do grupo etanol (figura 24), comparativamente ao animais do grupo controle. Entretanto, alguns parâmetros murinométricos foram alterados (Tabela 2). A irrupção dos dentes incisivos obteve uma antecipação de cerca 1,2 dois dias no grupo etanol, em relação ao controle (EtOH = 9,406 ± 0,359 dias, C = 10,58 ± 0,283 dias). Relativamente às ninhadas controle, o desdobramento do pavilhão auricular ocorreu praticamente dois antes nas ninhadas expostas ao etanol (EtOH = 1,328 ± 0,206, C = 3,208 ± 0,275, dias), a abertura dos olhos um dia (EtOH = 13,31 ± 1,145, C = 14,32 ± 0,295, dias) e descida dos testículos foi antecipada em mais de três dias (EtOH = 19,09 ± 0,228, C = 23,06 ± 0,710, dias). A data de abertura vaginal nas fêmeas não foi afetada pelo tratamento com etanol.

Tabela 1. Avaliação cronológica do desenvolvimento Sensorio-Motor de ninhadas tratadas em E₁₄ com etanol ou solução fisiológica.

REFLEXOS AVALIADOS	Grupo Controle	Grupo Etanol
Reflexo Postural	1,889 ± 0,205	1,922 ± 0,087
Geotaxia Negativa	7,384 ± 0,459	8,638 ± 0,390
Esquiva ao Abismo	8,713 ± 0,525	9,653 ± 0,545
Preensão Palmar	9,750 ± 0,291	10,01 ± 0,215
Sobressalto Auditivo	12,11 ± 0,439	11,23 ± 0,122
Localização pelas Vibrissas	3,725 ± 0,336	4,688 ± 0,210
Queda Livre	11,68 ± 0,391	11,09 ± 0,172
Equilíbrio em Borda	15,99 ± 0,406	17,70 ± 0,567

Os dados estão expressos como a média ± o EPM do dia em que o reflexo foi caracterizado nas ninhadas de cada grupo experimental (n=10 ninhadas por grupo experimental). (Teste “t” de Student).

Tabela 2. Avaliação cronológica dos principais indicadores de desenvolvimentos neonatal em roedores (parâmetros murinométricos) de ninhadas tratadas com etanol ou solução fisiológica

Parâmetros Murinométricos	Grupo Controle	Grupo Etanol
Erupção dos Incisivos	10,58 ± 0,285	9,406 ± 0,359*
Desdobramento das Orelhas	3,208 ± 0,275	1,328 ± 0,206**
Abertura dos Olhos	14,32 ± 0,297	13,09 ± 0,229**
Descida Testicular	23,06 ± 0,711	19,31 ± 1,145*
Abertura Vaginal	35,36 ± 1,001	34,70 ± 1,088

Os dados estão expressos como a média ± o EPM do dia de surgimento da característica em cada ninhada (n=10 ninhadas por grupo experimental). (*) P < 0.05; (**) P < 0.01. (Teste “t” de Student).

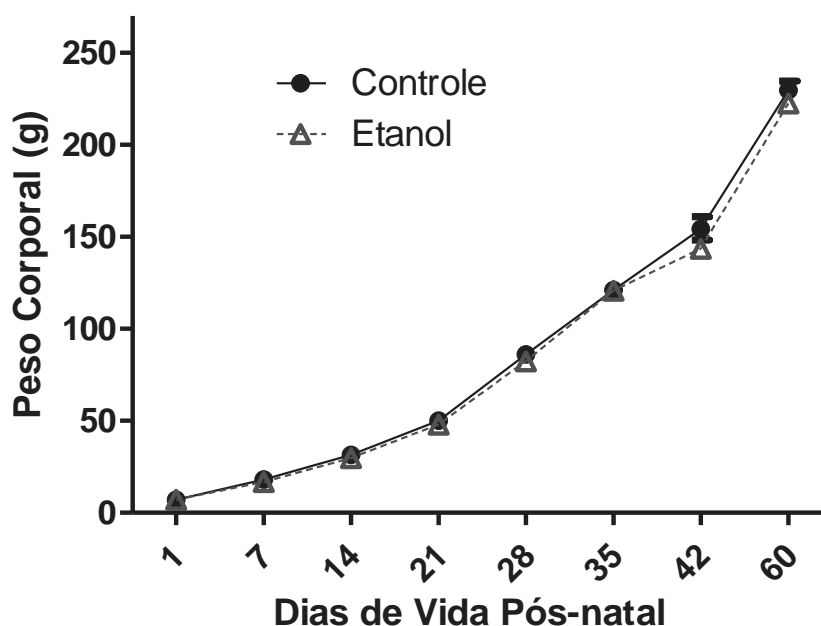


Figura 24. Evolução do desenvolvimento Ponderal de ratos machos expostos ao tratamento agudo com etanol durante o período neurogênese embrionária ou solução fisiológica (n = 36 animais por grupo experimental). (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

5.6 Resultados dos Testes de Comportamento

Os animais tratados com etanol durante a gestação não demonstram alterações no consumo espontâneo de sacarose, no teste de preferência por sacarose (C = $84,19 \pm 2,59$ %, EtOH = $85,5270 \pm 2,68$ %, Figura 25). Este resultado sugere que o componente hedônico, sensível ao teste, não foi alterado pelo tratamento com etanol durante a gestação. Através dos testes do campo aberto (Tabela 3) e do rota-rod (Figura 26) verificamos que o tratamento com etanol não acarretou comprometimento motor na fase adulta. Pois os animais controle e etanol não expressam diferenças no total de quadrados percorridos no campo aberto (C = $128,7 \pm 9$, EtOH = $120,2 \pm 6,5$), na latência para a primeira queda (C = $21,50 \pm 1,939$ s; EtOH = $18,10 \pm 1,263$ s) e total de quedas no rota-rod (C = $3,667 \pm 0,5$, EtOH = $4,3 \pm 0,6$).

Ainda utilizando as possibilidades metodológicas inerentes ao teste do campo aberto, obtivemos com os animais do grupo etanol, resultados sugestivos de uma alteração comportamental similar a resposta de medo e/ou ansiedade, quando analisado o percentual de áreas percorridas no centro do aparato (C = $15,1 \pm 0,88$, EtOH = $9,9 \pm 1,1$; Tabela 3).

Em função dos resultados obtidos no teste do campo aberto, realizamos o teste do labirinto em cruz elevado, um ensaio mais sensível e com maior capacidade de preditibilidade a cerca de padrões do tipo ansiogênico ou ansiolítico, que podem ser gerados por diferentes abordagens experimentais. Neste teste, os indivíduos expostos ao tratamento gestacional agudo com etanol apresentaram redução do número de entradas (C = $41,45 \pm 5,4$ % de entradas nos braços abertos, enquanto EtOH = $20,1 \pm 3,2$ %) e do tempo despendido nos braços abertos (C = $40\% \pm 5,8$ %, EtOH = $13,31 \pm 3,4$ %, Figura 27). Estes resultados são indicativos de um padrão comportamental relacionado à ansiedade.

Como os resultados do teste do labirinto em cruz elevado suscitaram a possibilidade de alterações comportamentais relacionadas à ansiedade, e ansiedade e depressão podem estar associadas como comorbidades, realizamos o ensaio do nado forçado. O modelo utilizado para ratos proporciona uma condição de estresse, durante uma sessão de pré-exposição, incorrendo nos animais redução das respostas de fuga após uma segunda exposição, que é interpretada como comportamento relacionado à depressão ou redução motivacional. A prole de ratas tratadas com etanol não apresentou redução do comportamento de fuga, comparativamente à sessão treino. Enquanto os animais controle apresentaram redução deste mesmo parâmetro. O tempo de imobilidade do controle nas sessões treino e teste, foi de $192,750 \pm 19,97$ e $259,32 \pm 23,673$ segundos, respectivamente. Enquanto o tempo dos animais do grupo etanol foi $160,24 \pm 4,59$ segundos e $162,6 \pm 5,77$ segundos (Figura 28).

No teste de esQUIVA-passiva os resultados do tratamento gestacional com etanol podem ser agrupados em função da intensidade do estímulo. Quando aplicamos um estímulo leve (0.3 mA) nos animais do grupo etanol foi possível detectar redução da aquisição da memória (Figura 29). Com a elevação da intensidade do estímulo (1 mA), o grupo etanol não apresentou diferença em relação ao controle na aquisição, mas apresentou redução significativa na capacidade de retenção/evocação da memória (Figura 30).

Tabela 3. Descrição dos resultados dos parâmetros avaliados no teste do Campo Aberto. Resultados expressos como média \pm EPM. (*) Estatisticamente diferente do grupo controle.

Grupo Experimental	Parâmetros Observados no Teste do Campo Aberto-Machos					
	Total de Áreas Cruzadas	Áreas Cruzadas no Centro (%)	Tempo de Imobilidade (s)	Nº Auto-Limpezas	Comportamento de Levantar	Bolos Fecais
Controle	$128,7 \pm 9$	$15,1 \pm 0,88$	$7,1 \pm 0,84$	$2,0 \pm 0,57$	$22,82 \pm 0,88$	$2,0 \pm 0,3$
Etanol	$120,2 \pm 6,5$	$9,9 \pm 1,1^{**}$	$6,38 \pm 1,31$	$1,75 \pm 0,32$	$24,0 \pm 1,78$	$2,58 \pm 0,6$
Diazepam	$124,0 \pm 12,5$	$20,3 \pm 1,33^{**}$	$8,62 \pm 2,72$	$2,2 \pm 0,55$	$24,3 \pm 3,23$	$2,5 \pm 0,4$
PTZ	$56,3 \pm 3,7^{***}$	$5,1 \pm 0,8^{***}$	$37,8 \pm 3,31^{***}$	$0,2 \pm 0,1$	$3,5 \pm 2,3^{***}$	$0,56 \pm 0,3^*$

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). (Controle n=12, Etanol n=14, Diazepam =8, PTZ= 7). (One-Away ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

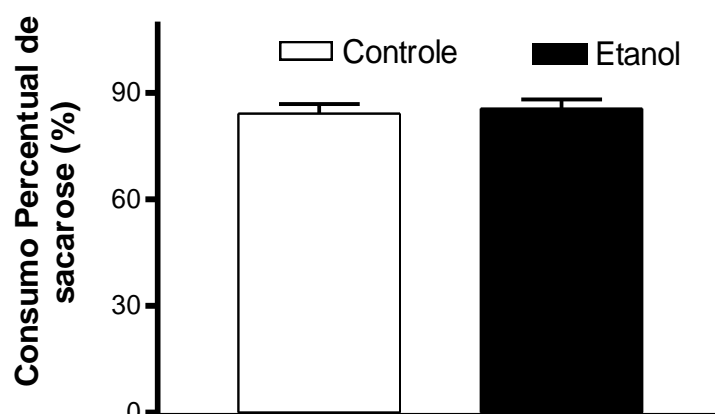


Figura 25. Porcentagem do consumo de solução de sacarose (0,8%) relativamente ao consumo de água em vinte e quatro horas de exposição aos dois tipos de fluidos. Os dados estão expressos como a Média \pm EPM de 16 animais por grupo. (Teste “*t*” de Student).

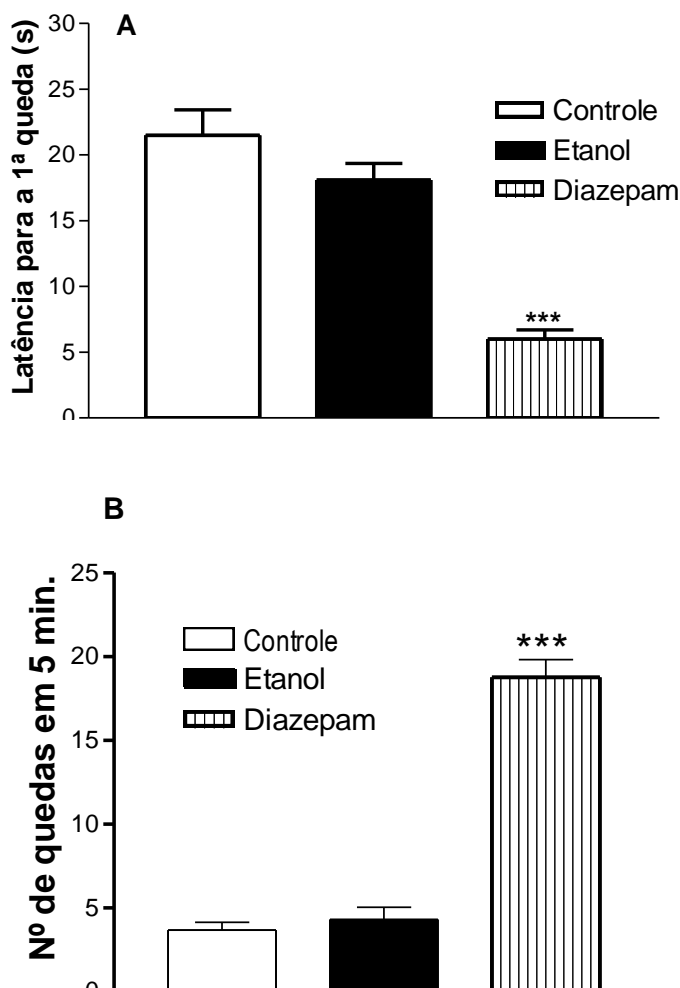


Figura 26. Em A está representado latência em segundos para a primeira queda no teste do Rota-Rod, em B está representado o número total de quedas em cinco minutos de teste. Os dados estão expressos como a Média \pm EPM de 10 animais para cada um dos grupos. (*) Estatisticamente diferente da média do grupo controle. *** $P < 0,001$. (One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

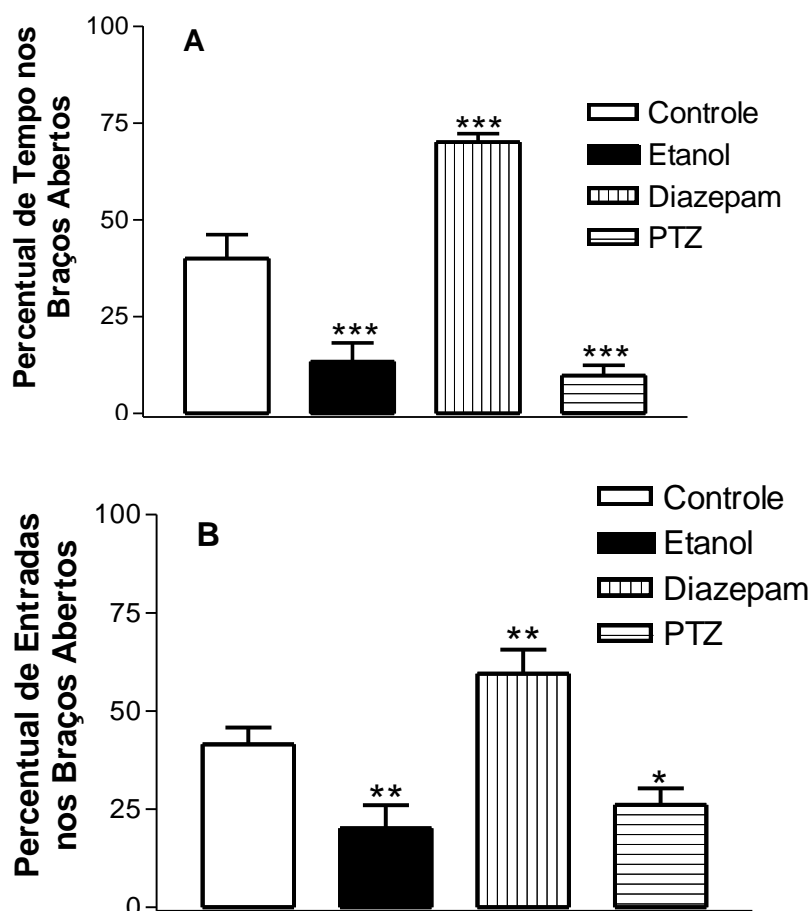


Figura 27. Em A está representado o percentual de tempo de permanência de animais controle e etanol nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado, enquanto em B está representado o percentual de entradas dos dois grupos nos braços abertos do aparelho. Os dados estão expressos como a Média \pm EPM (n=10 animais por grupo). (One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

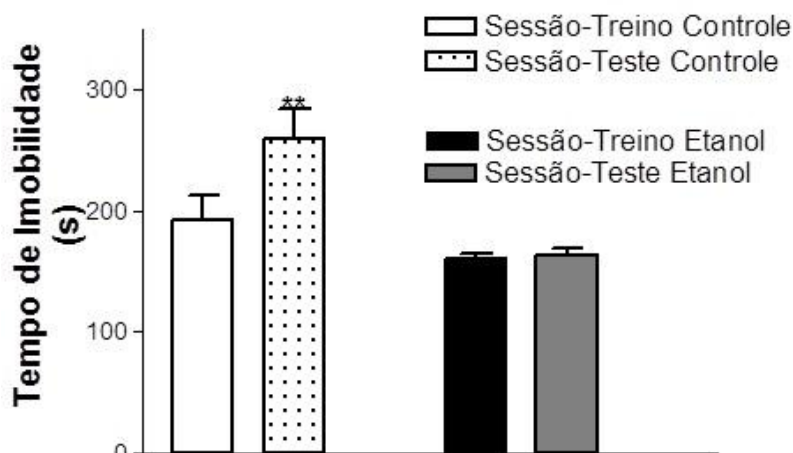


Figura 28. Tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado. Os dados estão expressos como a Média \pm EPM. (*) Estatisticamente diferente ao tempo de imobilidade obtido durante a sessão treino, ** P < 0,01. Os dados estão expressos como a Média \pm EPM (C=10 e EtOH=12). (Teste “t” de Student, sessão x sessão teste para cada grupo experimental)

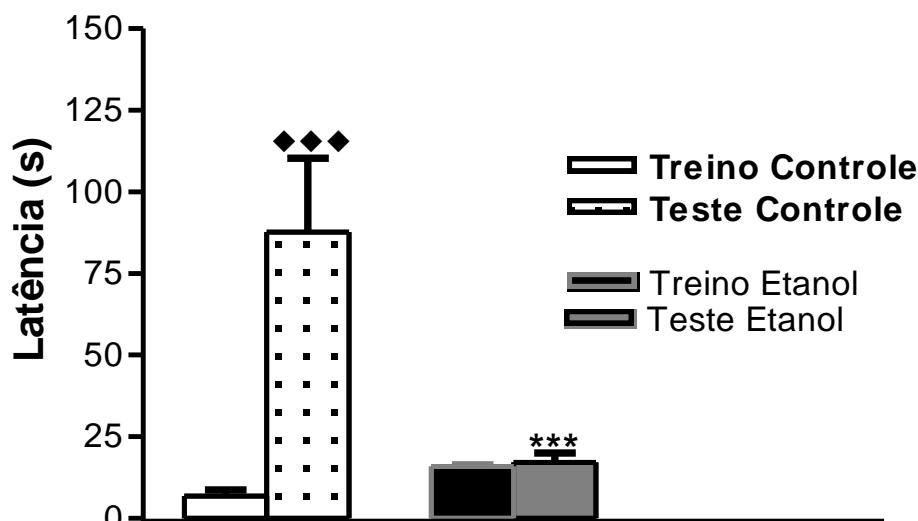


Figura 29. Tempo de Latência para a descida da Plataforma no Teste de Esquiva passiva utilizado para avaliar aquisição da memória. Os dados estão expressos como a média ± EPM de animais por grupo experimental.

(*) Estatisticamente diferente da média do grupo controle sessão teste, *** $P < 0,001$.
 (♦) Estatisticamente diferente da média do grupo controle sessão treino, ♦♦♦ $P < 0,001$.
 (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

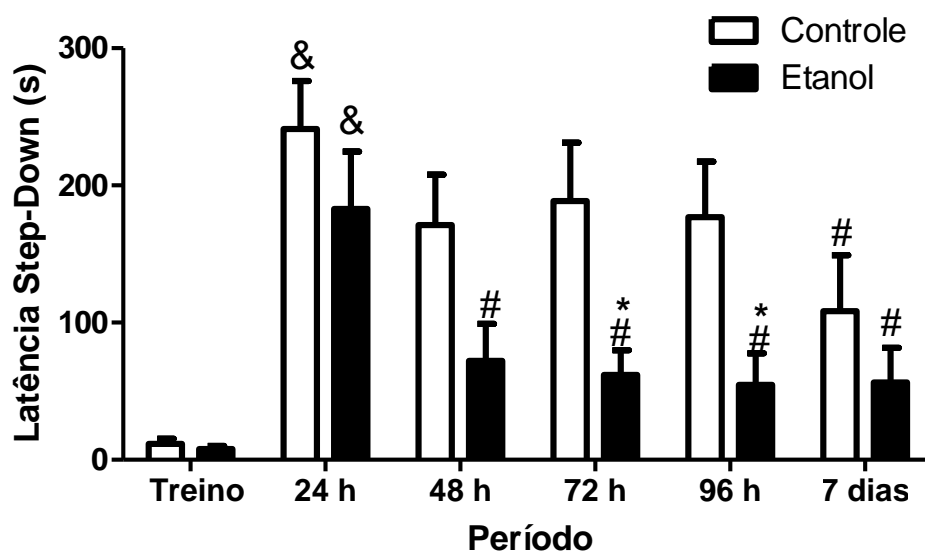


Figura 30. Tempo de Latência para a descida da Plataforma no Teste de Esquiva passiva utilizado para avaliar a retenção da memória. Os dados estão expressos como a média ± EPM da latência de 10 animais por grupo. (&) Estatisticamente diferente da média da sessão treino do respectivo grupo, & $P < 0,001$. (*) Estatisticamente diferente da média do grupo controle, relativamente ao mesmo tempo de avaliação, * $P < 0,05$. (#) Estatisticamente diferente da média apresentada pelo grupo em questão na avaliação de 24 h, # $P < 0,05$. (Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

6. Discussão

Além das marcantes alterações morfológicas, a exposição ambiental à agentes com potencial neuroembriotóxico tem sido implicada à etiologia de inúmeros distúrbios neuropsiquiátricos que se desenvolvem na fase adulta, tais como transtorno de humor, epilepsias, pre-disposição ao abuso de álcool e drogas, esquizofrenia, entre outros (Nadarajah et al., 2003; Miller, 2006; Mooney & Miller, 2009; Coffey et al., 2013). Os efeitos crônicos do consumo de etanol durante a gestação são bem descritos desde o início da década de 1970, caracterizando a SAF, que pode ser fidedignamente reproduzida em modelos animais através de protocolos crônicos de alcoolização. O risco do consumo de etanol na gestação esteve associado, por várias décadas, apenas ao hábito compulsivo e ininterrupto característico de mulheres alcoólatras (Egeland et al., 1995; Olsen & Tuntiseranee, 1995; Koren et al., 1996; McGann & Spangler, 1997; Corrêa et al., 2000). Durante as décadas de 1980 e 1990 várias instituições clínicas e científicas descreveram o consumo de pequenas doses de etanol durante a gestação como inofensivo ou não se manifestaram a respeito (McGann & Spangler, 1997; Corrêa et al., 2000; Mukherjee et al., 2005; Caetano et al., 2006).

No entanto, a partir do início da década 2000 o conjunto de distúrbios comportamentais e neurocognitivos provocados por baixas doses, ou consumo esporádico abusivo de etanol, passou a ser descrito e diagnosticado como uma condição clínica particular, denominada de Desordem do Espectro da Síndrome Alcoólica Fetal (Mukherjee et al., 2005; Caetano et al., 2006; Caldwell, et al., 2008). Mediante a este novo paradigma sobre os efeitos do etanol na gestação, um número crescente de trabalhos vêm descrevendo várias alterações comportamentais e cognitivas induzidas por baixas doses de etanol ao longo da gestação (ou por intoxicação aguda com doses intermediárias).

As evidências destes trabalhos conduzem para algumas premissas estaremcedoras, tais como o risco para o conceito desenvolver distúrbios neurocognitivos com a exposição à apenas uma dose de álcool no início da gestação (Mukherjee et al., 2005; Caldwell, et al., 2008; Ignacio et al., 2014). Outras inferências a partir dos estudos agudos com etanol gestacional, são a vinculação da data de exposição ao etanol com o espectro de alterações neuromorfológicas e comportamentais infligidas à prole, e a possibilidade de elaboração de modelos animais reprodutíveis para o estudo das consequências da DESAF (Sulik & Johnston, 1983; Ashwell & Zhang, 1996; Dunty et al., 2002; Livy et al., 2003; Ferreira et al., 2004; Heaton et al., 2004; Aversí-Ferreira et al., 2006; Miller, 2007; Mooney & Miller, 2007; Mooney & Varlinskaya, 2011; Varlinskaya & Mooney, 2014).

A complexidade dos eventos transcorridos durante a neuroembriogênese torna o sistema neural muito susceptível à agentes tóxicos durante a fase de desenvolvimento (Miller, 1997; Panhuysen et al., 2004; Suter et al., 2007; Coffey et al., 2013; Agila et al., 2014; Caviness Jr. et al., 2009). A formação e a estruturação do sistema neural nos vertebrados desenvolve-se a partir de um complexo conjunto de eventos interligados que abrange a produção de diversos tipos de células gliais e neuroniais, em posição e estágio definidos, em quantidades precisas e que estabelecem conexões apropriadas durante o processo de neuroembriogênese. A integridade do período de desenvolvimento das diversas redes neurais presentes no encéfalo consiste num dos fatores determinantes no estabelecimento dos padrões comportamentais e respostas operantes presentes no indivíduo adulto (Martinez et al., 1991; Takahashi et al., 1996; Lewis, 1998; Nakagawa et al., 1999; Perron & Harris, 2000; Caviness Jr. et al., 2009; Poon et al., 2010; Joksimovic et al., 2012; Aguila et al., 2014).

Considerando todo cenário descrito acima, nós conjecturamos a possibilidade da exposição aguda ao etanol promover alterações no desenvolvimento do sistema serotoninérgico encefálico, e conseqüentemente, causar distúrbios relacionados à regulação

hidroeletrólítica, visto que no estágio embrionário em ratos grávidas ocorre intensa formação de neurônios serotoninérgicos. A existência de contundentes relatos na literatura de uma janela temporal de sensibilidade ao álcool por parte dos progenitores serotoninérgicos do mesencéfalo e do rombencéfalo, componentes de extrema importância na inibição do apetite ao sódio, ampara esta premissa. Adicionalmente, outros comportamentos podem estar alterados, e a avaliação de possíveis alterações em padrões comportamentais correlacionados translacionalmente com alguns dos distúrbios neurocognitivos presentes no DESAF também fazem parte do escopo deste trabalho.

Sendo que até o momento da elaboração final desta Tese não haviam relatados de trabalhos, nas principais bases de dados acadêmicos, avaliando o apetite ao sódio de animais expostos ao etanol durante a gestação. Embora, existam vários trabalhos demonstrando que o desenvolvimento do sistema serotoninérgico possui alta susceptibilidade aos efeitos do etanol. Especialmente quando a exposição gestacional ao etanol ocorre no período compreendido entre E₁₂ e E₁₅, que se estabelece como uma etapa de extrema vulnerabilidade para os precursores serotoninérgicos. Este tipo de insulto acarreta, posteriormente no encéfalo adulto, redução da produção e da atividade da serotonina, culminando em disfunções facilmente detectáveis na fase adulta, como comportamento relacionado à ansiedade e déficit de memória (Gothoni & Ahtee, 1980; Tajuddin & Druse, 1988; Druse et al., 1991; Heinz et al., 2001; Sari et al., 2001; Tajuddin & Druse, 2001; Hofmann et al., 2002; Sari & Zhou, 2004; Kim et al., 2005; Zhou et al., 2005; Ohta et al., 2010)

Camundongos que consomem pequenas quantidades de álcool (2,8 % do total de calorias da dieta) a partir de E₈ até E₁₅ geram ninhadas que apresentam retardo na migração e no desenvolvimento de neurônios 5-HT, além de defeitos nas projeções serotoninérgicas que partem do mesencéfalo para o prosencéfalo (Zhuo et al., 2001, 2002 e 2005). A aplicação gestacional de 6 g/kg de etanol em E₇ ou E₈ promove nos embriões de camundongos menor marcação de neurônios serotoninérgicos no DRN, quando os encéfalos dos embriões são avaliados em E₁₄ (Schambra et al., 1989). Ratos adultos, expostos de forma sub-aguda ou aguda ao etanol no período embrionário, também apresentam no DRN, redução do número de neurônios serotoninérgicos e menor expressão da enzima triptofano hidroxilase (Druse et al., 1991; Kim et al., 2005; Ohta et al., 2010).

Visto que as vias serotoninérgicas, que se originam no mesencéfalo e no rombencéfalo, possuem participação determinante na modulação da ingestão e excreção de sódio (Reis et al., 1994; Menani & Johnson, 1995 e 1996; Cavalcante-Lima et al., 2005; Reis, 2007; Menani et al., 2014), e o seu desenvolvimento possui alta susceptibilidade aos efeitos de xenobióticos como o etanol (Schambra et al., 1989; Druse et al., 1991; Kim et al., 2005; Zhou et al., 2001, 2002 e 2005; Ohta et al., 2010); intentamos utilizar um modelo de alcoolização gestacional agudo, que intercedesse no período de maior produção de neuroblastos serotoninérgicos, e se correlaciona-se translacionalmente a um contexto pernicioso de ingestão alcoólica esporádica na gravidez, para então, na fase adulta avaliarmos o apetite ao sódio e outros parâmetros comportamentais da prole.

Diante das correlações mencionadas acima, avaliamos a ingestão basal de sódio dos animais adultos, que foram submetidos ao tratamento agudo com etanol na vida intra-uterina. Não houve diferença no consumo de solução salina 0,3 M entre o grupo controle e etanol. Como as principais vias modulatórias que coordenam a quantidade de sódio ingerida partem de neurônios serotoninérgicos do DRN e do NPBL, estes resultados ilustram apenas que não devem existir lesões extensas no DRN da prole alcoolizada, caso existam. Pois, em animais com lesão ibotênica ou excitotóxica do DRN ocorre aumento tanto da ingestão induzida como da ingestão basal de sódio (Cavalcante-Lima et al., 2005a e 2005b; Reis et al., 2007). Enquanto que a lesão no NPBL, ou bloqueio farmacológico dos receptores serotoninérgicos neste núcleo, promovem aumento do consumo induzido de sódio, mas não alteram a ingestão

espontânea basal de sódio (Ohman & Johnson, 1986 e 1989; Edwards & Johnson, 1991; Menani et al., 2014). Lesões eletrolíticas ou a excisão cirúrgicas da AP, outra estrutura do tronco cerebral que emite projeções serotoninérgicas e participa do controle inibitório do apetite ao sódio, também promovem aumento do consumo não induzido de salina hipertônica (Contreras & Stetson, 1981; Curtis et al., 1996 e 1999).

Este resultado também nos permite inferir que o protocolo de alcoolização não promoveu depleção e/ou apetite ao sódio nas ratas grávidas. Pois fatores que induzem elevação da ingestão de sódio por parte da fêmea grávida, determinam alterações permanentes no apetite ao sódio de seus descendentes, que apresentam incremento da ingestão basal e induzida de sódio (Leshem, 1999; Arguelles et al., 2000, Perillán et al., 2012). De fato o teor de sódio na dieta e/ou perturbações na excreção de sódio durante o período gestacional podem modular a expressão do SRAA dos animais adultos (Leshem, 1999; Perillan et al., 2008).

Após verificarmos que o tratamento gestacional com etanol não aumenta a ingestão espontânea de cloreto de sódio, efetuamos a avaliação do consumo induzido de sódio. Para este objetivo, utilizamos uma variação do modelo FUROCAP modificado (Mecawi et al., em preparação), adaptado em nosso laboratório. Isoladamente, tanto a dieta pobre em sódio (< 0,1%) por quatro dias, quanto a administração aguda de FUROCAP (furosemida 10 mg/kg s.c; captopril 5 mg/kg s.c.) são capazes de induzir preferência sódio (Thunhorst & Johnson, 1994; Mecawi et al., 2013). Nós utilizamos a associação destes dois protocolos como modelo natriorexigênico, devido a intensidade e duração da natriofilia gerada no modelo adaptado (Mecawi et al., em preparação). Em função destas características, da aplicação este protocolo, poderíamos detectar diferenças mais tênues e/ou tardias no padrão de consumo de salina dos animais do grupo etanol.

Comparativamente ao grupo controle, os animais do grupo etanol apresentaram maior consumo acumulativo de salina hipertônica e de ingestão proporcional de sódio, após cinco horas da oferta dos dois fluidos. Vinte e quatro horas após o oferecimento das garrafas com água ou solução salina os animais do grupo etanol continuaram a apresentar este mesmo padrão de consumo. Nos animais controle a associação de dieta pobre em sódio com a utilização do protocolo FUROCAP promove, após a apresentação das soluções, uma rápida e proeminente ingestão de salina hipertônica, e induz apetite ao sódio até o período de cinco horas de avaliação. A partir deste ponto de avaliação, a o consumo proporcional e absoluto de sódio é significativamente reduzido. No que diz respeito ao consumo de água, não foram observadas diferenças na ingestão entre os indivíduos dos grupos controle e etanol nas vinte e quatro horas que se seguiram após a apresentação dos fluidos.

Diante da ingestão aumentada de salina hipertônica apresentada pelos animais tratados na vida intrauterina com álcool, nos dedicamos a investigar a possibilidade destes animais responderem inapropriadamente ao desafio homeostático, gerado pelo período de dieta pobre em sódio. Sendo assim, o tratamento gestacional com álcool poderia ter determinado nos animais problemas associados aos mecanismos de regulação da pressão/volemia, bem como alterações morfológicas e/ou funcionais nos túbulos renais. Este fato determinaria desvios nos parâmetros hemodinâmicos dos animais, que estimulariam o consumo compensatório de salina. O período de quatro dias de dieta hipossódica é capaz de estimular a ativação do SRA e induzir apetite ao sódio, promovendo pequena redução significativa no hematócrito e na pressão arterial média, porém dentro do intervalo de valores fisiológicos, relativamente ao período pré-dieta (Mecawi et al., 2013). Ainda neste protocolo, o ritmo cardíaco e a concentração plasmática de sódio não sofrem modificações significativas, enquanto o volume urinário e a concentração de sódio na urina diminuem gradualmente durante o ensaio, comparativamente aos valores de animais alimentados com dieta normossódica (Mecawi et al., 2013).

Efetivamente a hipotensão isoladamente é capaz de induzir apetite ao sódio, e este efeito é independente das ações centrais da ANGI. Thornton e co-autores (1995) demonstram que o bloqueio com losartan (icv) dos receptores AT1 encefálicos, não reduz a ingestão de salina induzida pela administração intravenosa de bloqueador ganglionar pentonium, que induz apetite ao sódio em função de seu efeito hipotensor. O apetite ao sódio induzido pela administração subcutânea de furosemida mais captopril é influenciado pela aferência referente ao tônus vascular e pode ser modulado por alterações na pressão arterial. A injeção intravenosa do agente vasoconstritor fenilefrina, diminui a intensidade do consumo de sódio, sem alterar a ingestão de água, deflagrados por este tratamento. Em contrapartida, o agente vasodilatador minoxidil aumenta a ingestão de sódio neste modelo (Thunhorston & Johnson, 1994).

Resultados de diferentes autores em modelos animais que utilizam a insuflação de um balão colocado na junção da veia cava cranial com o átrio direito, para estimular os receptores de baixa pressão atriais, corroboram estas afirmações. O balão é insulfado e assim reduz o apetite ao sódio, em diversos paradigmas, incluindo o FUROCAP (Kaufman, 1984; Toth et al., 1987; De Gobbi et al., 2008). Neste paradigma experimental, o estiramento da parede atrial, através do insuflamento do balão inserido no átrio direito, impede a ingestão rápida de sódio vista no teste, reduz o consumo total salina sem alterar a ingestão de água, e diminui a expressão de Fos na lâmina terminal e aumenta no NPBL, (De Gobbi et al., 2008).

Por tanto, possíveis problemas na regulação da pressão/natremia resultariam em maior consumo de salina na tentativa de restabelecer estes parâmetros, o que poderia estar relacionado ao consumo tardio aumentado que os animais do grupo etanol apresentaram no protocolo. Caso presentes, isoladamente ou associados, estes distúrbios poderiam incidir nos animais distúrbios de regulação hemodinâmica, como por exemplo dificuldade em concentrar a urina sob condições de redução do aporte de sódio, conseqüentemente gerando hiponatremia e hipovolemia; que em associação se constituem em potentes estímulos natriorexigêncios (Thunhorst & Jonhosen, 1994; Thunhorst et al., 1994; Thornoton et al., 1995; Fitzsimons, 1998, De Luca Jr. et al., 2002, De Gobbi et al., 2008). Para investigar esta possibilidade, submetemos um novo pool de animais, controle e etanol, à dieta hipossódica, com o intuito de aferir os principais parâmetros hemodinâmicos e renais após quatro dias completos de alimentação pobre em sódio.

Quando comparamos as médias de pressão sistólica dos grupos após o período de dieta hipossódica não existem diferenças estatisticamente detectáveis. Para ambos os grupos, também não foram observadas diferenças na pressão sistólica quando confrontados os valores imediatamente antes do início da dieta e após quatro dias. O hematócrito ao final do período de quatro dias de alimentação pobre em sódio não diferiu entre os dois grupos, assim como variação do peso não foi significativa entre os grupos. Como mecanismo de adaptação à redução de sódio no alimento (Mecawi et al., 2013), o volume urinário e a concentração urinária de sódio foram significativamente reduzidos durante o período de alimentação pobre em sódio, nos dois grupos. Ainda sobre estes dois parâmetros, não foram observadas diferenças entre os grupos durante todo o período de experimento, incluindo os períodos de avaliações após a aplicação de furosemida e captopril.

Transcorridos quatro dias de dieta hipossódica não foram detectadas diferenças entre o grupo controle e etanol na concentração de creatinina plasmática e urinária, e conseqüentemente na taxa de filtração glomerular. As concentrações de potássio e sódio no plasma entre os dois grupos também não diferiram. Apesar de ter ocorrido perda de peso, nos dois grupos, ao final do período da dieta hipossódica, esta redução não foi significativa. Em conjunto, estes resultados sugerem que o consumo sustentado de solução salina dos animais do grupo etanol não está vinculado à alterações na pressão, na volemia, na natremia e natriuerese, importantes sinais aferentes que possuem a capacidade de influenciar os

comportamentos ingestivos (Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues et al., 2004). Partindo desta premissa, o comportamento ingestivo observado no protocolo FUROCAP modificado, possivelmente, teria sido o resultado de interferências do etanol no desenvolvimento, de um ou mais componentes, do circuito neuroendócrino que regula o apetite ao sódio.

Em sequência, delianecemos uma bateria de experimentos para descrever nos animais etanol o padrão de ativação neural das principais áreas encefálicas implicadas na geração e inibição do apetite ao sódio, utilizando-se para isto a detecção do produto protéico do protooncogene c-Fos (Proteína Fos). O gene c-Fos é um marcador de ativação neuronal amplamente utilizado, pois tem sua transcrição rapidamente iniciada após estímulo apropriado (90 min). A técnica de detecção imunohistoquímica da proteína Fos é uma das principais ferramentas metodológicas utilizadas no mapeamento de vias neuronais e extremamente útil no estudo simultâneo do comportamento de diferentes populações de neurônios, que combinada com outras técnicas de marcação, permite evidenciar sub-populações de neurônios a partir de seu conteúdo bioquímico e/ou conexões anatômicas (Priestley, 1987; Hoffman et al., 1994; Hughes & Dragunow, 1995). Assim, por meio da expressão de expressão de Fos e da dupla marcação de Fos+OT e Fos+Tirosina Hidroxilase tipo 2, observamos como a dieta pobre em sódio associada com o estímulo diurético/natriurético afetava grupamentos neuronais específicos dos animais objeto deste estudo.

Avaliando a ativação neuronal das áreas cerebrais envolvidas com a geração e a modulação do apetite ao sódio, nossos resultados demonstram que o tratamento agudo com etanol promoveu alterações no padrão de resposta neuronal frente a ingestão induzida de sódio. Somando-se a esta conclusão, podemos ainda conjecturar que o consumo exacerbado dos animais etanol não se deve à alterações na sensibilidade dos neurônios proencefálicos envolvidos na natriorexigência, visto que não houveram diferenças na imunoreatividade entre os grupos na condição basal e na condição privada. Nos grupos controle e etanol a imunoreatividade para Fos nas estruturas da lâmina terminal dos animais depletados e que não consumiram salina ocorreu de forma similar ao observados por outros autores usando FUROCAP, diálise peritoneal ou infusão de ANG II (Vivas et al., 1995; Mckinley et al., 1995; Pastuskovas & Vivas, 1997; Franchini & Vivas, 1999). Caracteristicamente, a depleção de sódio produz intensa ativação do OVLT e do SFO (áreas da lâmina terminal que possuem atividade osmorreceptora intrínseca). Sendo que durante a fase de consumo é possível notar uma redução do número de células Fos-ir, especialmente no OVLT onde o padrão de imunoreatividade possui uma relação bem definida com a intensidade do estímulo osmótico (Vivas et al., 1995; Pastuskovas & Vivas, 1997 Bourque, 2008).

Alternativamente, na condição de privação não observamos, em nenhum dos grupos, elevação de células ir-Fos no MnPO. Este núcleo que também é uma estrutura da lâmina terminal sensível aos efeitos da ANG II, possui participação na indução do apetite ao sódio, visto que lesões na parte ventral do MnPO reduzem a ingestão induzida de sódio (Fitts et al., 1990), mas seu papel mais incisivo na homeostase hidroeletrólítica é como estação de retransmissão e integração (Fitzsimons, 1998; Mckinley et al., 1999; Antunes-Rodrigues et al., 2004, Geerling & Loewy, 2008). Tipicamente a imunoreatividade para a proteína Fos no MnPO é aumentada na condição de depleção seguida de ingestão de sódio, não havendo elevação da expressão de Fos quando os animais são depletados e privados do consumo de salina (Franchini & Vivas, 1999). Nossos resultados de imunoreatividade no MnPO em ambos os grupos foram similares a este padrão descrito.

Em consonância com este padrão de resposta, Tremblay e colaboradores (2010) demonstraram no MnPO a existência de uma extensa população de neurônios que aumentam a frequência de disparos quando a ocorre elevação da osmolalidade do meio, especificamente em função da $[Na^+]$, e hiperpolarização em decorrência da queda da concentração de sódio. Estes autores demonstraram a capacidade dos neurônios do MnPO identificarem modificações

na $[Na^+]$ do meio extracelular, se deve a presença de canais Nax expressos peremptoriamente em neurônios (Tremblay et al., 2010). Neurônios magnocelulares do SON também demonstram estas mesmas propriedades de despolarização, em resposta às variações da osmolalidade extracelular, devido a presença de canais mecanossensíveis do tipo TRPV, que se abrem ou se fecham em resposta à hiperosmolalidade e hiposmolalidade, respectivamente (Bourque et al., 1994, 1998 e 2008).

Embora não tenha ocorrido diferenças entre os grupos na condição basal e de privação, quando analisamos os dados dos animais que consumiram solução salina, a expressão de Fos apresentava significativa mais elevada no SFO e no OVLT dos animais do grupo etanol. Tanto a atividade inibitória das vias que partem do tronco cerebral como a própria hipertonicidade do LEC diminuem a atividade elétrica e a expressão de Fos nos CVOs prosencefálicos (Franchini & Vivas, 1999; Menani et al., 2004; Noda & Hiyama, 2005; Ciura & Bourque, 2006; Shimizu et al., 2006; Reis, 2007; Bourque, 2008). Experimentalmente a infusão de salina hipertônica *icv* em animais depletados sem acesso à salina reduz Fos-ir (Vivas et al., 1995). Adicionalmente, a ativação do PVN e do SON, que promovem a liberação de OT, e ativação das vias serotoninérgicas presentes no tronco cerebral, reduzem a atividade dos centros natriorexigênicos, resposta que pode ser observada pela redução da expressão de Fos no SFO e OVLT (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Reis, 2007; Geerling & Loewy, 2008; Menani et al., 2014). A resposta esperada após o consumo de salina, em animais depletados, é a diminuição da imunoreatividade para Fos nos CVOs do procérebro (Franchini & Vivas, 1999).

A formação de conexões recíprocas entre as estruturas da lâmina terminal com outros centros que participam da modulação das respostas desencadeadas pelos desafios osmoelétricos, principalmente com os núcleos hipotalâmicos PVN e SON, e com vários núcleos do tronco cerebral, é a base da estruturação do morfofuncional do circuito neuroendócrino que controla a ingestão salina. Referentemente ao comportamento de saciedade ao sódio, o PVN e SON possuem importante participação, que envolve a produção e secreção de OT. Os neurônios destes núcleos são ativados por projeções diretas do SFO, MnPO e do OVLT (McCann et al., 1994; Stricker & Verbalis, 1996; Chriguer et al., 2001; Antunes-Rodrigues, et al., 2004), além de aumentarem a frequência de disparo e a liberação de OT em resposta ao aumento da osmolaridade do LEC (Bourque et al., 1994 e 1998; Hussy et al., 2000; Yuan et al., 2010). A ingestão ou a infusão de salina hipertônica promove o aumento da expressão de Fos no SON e no PVN, e elevação dos níveis plasmáticos de OT (Hochstenbach & Ciriello, 1996; Godino et al., 2010), mas quando a região AV3V é lesionada ocorre redução de neurônios Fos-ir em resposta a infusão endovenosa de salina hipertônica (Xu & Herbert, 1996) e redução dos níveis de OT liberada no plasma após a infusão de salina hipertônica no átrio direito (Negoro et al., 1988).

Existe no SON e no PVN uma distribuição topográfica dos neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos muito bem documentada e descrita. Os neurônios supra-ópticos produtores de OT concentram-se na porção antero-dorsal e os vasopressinérgicos na porção postero-ventral deste núcleo. O PVN é composto por duas subpopulações de neurônios, os parvocelulares e os magnocelulares. Os neurônios parvocelulares possuem pericários menores e concentram-se na região medial do núcleo, mais próximos ao terceiro ventrículo (Van Den Pol, 1986). Além de produzirem OT e AVP, sintetizam vários hormônios reguladores hipofisários e também estão associados ao controle de diversas funções autonômicas, por meio de conexões com áreas rombencefálicas (Cechetto & Saper, 1998; Stocker et al., 2005). Os neurônios magnocelulares distribuem principalmente na porção lateral do PVN, e possuem projeções para a hipófise posterior, sendo os principais responsáveis pela síntese e liberação de AVP e OT, tanto na circulação sistêmica bem como no próprio microambiente neuronal.

Neurônios ocitocinérgicos também podem ser encontrados na porção periventricular do PVN (Pow & Morris, 1989; Bergquist & Ludwig, 2008).

Em animais depletados sem acesso a solução salina a imunorreatividade para proteína Fos no SON e porções magnocelulares do PVN encontra-se reduzida (Franchini & Vivas, 1999). Este padrão foi observado nos dois grupos experimentais. Em função da ingestão de salina e elevação da tonicidade do LEC ocorre aumento da expressão de Fos no SON e no PVN, especialmente das porções magnocelulares (Franchini & Vivas, 1999; Geerling & Loewy, 2008; Buorque, 2008). Nossos resultados mostram que os animais submetidos ao tratamento com etanol no período pré-natal possuem menor ativação do SON, das porções magnocelulares do PVN (PaMM, PaML) e da porção PaPO durante a fase consumatória de salina, comparativamente ao controle na mesma condição. A dupla marcação para Fos+OT também foi menor no grupo etanol em todas as porções do PVN e no SON. Estes resultados podem tanto representar uma redução da capacidade funcional intrínseca deste sistema, como também menor ativação das vias serotoninérgicas que estimulam a liberação de OT nestas regiões hipotalâmicas.

Independentemente da condição de saciedade, o sistema ocitocinérgico hipotalâmico é ativado por sinais hiperosmóticos (Godino et al., 2007; Vivas et al., 2013), tanto por meio da integração sensorial com os CVOs, como por ativação neuronal direta em resposta à hipertonidade do LEC (Bourque et al., 1994 e 1998; Hussy et al., 2000; Yuan et al., 2010). Embora a atividade do PVN seja modulada por diferentes sistemas de neurotransmissores, que se projetam para esta área a partir de diversas estruturas do SNC (Complexo Estendido da Amígdala, Bulbo, aferência vagal, LC, NPBL, DRN, NTS), a liberação de OT envolvendo a inibição do apetite ao sódio está intrinsecamente ligada à atividade dos neurônios serotoninérgicos ativados durante a ingestão de salina (Franchini et al., 2002; Godino et al., 2007; Reis, 2007; Villa et al., 2007; Margaratho et al., 2008; Vivas et al., 2013). Muitas fibras do DRN se projetam para os neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN, sendo que a proporção de fibras na porção magno celular é um pouco menor e se concentram preferencialmente onde há concentração de neurônios ocitocinérgicos (Sawchenko & Sawanko, 1983). De fato quando os receptores 5-HT_{1A} localizados no PVN são ativados por aplicação de 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}) ou serotonina, diretamente neste núcleo, a ingestão de NaCl 0,3 M em animais depletados é reduzida. E este efeito pode ser revertido por antagonistas seletivo dos receptores 5-HT_{1A} (Villa et al., 2007). Evidências morfofisiológicas reiteram este modo de ação confluyente entre o sistema ocitocinérgico e vias serotoninérgicas que se projetam para o diencéfalo durante a ingestão de sódio. Através da dupla-marcação para Fos com o traçador retrogrado Fluogold, é possível detectar que durante o consumo de sódio o DRN e o NPBL ativam o PVN (Badauê-Passos et al., 2007; Godino et al., 2010).

Nesse sentido, a redução do número de células Fos-ir com dupla marcação para OT no SON e PVN do grupo etanol estimulado, se correlaciona com os resultados obtidos na contagem de células Fos-positivas no DRN. A imunorreatividade para a proteína Fos e para Fos+TPH-2 encontrava-se reduzida nos animais controle e etanol em condições de privação ou basal, em relação aos animais estimulados do mesmo grupo. Ainda ocorreu redução da quantidade neurônios Fos-ir e Fos+THP-2 positivos. Estes resultados apresentam o padrão característico de expressão de Fos no DRN quando se avalia animais depletados com e sem acesso a salina, comparados com animais em condições basais (Franchini & Vivas, 1999, Vivas et al., 2013). Contudo, quando comparamos a média de neurônios Fos-positivos e com dupla marcação Fos+TPH-2, o animais do grupo etanol apresentaram um número significativamente menor destas células.

Nossos resultados referentes a avaliação de Fos e dupla marcação com OT e TPH-2 mostram, que durante a fase de consumo de sódio, a ativação dos sistemas serotoninérgico do DRN e ocitocinérgico hipotalâmico foi afetada pela exposição aguda com etanol na gestação.

Estes resultados estão em harmonia com nossa hipótese inicial, apoiada em dados da literatura que relatam que a administração de etanol no período de formação dos neuroblastos serotonérgicos, mesmo em pequenas doses, reduz a quantidade e/ou a atividade dos neurônios produtores de 5-HT (Schambra et al., 1989; Druse et al., 1991; Kim et al., 2005; Zhou et al., 2001, 2002 e 2005; Ohta et al., 2010). Fundamentamente nossos dados em conjunto mostram que as alterações na regulação hidroeletrólica presentes nos animais tratados com etanol ocorreram em função de alterações na ativação e/ou desenvolvimento dos neurônios serotonérgicos do DRN. Embora possam existir alterações na atividade de outros componentes neuroendócrinos efetivamente envolvidos na inibição do apetite ao sódio. Diferentes distúrbios alostáticos poderiam também estar implicados na etiologia das alterações no controle hidroeletrólítico apresentadas pelos animais do grupo etanol.

Em protocolos e agudos e sub-agudos de alcoolização gestacional, além dos efeitos sobre a migração e a maturação de neurônios, as ações neuroembriotóxicas do etanol incluem alterações na expressão e atividade de neurotransmissores e dos respectivos receptores. Podendo ocorrer infra ou supra-ativação de sistemas específicos, em função da quantidade de etanol, do período de exposição, da concentração plasmática máxima, da capacidade de detoxificação materna; do tempo máximo de etanol no plasma, entre outros fatores (Miller, 2006; Sathyan et al., 2007; Pandey et al., 2008; Caviness Jr. et al., 2009; Hicks et al., 2010).

A maior ativação no SFO e no OVLT poderiam, por exemplo, ser alterações primárias causadas pelo etanol, resultantes de maior densidade e/ou sensibilidade dos receptores AT1, ou ainda menor densidade e/ou sensibilidade de receptores serotonérgicos nestas áreas. Isto implicaria em respostas natriorexigênicas exacerbadas, e também desequilíbrio na integração recíproca, entre os circuitos neuroendócrino que ativam e modulam o apetite ao sódio, especialmente entre o SFO e DRN. Embora não tenha ocorrido diferenças entre o número de células Fos-ir no SFO e no OVLT entre animais etanol e controle sob condições de privação, a imunoreatividade à proteína Fos não reflete a intensidade da atividade celular, apenas o número de células ativadas. A administração de ANG II na artéria carótia ou diretamente no SFO ativa neurônios que se projetam para o DRN e diminuem a liberação de serotonina no SFO (Tanaka et al., 1998 e 2003), por tanto, maior atividade angiotensinérgica do SFO dos animais tratados poderia explicar a redução de células Fos-ir no DRN, e em consequência a redução da imunoreatividade para Fos+OT no SON e no PVN.

A exposição ao etanol poderia ter afetado também a formação e/ou a funcionalidade de neurônios serotonérgicos no NPBL, afetando assim a integração entre o DRN e o NPBL, acarretando assim redução da ativação no DRN e no PVN e SON. A comunicação bidirecional entre estes dois núcleos é essencial para o controle da excreção renal e da ingestão de sódio (Reis et al., 2007; Margatho et al., 2008). Através do NPBL é que as condições de volemia, concentração de sódio no trato gastrointestinal e informação gustatória são transmitidas ao DRN. Estes sinais aferentes chegam ao NTS e a AP, que então emitem fibras para o NPBL que processa a informação e a integra com várias outras estruturas do circuito alostático hidroeletrítico, incluindo o DRN (Daniels & Fluharty, 2004; Krause & Sakai, 2007; Margatho et al., 2008; Menani et al., 2014).

Dentre outras possíveis alterações, que isoladamente ou em associação, poderiam provocar o aumento da ingestão de sódio, associado à hipoativação serotonérgica e ocitocinérgica, vista na prole de ratas tratadas com etanol, estão déficits da detecção e/ou integração da informação aferente visceral que chega no NTS ou na AP, visto que lesões direcionadas nestas estruturas incrementam o consumo induzido de solução salina 1,8% (Contreras et al., 1981; Kobashi et al., 1993; Schreihofner et al., 1999; Lindemann, 2001). Eventuais danos corticais nos animais do grupo etanol somam-se às alterações caracteristicamente induzidas pela exposição embrionária ao álcool que poderiam influenciar no comportamento observado, especialmente no córtex cingulado.

Redução da densidade neuronal no córtex é relatada em ratos tratados com 3g/kg de etanol (3x a cada 8 h) no décimo segundo dia de vida intra-uterina em ratos (Ferreira et al., 2004; Aversi-Ferreira et al., 2004 e 2005). Kotkoskie (1989) e colaboradores utilizando uma única administração oral de 6g/kg de etanol do décimo quarto de observou menor densidade neuronal apenas no córtex frontal. Então, a redução do número de neurônios no córtex cingulado anterior poderia acarretar menor sensibilidade aos estímulos gustativos e incrementar o consumo de salina. O córtex cingulado anterior está associado ao componente aversivo de várias experiências sensoriais, incluindo ingestão alimentar, e atua modulando inúmeros comportamento. A estimulação elétrica desta área diminui o consumo de salina em ratos depletados por diálise peritoneal (Chiaravigilio, 1984), enquanto lesões eletrolíticas nesta área aumentam o consumo de salina hipertônica (2%) em protocolos de livre escolha (Grace, 1968).

Dentre todas estas alterações factíveis, relacionadas à embriotoxicidade aguda do etanol e o conjunto de nossos resultados, a redução do número e da atividade dos neurônios serotoninérgicos é a proposição mais eminente, em função da consubstanciação de fatores susceptíveis, dos resultados de outros trabalhos e dos nossos resultados com dupla marcação Fos-THP2. Os feitos agudos do etanol durante a gestação estão vinculados a diferentes janelas de sensibilidade por parte de várias estruturas neurais (Dunty et al., 2002; Heaton et al., 2004; Aversi-Ferreira et al., 2006; Mooney & Miller, 2002, 2007; Mooney & Varlinskaya, 2011; Varlinskaya & Mooney, 2014), e o desenvolvimento do sistema serotoninérgico possui elevada susceptibilidade aos efeitos agudos e sub-agudos desta exposição, devido à grande quantidade de neurônios formados, ao prolongado tempo para maturação destas células e a extensão das projeções formadas por estas (Tajuddin & Druse, 1988; Druse et al., 1991; Heinz et al., 2001; Sari et al., 2001; Tajuddin & Druse, 2001; Hofmann et al., 2002; Sari & Zhou, 2004; Kim et al., 2005; Zhou et al., 2005).

Assumindo então, que a hipoativação do DRN do grupo etanol durante a ingestão de salina, resulta de ações deletérias desta droga sobre o sistema serotoninérgico encefálico, partimos para avaliação de outros comportamentos que podem ser influenciados por este sistema. Em ratos, como em outros mamíferos, a maior parte dos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos localizam-se no tronco cerebral, especialmente no DRN, e inervam várias estruturas telencefálicas e diencefálicas, como córtex pré-frontal e o hipotálamo (Steinbusch, 1981; Azmitia, 1999; Heinz et al., 2001). Os neurônios 5-HT mesencefálicos e rombencefálicos que se projetam para o prosencéfalo participam do controle de diversas funções e comportamentos, incluindo regulação alimentar, comportamento sexual, regulação hormonal, sono, atividade visceral, memória, respostas de medo, recompensa, entre vários outros. Ressaltando-se que a maior parte da inervação serotoninérgica do prosencéfalo se origina nos núcleos mediano e dorsal da rafe mesencefálica. (Azmitia & Segal, 1978; Moore et al., 1978; Smits et al., 1978; Steinbusch, 1981; Barker et al., 1990; Lucki, 1998; Azmitia, 2007; Berg et al., 2009). Adicionalmente, a atividade descoordenada de várias vias serotoninérgicas está presente em muitos processos patológicos que afetam o comportamento, tais como ansiedade, síndrome do pânico, transtorno depressivo, comportamento compulsivo (Heinz et al., 2001; Graeff, 2004; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1996; Meneses & Liy-Salmeron, 2012).

Em mamíferos, antes de assumir o seu papel como um neurotransmissor no sistema neural integralmente formado, a 5-HT atua como agente regulador do desenvolvimento e da maturação neural, especialmente em virtude da capacidade que este neuromodulador apresenta de estimular as células gliais a liberarem fatores neurotróficos e sinaptogênicos como o polipeptídeo S-100 β e neurotrofinas (Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1990; Whitaker-Azmitia et al., 1990; Shemer et al., 1991; Ueda et al., 1993). Durante o desenvolvimento ontogênico a serotonina participa ativamente no controle de processos como proliferação

celular, migração celular, diferenciação neuronal, sinaptogênese e inibição da apoptose (Lauder et al., 1990; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1996; Azmitia, 2001). Como o sistema serotoninérgico encefálico está envolvido com várias respostas comportamentais e também ontogênicas (tanto na fase de vida intra-uterina como pós-natal), posteriormente aos experimentos de regulação hidroeletrolítica, e em função dos resultados obtidos, avaliamos o efeito do tratamento agudo com etanol sobre o desenvolvimento sensorio-motor e ponderal.

Os protocolos de avaliação do desenvolvimento ontogênico, ponderal e sensorio motor aqui utilizados são derivados dos modelos desenvolvidos por Fox (1965) e Smart & Dobbing (1971). Os testes preconizados por estes autores permitem identificar e diferenciar ações de substâncias embriotóxicas que afetam às grandes vias motoras, o sistema vestibular, a maturação corpórea, o desenvolvimento sensorial e a puberdade (Fox, 1965; Smart & Dobbing, 1971; Alder & Zbinden, 1977; Alberts, 1984; Gerrish & Alberts, 1995; Maurissen et al., 2003; Kreider & Blumberg, 2005; Wishaw & Kolb, 2005; Deiró et al., 2006). Os xenobióticos que afetam o desenvolvimento neuroembrionário podem promover tanto atraso como antecipação do padrão de surgimento dos parâmetros murinométricos, que são avaliados neste conjunto de testes. Sendo que as duas condições são atribuídas à eventos prejudiciais ao desenvolvimento ontogênico de roedores (West et al., 1986; Sobrian et al., 1990; Mello et al., 1998; Deiró et al., 2006). Por exemplo, a prole de ratas tratadas com cocaína na última semana de gestação ou início da lactação, além de microcefalia apresenta antecipação dos reflexos de sobressalto auditivo, de endireitamento postural e esquiva ao abismo. (Sobrian et al., 1990; Dow-Edwards, 1996). A exposição gestacional crônica às anfetaminas e cafeína, a partir da segunda semana de gestação, provoca retardo na erupção dos dentes incisivos e abertura dos olhos, e ainda antecipa o surgimento do reflexo de sobressalto auditivo (West et al., 1986; Dow-Edwards, 1996). Como o desenvolvimento ontogênico em roedores se completa até a segunda semana de vida pós-natal, quaisquer alterações no padrão cronológico de surgimento dos parâmetros murinométricos e dos reflexos sensorio-motores são indicativos de distúrbios na produção e/ou na atividade dos mediadores envolvidos no controle neurogênico da ontogênese (Alder & Zbinden, 1977; Kreider & Blumberg, 2005; Deiró et al., 2006)

A evolução do peso corporal não diferiu entre as ninhadas controle e etanol no período considerado, que foi desde o nascimento até os sessenta dias de vida. Os reflexos sensorio-motores também não foram afetados pela exposição intra-uterina ao etanol, o que sugere que o tratamento utilizado não afeta o desenvolvimento de componentes do sistemas vestibular, auditivo, proprioceptivo e o controle motor (Alder & Zbinden, 1977; Maurissen et al., 2003; Kreider & Blumberg, 2005; Wishaw & Kolb, 2005). Entretanto, todos os parâmetros murinométricos avaliados foram antecipados nas ninhadas oriundas de mães que receberam álcool no décimo quarto dia de gestação, exceto o período para a abertura vaginal. A abertura dos olhos, o desdobramento do pavilhão auricular e a erupção dos incisivos são processos que dependem de mecanismos de apoptose para que sejam concluídos, e estão cronologicamente vinculados a maturação das estrutura a que estão associados (Wishaw & Kolb, 2005). A antecipação pode ser resultado de falha no controle do programa apoptótico que permite que a fissura ocular se rompa, que a cartilagem auricular se desprenda e que o tecido dentário se projete para a cavidade oral (Alberts, 1984; Gerrish & Alberts, 1995; Maurissen et al., 2003; Kreider & Blumberg, 2005; Wishaw & Kolb, 2005).

No cérebro em formação, vários neurotransmissores possuem funções ligadas ao desenvolvimento que são completamente diferente das atividades que desempenham no cérebro adulto (Whitaker-Azmitia, 1991). Muitos atuam como agentes pro-mitóticos, sinalizadores ou reguladores de desenvolvimento. Todos os componentes dos sistema monaminérgico demonstram tais propriedades funcionais ontogênicas, incluindo a 5-HT e os receptores serotoninérgicos, que possuem padrões de distribuição bem distintos nas fases de

desenvolvimento e na fase adulta (Lauder, 1983; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1986; Whitaker-Azmitia, 1991; Shemer et al., 1991). Várias regiões do encéfalo apresentam durante a neuroembriogênese uma densidade muito mais elevada de alguns subtipos de receptores 5-HT, comparativamente a fase adulta, e ainda em períodos nos quais as sinapses não estão plenamente funcionais. Em muitas áreas cerebrais do embrião de ratos, camundongos e humanos; como o córtex frontal e o hipotálamo, observa-se uma quantidade extremamente elevada de receptores 5-HT no final da gestação, mas que ao final da maturação do encéfalo é reduzida significativamente nestas regiões (Uzbekov et al., 1979; Daval et al., 1987; Gross-Isseroff et al., 1990; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1990).

A antecipação dos parâmetros murinométricos de desenvolvimento corroboram a nossa hipótese inicial que associa o protocolo de alcoolização em E₁₄ com prejuízo nas funções dependentes da liberação de serotonina. A muito se reporta o papel que a serotonina possui durante o desenvolvimento ontogênico (Lauder, 1983; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1986; Azmitia, 2001). Em particular interesse para esta discussão, destaca-se o controle inibitório exercido por este mediador sobre os mecanismos apoptóticos (Azmitia, 2001). Ainda neste mesmo sentido, o uso durante a gestação de agonistas 5-HT e drogas que diminuem a receptação de serotonina tendem retardar o aparecimento destes marcadores em ratos e camundongos (Shuey et al., 1993; Deiró et al., 2008).

Evidentemente, que a antecipação na maturação dos marcadores de desenvolvimento ontogênico, provocadas pelo etanol, pode ser resultante de ações sobre outros sistemas de desenvolvimento e/ou inúmeras outras moléculas que participam do controle da maturação dos caracteres morfológicos avaliados. Entretanto, mesmo a aplicação de doses diárias de etanol no intervalo gestacional situado entre E₁₄ e E₁₈ não produz efeitos significativos na atividade de vários sistemas de neurotransmissores que possuem participação no controle do desenvolvimento, como por exemplo, dopaminérgico, glutamatérgico e colinérgico (Rathbun & Druse, 1985; Pardo et al., 1994; Sari et al., 2001), o que reduz a amplitude do contingente de possíveis mecanismos de interferência que justificariam estes resultados. Ainda, Molina e co-autores utilizando tramento agudo em E₈ com duas aplicações de etanol (2.8g/kg, i.p) observaram, neste mesmo modelo, atraso em todos os reflexos sensoriomotores e redução do peso da prole, ilustrando que nossos resultados não decorrentes mecanismos citotóxicos idiossincrático ao insulto gestacional com álcool. Outro fato notório neste trabalho é que na fase adulta os animais tratados com etanol apresentaram maior consumo espontâneo de álcool.

Manipulações farmacológicas envolvendo a liberação e a modulação dos receptores para 5-HT demonstram a importância da manutenção de níveis adequados desta molécula na ontogênese pré e pós-natal. A depleção de serotonina no período pré-natal em ratos, utilizando inibidores da Triptofano Hidroxilase como o PCPA, causa maturação retardada dos parâmetros murinométricos e aumenta a proliferação celular nas áreas que as terminações serotoninérgicas se projetam (Lauder, 1986 e 1990). O tratamento gestacional ou no início da lactação com inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRSS) induz malformações do crânio em ratos e retarda o padrão de aparecimento dos reflexos sensório-motores. (Deiró et al., 2006 e 2008). O tratamento gestacional com 8-OHDPAT (agonista serotoninérgico seletivo dos receptores 5-HT_{1A}) promove retardo na maturação morfológica e atraso do surgimento dos reflexos sensório-motores na prole de ratos (Shuey et al., 1993).

Tanto a depleção como a inibição da receptação de serotonina no período pré-natal acarretam na fase adulta menor concentração de 5-HT no encéfalo (Mazer et al., 1999; Kostowsky & Krzascik, 2003). Efetivamente à exposição gestacional ao etanol também é capaz reduzir a formação e a atividade de neurônios 5-HT. Diversas evidências experimentais demonstram que exposição alcoólica no período pré-natal é capaz de induzir alterações bem definidas bioquimicamente em componentes do sistema no serotoninérgico cerebral. Neste mesmo sentido, vários resultados de trabalhos independentes, utilizando protocolos de

alcooolização diversos reportam diminuição da densidade de receptores 5-HT_{1A}, da concentração de 5-HT e de seu principal metabólito (ácido 5-hidroxi-indolacético) em diversas regiões do encéfalo de animais adultos filhos de fêmeas expostas ao tratamento gestacional com etanol sub-agudo ou agudo. Outras alterações incluem redução do número de neurônios serotoninérgicos TPH- imunorreativos no tronco cerebral, sendo que estes efeitos podem ser observados ainda na fase embrionária precoce, e se mantem em todas as etapas de desenvolvimento do animal persistindo até a fase adulta (Gothoni & Ahtee, 1980; Rathbun & Druse, 1985; Tajuddin & Druse, 1988; Druse et al., 1991; Maier et al., 1996; Zhou et al., 2002; Sari et al., 2001; Tajuddin & Druse, 2001; Sari & Zhou, 2004; Zhou et al., 2005; Ohta et al., 2010).

Diante do conceito e das informações explicitados no paragrafo anterior, aventamos a possibilidade do protocolo de alcooolização pré-natal utilizado, exacer danos irreversíveis em outros comportamentos coordenados, parcial ou integralmente, por vias serotoninérgicas. Utilizando-se para este objetivo modelos experimentais capazes de assinalar alterações na motricidade (Rota-Rod), no padrão comportamental (campo aberto e labirinto em cruz elevado) e/ou componente motivacional (preferência por sacarose e nado forçado) e memória (Step-Down). Na fase adulta nenhuma alteração na coordenação motora foi detectada no teste do Rota-Rod com os animais tratados com etanol. Bem como, o consumo de sacarose em protocolo de livre escolha não foi significativamente diferente relativamente aos animais do grupo controle. Como a redução do consumo de sacarose, sob diferentes condições, é indicativo de redução do componente hedônico do animal (Willner et al., 1987 e 1992; Wilner 2005), sugestivamente o tratamento com etanol não induziu anedonia nos animais avaliados em condições basais.

O teste do campo-aberto permite explorar tanto o componente motor quanto comportamental dos indivíduos avaliados na arena de experimento. Nesta abordagem experimental, geralmente, roedores apresentam um padrão de resposta categorizado denominado de tigmotatismo (Lister, 1990; Choleric et al., 2001; Carola et al., 2002; Prut & Belzung, 2003). Que consiste na tendência dos animais explorarem mais a periferia do aparato, caminhando próximo a parede e assim utilizar o contato das vibrissas para orientar-se, evitando cruzar o centro da arena. O aumento do tempo, bem como da locomoção na parte central são indicações de redução da ansiedade, enquanto que o contrário está associado a respostas relacionadas com a ansiedade (Choleric et al., 2001; Prut & Belzung, 2003). Neste ensaio não observamos diferenças, entre os grupos, no número total de quadrados percorridos e no tempo de exploração do aparelho, na produção de bolos fecais, assim como nos comportamentos de auto-limpeza e levantadas. Mas o número de quadros explorados no centro do campo aberto foi significativamente menor pelos animais do grupo etanol.

A utilização de arenas circulares para a realização deste ensaio permite avaliar a exploração do centro da arena, que se constitui numa condição de enfrentamento para o animal, pois o mesmo deve se abdicar de explorar as bordas onde existe a orientação espacial determinada pela parede do aparato (Carola et al., 2002). Caracteristicamente o uso de fármacos ansiolíticos benzodiazepínicos aumenta a exploração no centro, em doses não sedativas. Este efeito também é visto com drogas ansiolíticas não-benzodiazepínicas que possuem atividade serotoninérgica direta, como a buspirona, e indireta como a fluoxetina (Choleric et al., 2001; Prut & Belzung, 2003).

A exploração, aumentada ou reduzida, do centro do campo-aberto é um indício de baixa preditividade a cerca do status etológico do animal, pois pode ser gerada por alterações inespecíficas como por exemplo desorientação espacial e/ou atividade alucinógena (Thiel et al., 1999; Prut & Belzung, 2003). Em decorrência disto, realizamos um ensaio mais específico e com maior sensibilidade para avaliar o comportamento exploratório dos animais das ninhadas tratadas com etanol durante a vida intra-uterina, o teste do teste do labirinto em cruz-

elavado, que é um dos mais comumente modelos utilizados para avaliação do comportamento relacionado à ansiedade e de fármacos com capacidade de reduzir a expressão das respostas associadas a esta condição (Pellow et al., 1985; Liester, 1987; Dawson & Tricklebank, 1995; Rodgers et al., 1997, ramos et al., 1998; Graeff, & Zangrossi, 2002; Ho et al., 2002)

Quando expostos a novos ambientes, murédeos tipicamente apresentam o conflito entre exploração e esquiva ao ambiente, sobrepondo-se a preferência por ambientes fechados em detrimento à atividade exploratória em locais abertos. O LCE baseia-se nesse padrão comportamental inato que ratos e camundongos possuem frente ao desafio gerado pela mudança de ambiente (neofobia), apresentando alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos (Pellow et al., 1985; Liester, 1987; Belzung & Le Pape, 1994; Rodgers et al., 1997, ramos et al., 1998; Belzung & Griebel, 2001; Ho et al., 2002; Bertoglio & Carobrez, 2005). Neste modelo o aumento da exploração dos braços abertos é considerado como indicador da redução do comportamento relacionado à ansiedade, mas outros parâmetros como redução do comportamento de freezing, produção de bolos fecais, tempo no centro do aparelho, mergulho de cabeça e levantadas aumentam a sensibilidade do teste quando são considerados. A buspirona, por exemplo, um ansiolítico não benzodiazepínico não aumenta a exploração dos braços abertos, mas promove elevação de vários parâmetros etológicos também indicativos de efeito ansiolítico como o mergulho de cabeça a partir do centro do labirinto (Moser, 1989; Gibrel et al., 1997).

No outro sentido do teste, a tendência natural do animal em explorar os braços fechados pode ser intensificada por tratamentos farmacológicos, modificações genômicas e epigenômicas, ou ainda, condições ambientais específicas que elevem o estado de reatividade ao estresse (Graeff, & Zangrossi, 2002; Ho et al., 2002; Cryan, & Mombereau, 2004). Como resultado da exposição aguda ao etanol os animais exibiram na fase adulta respostas comportamentais relacionadas à ansiedade no teste do labirinto em cruz. Vários outros autores utilizando exposição pré-natal alcoólica já demonstram aumento do comportamento associado à ansiedade em ratos e camundongos (Hall, 1994; Osborn et al., 1996; Heinz et al., 2001; Hofmann et al., 2002; Gabriel et al., 2006; Hellemans et al., 2008 e 2010; Durson et al., 2010, Ohta et al., 2010; Bocardo et al., 2012; Cullen et al., 2013).

Utilizando um protocolo de concentração crescente de etanol em dieta líquida (2% até 5%, w/v) a partir de E₁₀ até E₂₁, Zhou e colaboradores (2001) demonstram que o etanol prejudica a migração de neurônios serotoninérgicos para a rafe mesencefálica em formação, promovendo redução do número destes neurônios no DRN dos adultos. Ohta e colaboradores (2010), repintido este protocolo, demonstram que os ratos adultos apresentam comportamento relacionado à ansiedade e redução da quantidade de serotonina nos núcleos da rafe mesencefálica. E este padrão de alterações refletem umas das principais questões sobre exposição fetal aos insultos ambientais, o aumento à susceptibilidade para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos de início tardio.

Entretanto, apesar de muitos trabalhos relacionando ansiedade e exposição gestacional ao etanol utilizaram doses baixas de álcool, comumente se utilizam de protocolos de vários dias de tratamento. Uma quantidade extremamente limitada de trabalhos tem associado alterações comportamentais induzidas por tratamento gestacional agudo com etanol. Mooney & Varlinskaya (2011), demonstraram que duas aplicações de 2.3 g/Kg de etanol (i.p., 20% v/v) em E₁₂ promovem intensa redução nos parâmetros comportamentais utilizados para avaliar a interação social em ratos (preferência social, “play fighting”, ambulação, entre outros). Sendo possível detectar este tipo alteração no comportamento social ao longo de todas as fases de desenvolvimento dos animais. Este efeito é observado em ambos os sexos, embora mais intenso em machos na fase juvenil. Em outro trabalho, estas autoras verificaram que o mesmo protocolo de tratamento, quando realizado em E₁₅ também provoca redução da

interação social, mas que somente é observada na fase adulta e apenas nas fêmeas (Mooney & Varlinskaya, 2014).

Examinando os resultados obtidos no campo-aberto e LCE, em associação com os resultados de trabalhos recentes, que também utilizaram exposição pré-natal aguda, demonstram redução da interação social na prole de ratas tratadas com do álcool em E₁₂(Mooney & Varlinskaya, 2011; Varlinskaya & Mooney & 2014; Ignacio et al., 2014), nos propusemos a avaliar possíveis alterações motivacionais nos animais que foram tratados com etanol. Considerando também que o comportamento associado à ansiedade pode estar relacionado a etiologia de diferentes tipos de transtorno depressivo, ou ainda se apresentar como um sintoma no quadro clínico da maioria destes (Guimarães et al., 2005), torna-se patente a expectativa dos animais tratados apresentarem, sob condição de estresse, alterações comportamentais relacionadas à depressão. Para avaliar esta hipótese utilizamos o modelo do nado forçado.

Este modelo baseia-se na observação de que quando os ratos são expostos a água, depois de um período inicial caracterizado por intensa tentativa de fuga do recipiente (natação e escalada), diminuem consideravelmente a intensidade e apresentam imobilidade passiva (Porsolt et al., 1977; Armário et al., 1997; West & Weiss, 2005). Neste ensaio várias condições e drogas depressivas aumentam o tempo de imobilidade, enquanto o tratamento com antidepressivos diminui o tempo de imobilidade. A imobilidade, possivelmente, reflete déficits na resposta motivacional direcionada a fuga após o estresse, ou ainda o desenvolvimento de comportamento passivo, resultante da inibição das vias de que estimulam as respostas ativas destinadas ao enfrentamento do agente estressor (Porsolt et al., 1977).

Na metodologia utilizada para ratos, é necessário uma sessão de pré-exposição (sessão treino) para diminuir a latência e aumentar o tempo para a imobilidade na exposição subsequente (sessão teste). O tratamento agudo com etanol na vida intra-uterina não promoveu aumento do tempo de imobilidade. O grupo etanol apresentou, relativamente ao controle, redução do tempo de imobilidade, um padrão de resposta oposto ao consuetudinariamente apresentado por animais sensíveis ao estresse. Diante das proposições e implicações biológicas inerentes ao modelo (ativação psicomotora, adaptação ao estresse, aquisição de memória, etc) este resultado pode ser derivado de falhas na modulação da experiência aversiva, reatividade aumentada ao estresse, distúrbios associados ao mecanismos de aquisição da memória, e ainda a associação destes fatores.

De Pablo e co-autores (1988) demonstraram que exposições sucessivas de ratos ao teste do nado forçado aumentava o tempo de imobilidade, mesmo em animais tratados com imipramina (ISRS usado como controle positivo neste teste). Estes autores aventaram a hipótese do aprendizado e da memória influenciarem nos resultados deste modelo. Um ano mais tarde Borsini e co-autores demonstraram que entre outros fatores, drogas aminésicas como a escopolamina e anisomiasina, diminuem o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Dentro destas possibilidades levantadas por estes autores, nós realizamos o teste de esQUIVA-passiva com intuito de avaliar possíveis déficits de memória que pudessem se correlacionar com os resultados obtidos no teste do nado forçado.

O teste de esQUIVA passiva permite avaliar tanto a aquisição, quanto a retenção da memória, através de sucessivas recolocações do animal no aparelho, pois não sofre interferência de sessões prévias como outros modelos de estudo da memória. A retenção é um fenômeno que envolve ativação gênica, síntese protéica e facilitação de vias neurais, especialmente colinérgicas, dopaminérgicas, glutamatérgicas, adrenérgicas e serotoninérgicas, e possui um substrato neuroatômico que envolve atividade integrada de várias estruturas cerebrais como o hipocampo, amígdala e córtex entorrinal (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo, 1998). Nossos resultados, neste modelo, avaliando a aquisição da memória, demonstram que a intensidade do estímulo está relacionada à capacidade de aprendizado da

prole de ratas tratadas com etanol. Com um estímulo de 0,3 mA o grupo etanol não apresentou comportamento de aprendizado, mas com um estímulo de 1mA foram capazes de formar memória aversiva relacionada à sessão treino. Os resultados de aquisição podem ser influenciados por vários fatores neste modelo, tais como sensibilidade algica, estresse, presença de pistas visuais, estímulos auditivos (Izquierdo, 1997 e 2002). Menor sensibilidade ao choque poderia gerar um resultado falso negativo. Entre tanto, quando elevamos a intensidade do estímulo, os animais do grupo etanol demonstram resposta de associação do contexto aversivo, mas a avaliação da retenção demonstrou que efetivamente o tratamento com etanol afetou os mecanismos de formação da memória.

Os efeitos crônicos do consumo de álcool durante a gestação sobre a memória são reportados em modelos animais desde o início da década de 1970 (Miller, 1993). Quanto às alterações aguda sobre a memória, em 1996 Minetti e colaboradores já haviam demonstrado que o tratamento agudo com etanol no oitavo dia de vida intra-uterina provoca distúrbios de memória espacial na prole de ratos. Sadrian e colaboradores (2014) utilizando utilizando o mesmo protocolo de alcolização em camundongos (2,8 g/kg, 2x, *i.p*), descrevem comprometimento da memória espacial quando o tratamento é realizado em E₇, sendo que em E₈ os animais não apresentam tal comprometimento.

A participação da 5-HT nos mecanismos de memória é amparada por inúmeras manipulações dos receptores serotoninérgicos que incrementam o desempenho de animais e humanos em diferentes testes de memória. Especificamente no modelo de esQUIVA passiva a redução da atividade serotoninérgica também está associada a redução do desempenho de ratos. Em ratos treinados na esQUIVA inibitória com intensidades de estímulos relativamente altas, o pré-tratamento com PCPA (10 mg/kg) inibe a memória enquanto outros tratamentos amnésicos não tem nenhum efeito. Mas quando esta mesma dose é utilizada na esQUIVA ativa em intensidade de 0,6, 0,8, 1,0 ou 1,4 mA, em grupos independentes de ratos, o aprendizado é inibido apenas nos animais que recebem estímulo de baixa intensidade, o que indica que a dose de PCPA administrada não interfere com a aquisição e retenção na esQUIVA ativa nestas condições, por tanto, seus efeitos na esQUIVA passiva não se devem a morte de neurônios serotoninérgicos (Galindo et al., 2008).

O desenvolvimento de populações neuronais durante o período embrionário precoce é espaço-tempo dependente. Quaisquer alterações no meio ambiente embrionário podem ter efeitos potencialmente neuroembriotóxicos. A sequência de desenvolvimento a partir do qual são formados neurônios serotoninérgicos é complexa e ainda cheia de lacunas. Todavia, como demonstrado por Ye e co-autores (1998), a maturação de uma célula precursora até o fenótipo característico de neurônios 5-HT, baseia-se na expressão temporal de concentrações ótimas da proteína SHH e fatores de crescimento fibroblásticos 4 e 8. Esses fatores determinantes são expressos em gradientes através do encéfalo, e quando uma concentração ótima é atingida, um sinal de transcrição aciona a expressão da enzima triptofano hidroxilase, transportadores de serotonina, e promove o nascimento de neurônios 5-HT. Estes irão migrar e se estabelecerem em redes neurais especificadas. Isto ocorre em momentos e pontos definidos no embrião, chamados centros indutores (Zhu et al., 2000). A redução da imunorreatividade à TPH-2, vista aqui e em outros trabalhos, em função da ação do etanol na fase embrionária, se deve especialmente à alteração no ambiente dos centros indutores, e não da ação citotóxica. Culturas de neurônios 5-HT retiradas de embriões de rato em E₁₄ quando exposto à elevadas concentrações de etanol por 4 dias (450 mg/dl) não diminuem significativamente o número de neurônios e a quantidade de 5-HT (Lokhorst & Druse, 1993).

Diante da premissa condicionante no parágrafo acima, e em função dos resultados observados nos ensaios realizados, nossos dados tomados em conjuntos sugerem que o protocolo de alcolização alterou a atividade do sistema serotoninérgico dos animais provocando ingestão exacerbada, de sódio, comportamento relacionado à ansiedade e

problemas de memória. Em conclusão, a exposição do embrião de ratos ao etanol em E₁₄, pode acarretar na fase adulta em intensos distúrbios envolvendo os mecanismos de regulação hidroeletrólítica (associados à menor ativação de neurônios ocitocinérgicos e serotoninérgicos em resposta à ingestão de salina) e alterações comportamentais similares aos distúrbios neurocognitivos apresentados por crianças com DESAF e SAF, como distúrbios de memória, déficit de aprendizado e comportamento relacionado à ansiedade.

O protocolo de alcolização aqui utilizado pode ser instituído no estudo da DESAF e prover dados a cerca das perspectivas de medidas de cuidados e tratamento desta condição, que afeta cerca de 5 % das crianças na América do Norte (May et al., 2009). A implicação mais incisiva dos resultados obtidos deste projeto recai sobre a postura que a sociedade ocidental deve assumir perante ao consumo de bebidas alcólicas, em especial as mulheres em idade reprodutiva. O modo como não repreendemos maus hábitos os tornam mais conspícuos, e por fim legitimados. O futuro ente pode ter a saúde e as potencialidades cognitivas restringidas em função do comportamento da progenitora, especialmente as que não planejam a gestação e que convivem em grupos sociais onde a ingestão alcóolica é estimulada.

6. CONCLUSÕES

1.O tratamento agudo com etanol do décimo quarto de vida intra-uterina de ratos, provoca alterações no consumo de sódio induzido, e diminuição da ativação de neurônios ocitocinérgicos do hipotálamo e serotoninérgicos do DRN.

2. As ninhada submetidas ao referido tratamento não apresentam malformações congênitas, deterioração do desenvolvimento corporal, atraso no desenvolvimento sensório-motor, distúrbios de motricidade e anedonia, que comumente são observados em exposições crônicas ao etanol durante a gestação.

3. A exposição gestacional aguda ao etanol induz em ratos comportamento relacionado á ansiedade e distúrbios na aquisição e retenção da memória.

4.A abstenção ao consumo de bebidas alcoólicas é o comportamento que deve ser cientificamente respaldado para proteger a integridade do feto durante a fase de desenvolvimento

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILA, J.C.; BLAK, A.; VAN ARENSBERGEN, J.; SOUSA, A.; VÁZQUEZ, N.; ADURIZ, A.; GAYOSSO, M.; MATO, M.L.P.; LOPEZ DE MATURANA, R.; HEDLUND, E.; SONNTAG, K.; PERNAUTE R.S. Selection Based on FOXA2 Expression Is Not Sufficient to Enrich for Dopamine Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells Transl Med.**, v. 14, pp. 2011-2014, 2014.
- ALBERT, P.R.; LEMBO, P.; STORRING, J.M.; CHAREST, A.; SAUCIER, C. The 5-HT_{1A} receptor: Signaling, desensitization, and gene transcription. **Neuropsychopharmacology**. v. 14, pp. 19–25, 1996.
- ALBERTS, J.R. Sensory perceptual development in the Norway rat: A view toward comparative studies. In **Comparative perspectives on memory development**. New York: Plenum, pp. 65-101, 1984.
- ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V.; WEISS, B. **Application of pharmacology in toxicology**. New York, Raven Press. P.57-66, 1983.
- ALDER, S.; ZBINDEN, G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early postnatal period. In: **NEUBERT, D.; MERKER, T.E. Methods in prenatal toxicology**, Stuttgart: Thieme. p. 175-85, 1977.
- ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J. Comp. Neurol.**, v. 137, n. 4, p. 433-457, 1969
- ALTMAN, J.; BAYER, S.A. Development of the brain stem in the rat. V. Thymidineradiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum. **J Comp Neurol**, v. 198, nº 4, pp. 677-716, 1981.
- ALMEIDA, R.L; DAVID. R.B.; CONSTANCIO, J.; FRACASSO, J.F.; MENANI, J.V.; DELUCA-JR, L.A. Inhibition of sodium appetite by lipopolysaccharide: involvement of α ₂-adrenoceptors. **Am J Phy. Regul Int. Comp Physiol** , v. 301, pp. R185–R192, 2011.
- ANDRADE, C.A.F.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA, L.A.Jr., MENANI, J.V. Activation of α ₂-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, pp. 25–34, 2004.
- ANDERSSON, B. Thirst and brain control of water balance. **Am Sci**, v.59, pp. 408– 415, 1971.
- ANDERSSON, B. Regulation of water intake. **Physiol Rev**, v. 58, pp.582– 603, 1978.
- ANDRADE-FRANZÉ, G.M.F, ANDRADE, C.A.F.; DE LUCA Jr.; L.A.; PAULA, P.M.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Brain Research**, v.1332, pp. 57-64, 2010.

- ANDERSON, D.E.; FEDORVA, O.V.; MORRELL, C.H.; LONGO, D.L.; KASHKIN, V.A.; METZLER, J.D.; BAGROV, A.Y.; LAKATTA, E.G. Endogenous sodium pump inhibitors and age-associated increases in salt sensitivity of blood pressure in normotensives. **Am. J. Physiol.**, v.294, pp. R1248-R1254, 2008.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M.R. Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. **Acta Physiol Lat Am.**, v 13, pp. 94–100, 1963.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L.L.; VALENÇA, M.M.; MCCANN, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**; v. 84, pp. 169-208, 2004
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S.M.; ROGERS, L.C.; SAMSON, W.K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. **Endocrinology**, v. 118, pp. 1726-1729, 1986.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L.E.; CASTRO, M. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. 1ª ed., Guanabara Koogan, 2005. ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S.M.; ROGERS, L.C.; SAMSON, W.K. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and angiotensin II – induced water intake in the conscious, unrestrained rat. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, pp. R8720-R8723, 1985.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; PIKANÇO-DINIZ, D.W.L.; FAVARETTO, A.L.V.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M. Brain atrial natriuretic peptide neurons play an essential role in volume expansion induced release of natriuretic peptide and natriuresis. **Neuroendocrinology**, v. 58, pp. 696-700, 1993.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; RAMALHO, M.J.; REIS, L.C.; MENANI, J.V.; TURRIN, M.Q.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 88, pp. 2956–2960, 1991
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; RUGINSK, S.G.; MECAWI, A.S.; MARGATHO, L.O.; CRUZ, J.C.; VILHENA-FRANCO, T.; REIS, W.L.; VENTURA, R.R.; REIS, L.C.; VIVAS, L.M.; ELIAS, L.L.K. Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis. **Braz. J. Med. and Biol. Res.**, v. 46, pp. 327-338, 2013.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; TURRIN, M.Q.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M. Blockade of volume expansion-induced release of atrial natriuretic peptide by median eminence lesions in the rat. **Braz J Med Res**. v. 23, pp. 355-359, 1990.
- APFEL, M.I.R.; ÉSBERAD, C.A.; RODRIGUES, F.K.P.; BAHAMAD, F.M.J.R.; SILLERO, R.O. Estudo estereológico das células de Purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos Wistar. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 60, n. 2A, p. 258-263, 2002.
- APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na/K-ATPase emerges as an interesting drug target. **Journal of International Medicine**. v.261, pp. 44-52, 2007.

- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, v. 21, nº 2, pp. 205-235, 1973.
- ARIEFF, A.I.; GUISSADO, R. Effects on the nervous system of hypernatremic and hyponatremic states. **Kidney International**, v. 10, pp. 104-116, 1976.
- ARGÜELLES, J.; BRIME, J.I.; LÓPEZ-SELA, P.; PERILLÁN, C.; VIJANDE, M. Adult offspring long-term effects of high salt and water intake during pregnancy. **Horm Behav.**, v. 37, nº2, pp.156-162, 2000.
- ARMARIO, A.; GIL, M.; MARTI, J.; POL, O.; BALASCH, J. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 39, pp. 373-377, 1991.
- ARMOUR, J.A. Physiological behavior of thoracic cardiovascular receptors. **Am J Physiol.**, v. 225, pp. 177-185, 1973.
- ASHWELL, K.W.; ZHANG ,L.L. Forebrain hypoplasia following acute prenatal ethanol: quantitative analysis of effects on specific forebrain nuclei. **Pathology**, v. 28, pp. 161-166, 1996.
- ATLAS, S.A. The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathways of angiotensin formation. **Mt. Sinai. J. Med.**, v. 65, pp.87-96, 1998.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; PENHA-SILVA, N. Effects of ethanol on the neuronal migration in the brain neocortex formation. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 1, p.151-157, 2005.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.; NASCIMENTO, G.N.L. The effect of acute and chronic exposure to ethanol on the developing encephalon: a review. **Ver. Bras. de Saud. Mat. Infat.**, v. 8, pp. 241-249, 2008.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.; FERREIRA, N.R.; MORAIS, J.O.M.; PENHASILVA, N. Effects of Acute Prenatal Exposure to Ethanol on the Postnatal Morphology of the Prefrontal Cortex in Wistar Rats. **Br. J. of Morphol. Sciences**,v. 21, n.2, p. 97-101, 2004.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.; RODRIGUES, H.G.; NERES, A.C.; FONSECA, L.C.; PENHASILVA, N. Estudo imunohistoquímico do bulbo olfatório de ratos Wistar submetidos à exposição pré-natal aguda com etanol. **Bioscience Journal**, v. 22, n.1, pp. 99-105, 2006.
- AZMITIA, E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Res. Bull.**, v. 56, pp. 413-424, 2001.
- AZMITIA, E.C. Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 77, pp. 31-56, 2007.

- AZMIA, E.C.; LIAO, B.; CHEN, Y.S. Increase of tryptophan hydroxylase enzyme protein by dexamethasone in adrenalectomized rat midbrain. **J. Neurosci.**, v. 13, pp. 5041–5055, 1993.
- AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 179, pp. 641–668, 1978.
- BADAUÊ-PASSOS, D.JR.; GODINO, A.; JOHNSON, A.K.; VIVAS, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Dorsal raphé nuclei integrate allostatic information evoked by depletion-induced sodium ingestion. **Exp Neurol.**, v. 206, 86–94, 2007.
- BARKER, K.G.; HALLIDAY, G.M.; TORK, I. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 30, p. 147-161, 1990.
- BATENBURG, W.W.; KROP M.; GARRELD, I.M. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro) renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smoothmuscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor . **J Hypertens.**, v. 25, pp. 2441-2453, 2007.
- BAYER, S.A.; YACKEL, J. W.; PURI, P. S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. **Science**, v. 216, n. 4548, p. 890-892, 1982.
- BEDARD, A.; PARENT, A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Brain. Res. Dev. Brain. Res.**, Baltimore, v. 151, n. 1-2, p. 159-168, 2004.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav. Brain Res.**, v.125, n.1-2, p.141-9, 2001.
- BELZUNG, C; LE PAPE, G. Comparison of Different Behavioral Test Situations Used in Psychopharmacology for Measurement of Anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 56, pp. 623-628, 1994.
- BERESFORD, M.J.; FITZSIMONS, J.T. Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT1 receptor antagonist, Losartan (DuP 753), but not by the AT2 antagonist, CGP 42112B. **Exp Physiol.**, v. 77, pp. 761-764, 1992.
- BERGER, M.; GRAY, J.A.; ROTH, B.L. The expanded biology of serotonin.**The Annual Review of Medicine**, v. 60, 9. 355- 360, 2009.
- BERGQUIST, F.; LUDWIG, M. Dendritic transmitter release: a comparison of two model systems. **J. Neuroendocrinol.**, v. 20, pp. 677-86, 2008.
- BERTOGLIO, L.; CAROBREZ, A.P. Ethological and temporal analysis of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, n.8, p.1193-205, 2005.

- BERTRAND, N.; CASTRO, D.S.; GUILLEMOT, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. **Nat Rev Neurosci**, v. 37, pp. 517-530, 2002.
- BLACKBURN, R.E.; DEMKO, A.D.; HOFFMAN, G.E.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. **Am J Physiol.**, v. 263, pp. R1347–R1353, 1992.
- BLACKBURN, R.E.; SAMSON, W.K.; FULTON, R.J.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, pp. 10380–10384, 1993.
- BLACKBURN, R.E.; SAMSON, W.K.; FULTON, R.J.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am J Physiol.**, v. 269, pp. R245–R251, 1995.
- BLACKBURN, R.E.; STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central oxytocin mediates inhibition of sodium appetite by naloxone in hypovolemic rats. **Neuroendocrinology**, v. 56, pp. 255–263, 1992.
- BLANCH, G.T.; FREIRIA-OLIVEIRA, A.H.; MURPHY, D.; PAULIN, R.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; COLOMBARI, E.; MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. **Am. J. of Phys. Reg. Int. and Comp. Physiol.**, v. 304, p. R531-R542, 2013.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. “Dual mechanisms in passive avoidance I & II”, **Psychonomic Science**, v. 19, pp. 1-4, 1970.
- BOLAÑOS, C.A.; BARROT, M.; BERTON, O.; WALLACE-BLACK, D.; NESTLER, E.J. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biol Psychiatry**, v. 54, p. 1317-1329, 2003.
- BOOTH, R.E.; JOHNSON, J.P.; STOCKAND, J.D. Aldosterone. **Adv Physiol.**, v. 26, pp. 8-20, 2002.
- BOURQUE, C.W. Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurones by hyperosmotic stimuli. **J. Physiol.** v. 417, pp. 263-277, 1989.
- BOURQUE, C.W. Central Mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat. Rev. Neurosc.**, v. 9, n°7, pp. 519-531, 2008.
- BOURQUE, C.W.; OLIET, S.H. Osmoreceptors in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v. 59, pp. 601–19, 1997.
- BORSINI, F.; LECCI, A.; SESSAREGO, A.; FRASSINE, R. MELI, A. Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. **Psychopharmacology**, v. 97, 183-188, 1989.

- BRAGA-SOBRINHO, C.; D.C.A.; MELLO-AIRES, M. Action of ANP on the nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on NHE1 in proximal S3 segment. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, p. 89-97, 2012.
- BRICKER, N.S.; KLAHR, S. The physiologic basis of sodium excretion and diuresis. **Advances in Internal Medicine**, v.16, pp. 17-41, 1970.
- BROCARD, P.S.; BOEHME, F.; PATTEN, A.; COX, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R. Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. **Neuropharmacology** 62: 1607-1618, 2012.
- BRODSKI, C., WEISENHORN, D.M.; SIGNORE, M.; SILLABER, I.; OESTERHELD, M.; BROCCOLI, V.; ACAMPORA, D.; SIMEONE, A.; WURST, W. Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. **J. Neurosci.**, v. 23, pp. 4199-4207, 2003.
- BRODY, T.M.; AKERA, T. Relations among Na⁺,K⁺-ATPase activity, sodium pump activity, transmembrane sodium movement, and cardiac contractility. **Fed. Proc.**, v. 3, pp. 2219-2224, 1977.
- BRUM, J.S.; GALIZA, G.J.N.; LUCENA, R.B.; BARROS, C.S.L. Intoxicação por sal em suínos: aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos e breve revisão da literatura. **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, nº7, pp. 890-900, 2013.
- BRUNJES, P.C.; FISHER, M.; GRAINGER, R. The small-eye mutation results in abnormalities in the lateral cortical migratory stream. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 121-125, Sep 1998.
- BUGGY, J.; JONKLAAS, J. Sodium appetite is decreased by angiotensin blockade. **Physiol. Behav.**, v. 32, pp. 737-742, 1984.
- BULCHAND, S.; GROVE, E.A.; PORTER, F.D.; TOLE, S. LIM-homeodomain gene Lhx2 regulates the formation of the cortical hem. **Mech Dev.**, v. 100, pp. 165-175, 2001.
- BURGGREN, W.W.; FRENCH, K.; RANDALL, D. J. **Eckert Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 5^a edição. W H Freeman & Co. 2002.
- CAETANO, R.; RAMISETTY-MIKLER, S.; FLOYD, L.R.; MCGRATH, C. The epidemiology of drinking among women of child-bearing age. **Alcohol Clin Exp Res**. v.30, pp. 1023-1030, 2006
- CAMPBELL, D.J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 35, pp. 784-791, 2003.
- CANDELA, L.; YUCHA, C. Renal regulation of extracellular fluid volume and osmolality. **Nephrol Nurs J.**, v. 31, pp. 397-404, 2004.

- CAROLA, V.; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. *Behavioral Brain Research*, v. 134, pp. 49-57, 2002.
- CASTRO, L.; ATHANAZIO, R.; BARVETTA, M.; RAMOS, A.C.; ANGELO, A.L.; CAMPOS, I.; VARJAO, B.; FREGONEZE, J.; DE CASTRO-E-SILVA, E. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium depleted rats. *Brain. Res.*, v. 981, pp. 151–159, 2003.
- CASTRO-E-SILVA, E.; SARMENTO, C.; NASCIMENTO T. A.; LUZ, C.P.; SOARES, T.; MARINHO, A.; CUNHA, M.; BULCÃO, C.; DE OLIVEIRA, I.R.; FREGONEZE, J.B. Effect of third ventricle administration of 1-694,247, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 57, pp. 749–754, 1997.
- CAVALCANTE-LIMA, H.R.; BADAUÊ-PASSOS, Jr.D.; DE-LUCCA, Jr.W.; LIMA, H.R.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; OLIVARES, E.L.; CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; REIS, R.O.; MEDEIROS, M.A.; CÔRTEZ, W.S.; REIS, L.C. Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. *Braz. J. Med Biol Res*; v. 38, pp. 1669-1675, 2005.
- CAVINESS, V.S.JR.; NOWAKOWSKI, R.S.; BHADE, P.G. Neocortical neurogenesis: morphogenetic gradients and beyond. *Trends Neurosci.* v. 32, n° 8, pp. 443-50, 2009.
- CAVINESS, V.S.JR.; TAKAHASHI T.; NOWAKOWSKI R. S. The G1 restriction point as critical regulator of neocortical neurogenesis. *Neurochem Res.*, v. 24, pp. 497–506, 1999.
- CAVINESS, V.S.JR.; TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.S. Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* v. 18, pp. 379–383, 1995.
- CECHETTO, F.; SAPER, C.B. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the Spinal Cord in the rat. *J Comp Neurol.*, v. 272, pp. 579-604, 1998.
- CHEN, Y.; OZTURK, N.C.; ZHOU, F.C. DNA methylation program in developing hippocampus and its alteration by alcohol. *PLoS One*, v. 8, n° 3, pp. 60503, 2013.
- CHENG, L.; CHEN, C.; LUO, P.; TAN, M.; QIU, M.; JOHNSON, R.; MA, Q. Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 Coordinately Specify Serotonergic Neurotransmitter Phenotype. *The J. of Neurosc.*, v. 23, pp.9961–9967, 2003.
- CHEVASSUS-AU-LOUIS, N.; CONGAR, P.; REPRESA, A.; BEM-ARI, Y.; GAIARSA, J. L. Neuronal migration disorders: heterotopic neocortical neurons in CA1 provide a bridge between the hippocampus and the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v. 95, n. 17, p. 10263-10268, 1998.
- CHIARAVIGLIO, E. Sodium chloride intake following electrochemical stimulation of the frontal lobe cortex in the rat. *Physiol. Behav.*, v. 33, n° 4, 1984.

- CHOLERIS, E., THOMAS, A.W., KAVALIERS, M., PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.25, n°3, p.235-260, 2001.
- CHRIGUER, R.S.; ROCHA, M.J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; FRANCI, C.R. Hypothalamic atrial natriuretic peptide and secretion of oxytocin. *Brain Res.*, v. 889, pp. 239-242, 2001.
- CHU, C.P.; KANNAN, H.; QIU, D.L. Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus parvocellular neurons in vitro. *Neurosci.*, v. 482, n° 2, pp. 142-145, 2010.
- CIOCIOLA, A.A.; GAUTIERI, R.F. Teratogenic and Behavioral Anomalies Induced by Acute Exposure of Mice to Ethanol and Their Possible Relation to Fetal Brain DNA Synthesis. *Pharm. Res.*, v. 5, pp 447-452, 1988.
- CIURA, S.; BOURQUE, C.W. Transient receptor potential vanilloid is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *J Neurosci*, v. 26, n° 35, pp. 9069-9075, 2006.
- CLIMENT, E.; PASCUAL, M.; RENAUI-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res.*, v. 68, pp. 213–225, 2002.
- COLEMAN, C.G.; ANRATHER, J.; IADECOLA, C.; PICKEL, V;M. Angiotensin II type 2 receptors have a major somatodendritic distribution in vasopressin-containing neurons in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience*, v. 163, pp129-142, 2009.
- COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 271, pp. R1470–R1476, 1996.
- COLOMBARI, D.S.; PEDRINO, G.R.; FREIRIA-OLIVEIRA, A.H.; KORIM, W.S.; MAURINO, I.C.; CRAVO, S.L. Lesions of medullary catecholaminergic neurons increase salt intake in rats. *Brain Res Bull.*, 76, v. 572–578, 2008.
- CONNELL, J.M.C.; DAVIES, E. The new biology of aldosterone. *Journ. Endocrinol.*, v. 186, n° 1, pp. 1-20, 2005.
- CONRAD, K.P.; GELLAI, M.; NORTH, W.G.; VALENTIN, H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann NY Acad Sci.* v. 689, pp. 346-362, 1993.
- CONTRERAS, R.J.; STETSON, P.W. Changes in salt intake lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. *Brain Res.*, v. 211, pp. 355-366, 1981.

- COOPER, S.J.; FRYER, M.J.; NEILL, J.C. Specific effect of putative 5-HT_{1A}, agonists, 8-OH-DPAT and gepirone, to increase hypertonic saline consumption in the rat. Evidence against a general hyperdipsic action. **Physiol Behav.**, v. 43, pp. 533–537, 1988.
- CORRÊA, C.L.; FERREIRA, M.G.; LEMONICA, I.P. Consumo de álcool e gravidez: riscos decorrentes desta associação. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 13, pp. 5-10, 2000.
- COURVOISIER, H; MOISAN, M.P; SARRIEAU, A; HENDLEY, E.D; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: amultifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, v. 743, p. 77-85, 1996.
- COVIAN, M.R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. **Am J Physiol.**, v. 205, pp. 922–926, 1963.
- CREWS, E.C.; ROWLAND, N.E. Role of angiotensin in body fluid homeostasis of mice: effect of losartan on water and NaCl intakes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, pp. 638-644, 2005.
- CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Mol. Psychiatry**. v. 9, pp. 326–357, 2004.
- CULLEN, C.L.; BURNE, T.H.J.; LAVIDIS, N.A.; MORITZ, K.M. Low Dose Prenatal Ethanol Exposure Induces Anxiety-Like Behaviour and Alters Dendritic Morphology in the Basolateral Amygdala of Rat Offspring. **PLOS ONE**, v. 8, pp. n° 54294, pp. 1-12, 2013.
- CURTIS, K.S.; HUANG, W.; SVED, A.F.; VERBALIS, J.G.; STRICKER, E.M. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. **Am. Jour. of Physiol. Int. and Com. Physiol.**, v. 277, pp. R209-R219, 1999.
- CURTIS, K.S.; VERBALIS, J.G.; STRICKER, E.M. Area postrema lesions in rats appear to disrupt rapid feedback inhibition of fluid intake. **Brain Res.** v. 726, pp. 31-38, 1996.
- DANIELS, D.; EPSTEIN, A.N. award: Intracellular signaling and ingestive behaviors. **Physiol Behav.**, v. 100, pp. 496–502, 2010.
- DANIELS, D.; FLUHARTY, S.J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiology & Behavior.**, v.81. pp. 319-337, 2004.
- DANIELS, D.; YEE, D.K.; FLUHARTY, S.J. Angiotensin II receptor signalling. **Exp Physiol** v. 92, pp. 523–527, 2007.
- DANIELS, D.; YEE, D.K.; FAULCONBRIDGE, L.F.; FLUHARTY, S.J. Divergent behavioral roles of angiotensin receptor intracellular signaling cascades. **Endocrinology**, v. 146, pp. 5552- 5560, 2005.
- DANIELS, D.; MIETLICKI, E.G.; NOWAK, E.L.; FLUHARTY, S.J. Angiotensin II stimulates water and NaCl intake through separate cell signaling pathways in rats. **Exp Physiol.**, v. 94, pp. 130–137, 2009.

- DEBOLD, A.J.; BRUNEAU, B.G.; DEBOLD, M.L.K. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 31, pp. 7– 18, 1996.
- DAVAL, G.; VERGE, D.; BECERRIL, A.; GOZLAN, H.; SPAMPINATO, U.; HAMON, M. Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 5, pp. 171-189, 1987.
- DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 16, pp. 33-36, 1995.
- DE GOBBI, J.I.; MENANI, J.V., BELTZ, T.G.; JOHNSON, R.F.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Right atrial stretch alters fore- and hind-brain expression of c-fos and inhibits the rapid onset of salt appetite. **J Physiol.**, v. 586, pp. 3719-3729, 2008.
- DE PABLO, J.M.; PARRA, A.; SEGOVIA, S.; GUILLAMON, A. Learned Immobility Explains the Behavior of Rats in the Forced Swimming Test. **Physiol. Behav.**, v. 46, pp. 229-237, 1989.
- DEIRÓ, T.C.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CABRAL-FILHO, J.E.; BARRETO-MEDEIROS, J.M.; SOUZA, S.L.; MARINHO, S.M.; CASTRO, F.M.; TOSCANO, A.E.; JESUS-DEIRÓ, R.A.; BARROS, K.M. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiol Behav.** v. 28, pp. 338-344, 2006.
- DEIRÓ, T.C.B.J.; CARVALHO, J.; NASCIMENTO, E.; MEDEIROS, J.M.B.; CAJUHI, F.; FERRAZ-PEREIRA, K.N.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, p. 736., 2008.
- DE LUCA Jr, L.A.; BARBOSA, S.P.; MENANI, J.V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, pp.1055–1061, 2003.
- DE LUCA Jr., L.A.; BARBOSA, S.P.; SUGAWARA, A.M.; MENAMI, J.V. Effects of intracerebroventricular injection of losartan or PD 123319 On arterial pressure and heart rate of sodium replete and sodium deplete rats. **Reg. Pep.**, v. 66, pp. 31-35, 1996.
- DE LUCA Jr., L.A.; GALAVERNA, O.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.N. The anteroventrolateral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. **Brain Res. Bull.**, v.28, pp. 73-87, 1992.
- DE LUCA Jr., L.A.; PEREIRA-DERDERIAN, D.T.; VENDRAMINI, R.C.; DAVID, R.B.; MENANI, J.V. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav.**; v. 100, pp. 535-444, 2010.
- DENTON, D.A.; MCKINLEY, M.J.; WEISINGER, R.S. Hypothalamic integration of body fluid regulation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 9, pp. 7397–7404, 1996.
- DIJK, G.V.; EVERS, S.S.; GUIDOTTI, S.; THORTNTON, S.N.; SCHEURINK, A.J.W.; NYAKAS, C. The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. **Behavioural Brain research.**,v. 221, n°2, pp. 481-488, 2011.

- DOW-EDWARDS, D.L. Modification of acoustic startle reactivity by cocaine administration during the postnatal period: comparison with a specific serotonin reuptake inhibitor. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 18, pp. 289-296, 1996.
- DRUMMER, C.; FRANCK, W.; HEER, M.; FORSSMANN, W. G.; GERZER, R.; GOETZ, K. Postprandial natriuresis in humans: further evidence that urodilatin, not ANP, modulates sodium excretion. **Am. Jour. Physiol.**, v. 270, pp. F301-F310, 1996.
- DRUSE, M.J.; KUO, A.; TAJUDDIN, N. Effects of in utero ethanol exposure on the developing serotonergic system. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 15, pp. 678–684, 1991.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm.**, v. 46, pp. 208-209, 1957.
- DUNN, J. K. Disorders of water and sodium balance. In: **TORRANCE, A. G.; MOONEY, C. T. Manual of Small Animal Endocrinology**. Copyright, Cheltenham, England, 2 ed. Cap. 18. p. 151 – 161, 1998.
- DUNTY, W.C.JR.; ZUCKER, R.M.; SULIK, K.K. Hindbrain and cranial nerve dysmorphogenesis result from acute maternal ethanol administration. **Dev Neurosci.**, v. 24, pp. 328-342, 2002.
- DURSUN, I.; JAKUBOWSKA-DOGRU, E.; UZBAY, T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. **Pharm. Bioch. and Behav.**, v. 85, pp. 345–355, 2006.
- EDELMAN, G.M.; JONES, F.S. Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. **Brain Res. Brain Res.Rev.** v.26, p.337-352, 1998.
- EDWARDS, G.L.; BELTZS, T.; POWER, J.; JOHNSON, A.K. Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. **Am. Jour. of Physiol.**, v. 264, R1242-R1247, 1993.
- EDWARDS, H.G.; DOW-EDWARDS, D.L. Craniofacial Alterations in Adult Rats Prenatally Exposed to Ethanol. **Teratology**, v. 44, pp. 373-378, 1991.
- EDWARDS, G.L.; JOHNSON, A.K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 261, pp. R1039–R1044, 1991.
- EGELAND, N.B.; PERHAM-HESTER, K.A.; HOOK, E.B. Use of capture-recapture analyses in fetal alcohol syndrome surveillance in Alaska. **Am. J. Epidemiol.**, v. 141, pp. 335-341, 1995.
- EPSTEIN, A.N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Res Bull.**, v. 27, pp. 315–20, 1991.
- ERIKSENA, J.L.; DRUSE, M.J. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. **Developmental Brain Research**, v. 131, pp. 9–15, 2001.

- ESTEVA-FONT, C.; BALLARIN, J.; FERNÁNDEZ-LLAMA, P. Molecular biology of water and salt regulation in the kidney. **Cell Mol Life Sci.**, v. 69 (5), pp. 683-695, 2012.
- ETHEN, M.K.; RAMADHANI, T.A.; SCHEUERLE, A.E.; CANFIELD, M.A.; WYSZYNSKI, D.F.; DRUSCHEL, C.M.; ROMITTI, P.A. Alcohol consumption by women before and during pregnancy. **Matern Child Health J.**, v. 13, n° 2, pp. 274–285, 2009.
- FALK, J.L.; Water intake and NaCl appetite in sodium depletion. **Physiology Reports**, v. 16, pp. 315-325, 1965.
- FALKENSTEIN, E.; NORMAM, A.W.; WEHLING, M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action (s). **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 85, pp. 2072–2075, 2000.
- FERREIRA, T.A.A.; FERREIRA, N.R.; MORAIS, J.O.R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 21, n.2, pp. 97-101, 2004.
- FELDT, S.; BATENBURG, W.W.; MAZAK I. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. **Hypertension**, v. 51, pp. 682-688, 2008.
- FERRARIO, C.M. New Physiological Concepts of the Renin-Angiotensin System From the Investigation of Precursors and Products of Angiotensin I Metabolism. **Hypertension.**, v. 55, n° 2, pp. 445-452, 2010.
- FERGUSON, A.V.; BAINS, J.S. Electrophysiology of the circumventricular organs. *Front Neuroendocrinol*, v. 17, pp. 440–475, 1996.
- FINNIE, J.W.; BLUMBERGS, P.C.; WILLIAMSON, M.M. Alzheimer type II astrocytes in the brains of pigs with salt poisoning (water deprivation/ intoxication). **Aust. Vet. J.**, v. 88, pp. 405-407, 2010.
- FIUZA, T.S.; MORAIS, J.O.R. Immunohistochemical evaluation of the postnatal effects of acute exposure to ethanol on the kinetics of granule-cell migration in rat cerebellum. **Braz. Jour. Morph. Sciences.** v. 22, n.1, p. 19-24, 2005.
- FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L. Rapid elicitation of salt appetite by an intravenous infusion of angiotensin II in rats. **Am J Physiol.**, v. 270, pp. R1092-1098, 1996.
- FITTS, D. A.; MASON, D. B. Preoptic angiotensin and salt appetite. **Behav. Neurosci.** v. 104, pp. 643–650, 1990.
- FITTS, D. A.; TJEPKES, D.S.; BRIGHT, R.O. Salt appetite and Lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. **Behav. Neurosci.** v. 104, pp. 818–827, 1990.
- FITTS, D.A.; THORNTON, S.N.; RUHF, A.A.; ZIERATH, D.K.; JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L.; Effects of central oxytocin receptor blockade on water and saline intake, mean arterial pressure, and c-Fos expression in rats. **Am J Physiol**, v. 285, pp. R1331–R1339, 2003.

- FLINN, F.W.; STRICKER, E.M. Hypovolemia stimulates intraoral intake of water and NaCl solution in intact rats but not in chronic decerebrate rats. **Physiol Behav**, v. 80(2-3), pp.281-287, 2003.
- FLOYD, R.L.; DECOUFLE, P.; HUNGERFORD, D.W. Alcohol use prior to pregnancy recognition. **Am. J. Prev. Med.** v. 17, pp.101-107, 1999.
- FLUHARTY, S.J. The neuroendocrinology of body fluid homeostasis. In: PFAFF, D.W.; ARNOLD, A.P.; ETGEN, A.M.; FAHRBACH, S.E.; RUBIN, R.T. editors. **Hormones, Brain, and Behavior**, Amsterdam, Boston: Academic Press; vol. 1, pp. 525– 70, 2002.
- FLUHARTY, S.J.; EPSTEIN, A.N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensina II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behav Neurosci.**, v. 97, n°5, pp. 746-58, 1983.
- FONSECA, F.V.; MECAWI, A.S.; ARAUJO, I.G.; ALMEIDA-PEREIRA, G.; MAGALHÃES-NUNES, A.P.; BADAUÊ-PASSOS, D. Jr.; REIS, L.C. Role of the 5-HT1A somatodendritic autoreceptor in the dorsal raphe nucleus on salt satiety signaling in rats. **Exp Neurol**; v. 217, pp. 353-360, 2009.
- FOX, W.M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. **Animal Behavior**, v. 13, pp. 234-241, 1965.
- FRANCHINI, L.F.; JOHNSON, A.K.; DE OLMOS, J.; VIVAS L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 282, pp. R235–R243, 2002.
- FRANCHINI, L.F.; VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 276, pp. R1180–R1187, 1999.
- FREGLEY, M.J.; WATERS, I.W. Effect of mineralocorticoids on spontaneous sodium chloride appetite of adrenalectomized rats. **Physiol. Behav.**, v.1, pp. 65– 74, 1966.
- FRIEDLER, R.M.; KOFFLER, A.; KUROKAWA, K. Hyponatremia and hypernatremia. **Clinical Nephrology**, v. 7, n° 4, pp.163, 1977.
- FUJITA, S.; SHIMADA, M.; NAKAMURA, T. H³-Thimidine autoradiographics studies on the cell proliferation and differentiation in the external and internal granular layers of the mouse cerebellum. **J. Com. Neurol.**, v. 128, n. 2, p. 191- 208, 1966.
- FULGINITI, S.; MINETTI, S.A.; VIRGOLINI, M.B. Effects of acute ethanol intoxication during pregnancy on central dopaminergic system in male rats. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 16, n°4, pp. 385-389, 1994.
- FRY, M.; FERGUSON, A.V. The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. **Phys. Behav.**, v. 91, pp. 413-423, 2007.

- FYHRQUIST, F.; SAIJORUNAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J. Intern. Med.**, v.264, pp. 224-36, 2008.
- GABRIEL, K.; YU, C.L.; OSBORN, J.A.; WEINBERG, J. Prenatal ethanol exposure alters sensitivity to the effects of corticotropin-releasing factor (CRF) on behavior in the elevated plus-maze. **Psychoneuroendocrinology** , v. 31, pp. 1046–1056, 2006.
- GALAVERNA, O.; DE LUCA JR, L.A.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res Bull**, v. 28, pp. 89–98, 1992.
- GALAVERNA, O.G.; SEELEY, R.J.; BERRIDGE, K.C.; GRILL, H.J.; EPSTEIN, A.N.; SCHULKIN, J. Lesion of the central nucleus of the amygdala I: effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. **Behav. Brain Res.**, v. 59, pp. 11-17, 1993.
- GALINDO, L.E.; GARÍN-AGUILAR, M.E.; MEDINA, A.C.; SERAFÍN, N.; QUIRARTE, G.L.; PRADO-ALCALÁ, R.A. Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behav Brain Res.*, v. 195, pp. 153-158, 2008.
- GARRO, A.J.; MCBETH, D.L.; LIMA, V.; LIEBER, C.S. Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: Implications for the fetal alcohol syndrome. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research.**, v. 15, n° 3, pp. 395–398, 1991.
- GEERLING, J.C.; ENGELAND, W.C.; KAWATA, M.; LOEWY, A.D. Aldosterone target neurons in the nucleus tractus solitarius drive sodium appetite. **Jour. Neurosci.**, v. 26, n° 2, pp. 411-417, 2006
- GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. **J Comp Neurol.**, v. 497, pp. 646-657, 2006.
- GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Central regulation of sodium appetite. **Experimental Physiology**, v. 93, pp.177–209, 2008.
- GELING, A. .; PLESSY, C.; RASTEGAR, S.; STRAHLE, U.; BALLY-CUIF, L. Her5 acts as a prepattern factor that blocks neurogenin1 and coe2 expression upstream of Notch to inhibit neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. **Development**, v. 131, n° 9, pp. 1993-2006, 2004.
- GERRISH, C.J.; ALBERTS, J.R. Differential influence of and juvenile conspecifics on feeding by weanling rats (*Ratus norvegicus*): A size-related explanation. **Jouranl of Comparative Psychology**, v. 109, pp. 61-67, 1995.
- GILLES, R.; **Mechanisms of osmoregulation in animals: maintenance of cell volume**, 1ª Edição, John Wiley & Sons. 1979.
- GODINO, A.; DE LUCA, L.A.Jr.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or

- hypertonicity markers? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 293, pp. R1027–R1036, 2007.
- GODINO, A.; GIUSTI-PAIVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. **Neuroscience**, v. 133, pp. 493-505, 2005.
- GODINO, A.; MARGATHO, L.O.; XIMENA, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. Activation of lateral parabrachial afferent pathways and endocrine responses during sodium appetite regulation. **Exp. Neurol.**, v. 221, pp. 275-284, 2010.
- GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behav Neural Biol.**, v. 46, pp. 87–98, 1986.
- GOMEZ, R.A.; FULGINITI, S.; RAMÍREZ, O.A. Effect of acute ethanol exposure during pregnancy on dentate gyrus synaptic plasticity in 45-day-old rats. **Pharmacol Biochem. Behav.**, v. 42, pp. 85-89, 1992.
- GORBIN, J.G.; GAIANO, N.; JULIANO, S.L.; POLUCH, S.; STANCIK, E.; HAYDAR, T.F. Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. **J Neurochem.**, v. 106, pp. 2272-2287, 2008.
- GOTHONI, P.; AHTEE, L. Chronic ethanol administration decreases 5-HT and increases 5-HIAA concentration in rat brain. **Acta Pharm Toxicol**, v. 46, pp. 113–20, 1980.
- GRACE, J.E. Central nervous system lesions and saline intake in the rat. **Physiol. Behav.**, v.3, n° 3, pp. 387-390, 1968.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, pp. 239-259, 2004.
- GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, Jr. H. Animal models of anxiety disorders. In: D’Haenen H, den Boer JA, Willner P (eds). **Biological Psychiatry**. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd; pp. 96–103, 2002.
- GRESSENS, P. Mechanisms and disturbances of neuronal migration. **Pediatr. Res.**, v. 48, p. 725-730, 2000.
- GROSS-ISSEROFF, R.; SALAMA, D.; ISRAELI, M.; BIEGON, A. Autoradiographic analysis of age-dependent changes in serotonin 5-HT₁ receptors of the human brain postmortem. **Brain Res.**, v. 519, pp. 223-227, 1990.
- GROSSMAN, S.P. Thirst and sodium appetite: Physiological basis. **Academic Press**, San Diego, 1990.
- GROVE, E.A.; FUKUCHI-SHIMOGORI, T. Generating the cerebral cortical area map. **Annu Rev Neurosci.**, v. 26, pp. 355–380, 2003.
- GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. **Braz. Jour. of med. and boil. Res.**, v. 47, p. 206-214, 2014.

- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiología Médica**. 12ª Ed., Rio de Janeiro. Editora Elsevier, 2011.
- HAANWINCKEL, M.A.; ELIAS L.K.; FAVARETTO, A.L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.; ANTUNES- RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**; v. 92, pp. 7902-7906, 1995.
- HALL, J.L.; CHURCH, M.W.; BERMAN, R.F. Radial-arm maze deficits in rats exposed to alcohol during midgestation. **Psychobiology**, v. 22, pp. 181–185, 1994.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 327, nº 1, p. 1-5, 1984.
- HARVEY, B.J.; HIGGINS, M. Nongenomic effects of aldosterone on Ca²⁺ in M-1 cortical collecting duct cells. **Kidney Int.**, v. 57, pp. 1395–1403, 2000.
- HASLER, U.; WANG, X.; CRAMBERT, G.; BEGUIN, P.; JAISSER, F.; HORISBERGER, J.D.; GEERING, K. Role of b-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *Jour. of Biol. Chem.*, v. 273, pp. 30826–30835, 1998.
- HAYCOCK, P.C.; RAMSAY, M. Exposure of mouse embryos to ethanol during preimplantation development: Effect on DNA methylation in the H19 imprinting control region. **Biology of Reproduction.**, v. 81, pp. 618–627, 2009.
- HAYES, L.; ZHANG, Z.; ALBERT, P.; ZERVAS, M.; AHN, S. Timing of Sonic hedgehog and Gli1 expression segregates midbrain dopamine neurons. **J Comp Neurol.**, v. 519, pp. 3001–18, 2011.
- HEBERT, H.; FORSLING, M.L.; HOWES, S.R.; STACEY, P.M.; SHIERS, H.M. Regional expression of c-Fos antigen in the basal forebrain following intracerebroventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline. **Neurosci.**, v. 51, pp. 867-882, 1992.
- HEATON, M.B.; MITCHELL, J.J.; PAIVA, M.; WALKER, D.W. Ethanol-induced alterations in the expression of neurotrophic factors in the developing rat central nervous system. **Dev Brain Res.**, v. 121, pp. 97–107, 2000.
- HICKS, S.D.; MIDDLETON, F.A.; MILLER, M.W. Ethanol-induced of cell cycle genes in neural stem cells. **Journ. of Neurochem.**, v. 114, pp. 1767-1780, 2010.
- HEATON, M.B.; MOORE, D.B.; PAIVA, M.; MADORSKY, I.; MAYER, J.; SHAW, G. The role of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and endogenous antioxidants in the differential temporal vulnerability of neonatal cerebellum to ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 27, pp. 657–669, 2003.

- HEINZ, A.; MANN, K.; WEINBERGER, D.R.; GOLDMAN, D. Serotonergic dysfunction, negative mood states, and response to alcohol. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 25, pp. 487–495, 2001.
- HELLEMANS, K.G.C.; VERMA, P.; YOON, E.; YU, W.K.; YOUNG, A.H.; WEIBERG, J. Prenatal Alcohol Exposure Increases Vulnerability to Stress and Anxiety-Like Disorders in Adulthood. **Annals of the New York Academy of Sciences**, pp. 154–175, 2008.
- HELLEMANS, K.G.C.; VERMA, P.; YOON, E.; YU, W.K.; YOUNG, A.H.; WEIBERG, J. Prenatal Alcohol Exposure and Chronic Mild Stress Differentially Alter Depressive- and Anxiety-Like Behaviors in Male and Female Offspring. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research**, v. 34, pp. 633–645, 2010.
- HIYAMA, T.Y.; WATANABE, E.; OKADO, H.; NODA, M. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior. **J Neurosci**, v. 24, pp. 9276–9281, 2004.
- HIYAMA, T.Y.; WATANABE, E.; ONO, K.; INENAGA, K.; TAMKUN, M.M.; YOSHIDA, S.; NODA, M. Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. **Nat Neurosci.**, v.5, pp. 511–512, 2002.
- HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. **Behav Brain Res.**, v. 12, pp. 136, 2002.
- HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R.K. Individual response profiles of male wistar in animal models for anxiety and depression. **Behav Brain Res.**, v. 17, pp. 1-12, 2002.
- HOCHSTENBACH, S.L.; CIRIELLO, J. Effect of lesions of forebrain circumventricular organs on *c-fos* expression in the CNS to plasma hypernatremia. **Brain Res.**, v. 713, pp. 17–28, 1996.
- HOFER, H. Zur morphologie der circumventrikularen organe des zwischenhirnes der saugtiere. **Vorh dtsh zool Ges**, Frankfurt/M, v.8, pp. 202–51, 1958.
- HOFFMAN, G.E.; LE, W.W.; ABBUD, R.; LEE, W.S.; SMITH, M.S. Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. **Brain Res.**, v. 654, n° 2, pp. 207 – 215, 1994.
- HOFFMAN, C.E.; PATYK, I.A.; WEINBERG, J. Prenatal ethanol exposure: Sex differences in anxiety and anxiolytic response to 5-HT_{1A} agonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, pp. 549–558, 2005.
- HOFMANN, C.E.; SIMMS, W.; YU, W.K.; WEINBERG, J. Prenatal ethanol exposure in rats alters serotonergic-mediated behavioral and physiological function. **Psychopharmacology**, v. 161, pp. 379–386, 2002
- HOLLIS, J.H.; MCKINLEY, M.J.; D’SOUZA, M.; KAMPE, J.; OLDFIELD, B.J. The trajectory of sensory pathways from the lamina terminalis to the insular and cingulate

- cortex: a neuroanatomical framework for the generation of thirst. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 294, pp. R1390–R1401, 2008.
- HOSOMI, H.; MORITA, H. Hepatorenal and hepatointestinal reflexes in sodium homeostasis. **News Physiol Sci.**, v.11, pp.103–107, 1996.
- HSIEH J.; GAGE F. H. Epigenetic control of neural stem cell fate. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v. 14, pp. 461–469, 2004.
- HUGHES, P., DRAGUNOW, M., Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. **Pharmacol. Rev.**, v. 47, n°1, pp. 133-178, 1995.
- HUMES, D.; NARINS, R.G.; BRENNER, B.M. Disorders of water balance. **Hospital Practice**, v.14, n° 3, pp.133-135, 1979.
- HUSSY, N.; DELEUZE, C.; BRES, V.; MOOS, F.C. New role of taurine as an osmomediator between glial cells and neurons in the rat supraoptic nucleus. **Adv Exp Med Biol.**, v. 483, pp. 227- 237, 2000.
- HYNES, M.; POULSEN, K.; TESSIER-LAVIGNE, M.; ROSENTHAL, A. Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. **Cell**, v. 80, pp. 95–101, 1995.
- HYTTEL, J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **Int J Psychopharmacol** , v. 9, pp. 19–26, 1994;
- IGNACIO, C.; MOONEY, S.M.; MIDDLETON, F.A. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on microRNA expression are ameliorated by social enrichment. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, pp. 1-18, 2014.
- IZQUIERDO, I. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, v.393, p.635-6. 1998.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: The sequeseen of biochemical eventes in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning of learning and memory**, v. 68, pp. 285-316, 1997.
- JALOWIEC, J.E. Sodium appetite induced by furosemide: effects of differential dietary maintenance. **Behav. Biol.**, v. 10, pp. 313-325, 1974
- JALOWIEC, J.E.; STRICKER, E.M. Restoration of body fluid balance following acute sodium deficiency in rats. **J. Comp. Physiol. Phys.**, v.70, pp. 94-102, 1970.
- JOHNSON, A.K.The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Medicine and Science in sports and exercise.**, v.39 (8), pp. 1388–1400, 2007.

- JOHNSON, A.K.; CUNNINGHAM, J.T.; THUNHORST, R.L. Integrative role of the lamina terminalis in regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin. Exp. Phamacol. Physiol.**, v. 23, pp.183-191, 1996.
- JOHNSON, A.K.; GROSS, P.M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEB J.**, v.7, pp. 678–686, 1993.
- JOHNSON A.K.; EDWARDS, G.L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. **Current Topics in Neuroendocrinology**, v. 10, pp. 151-190, 1990.
- JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. Sensory mechanisms in the behavioral control of body fluid balance: thirst and salt appetite. **Prog Psychobiol Physiol Psychol**, v.16, pp. 145-176, 1995.
- JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol.**, v. 18, pp. 292–353, 1997.
- JOKSIMOVIC, M.; ANDEREGG, A.; ROY, A.; CAMPOCHIARO, L.; YUN, B.; KITTAPPA, R.; MCKAY, R.; AWATRAMANI, R. Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, 19185-19190, 2009.
- JOKSIMOVIC, M.; PATEL, M.; TAKETO, M.M.; JOHNSON, R.; AWATRAMANI, R. Ectopic Wnt/Beta–Catenin Signaling Induces Neurogenesis in the Spinal Cord and Hindbrain Floor Plate. **PlosOne**, v. 7, 30266, 2012.
- JONES, K.L.; SMITH, D.W.; Recognition of the Fetal Alcohol Syndrome in Early Pregnancy. **LANCET**. v. 2, pp. 999-1001, 1973.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Princípios da Neurociência**. 4ª ed. Editora Manole, 2003.
- KASCHINA, E.; UNGER, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. **Blood Press**, v. 12, pp. 70-88, 2003.
- KAUFMAN S. Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. **J. Physiol.**, v. 349, pp. 389-396, 1984.
- KIM, E.K.; LEE, M.H.; KIM, H.; SIM, Y.J.; SHIN, M.S.; LEE, S.J.; YANG, H.Y.; CHANG, H.K.; LEE, T.H.; JANG, M.H.; SHIN, M.C.; LEE, H.H.; KIM, C.J. Maternal ethanol administration inhibits 5-hydroxytryptamine synthesis and tryptophan hydroxylase expression in the dorsal raphe of rat offspring. **Brain Dev.**, v. 27, pp. 472-476, 2005.
- KIM, Y.C.; KIM, S.Y.; SOHN, Y.R.; Effect of age on metabolism and toxicity of ethanol in female rats. **Life Sciences**, v.74, pp. 509-519, 2003.

- KISHI, K. Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. **J. Comp. Neurol.**, v. 258, n.1, p.112-124, 1987.
- KOBASHI, M.; ICHIKAWA, H.; SUGIMOTO, T.; ADACHI, A. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema, and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci Lett.**, v. 158, pp. 47–50, 1993.
- KONSMAN, J.P.; TRIDON, V.; DANTZER, R. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. **Neuros.**, v. 101, n° 4, pp. 957–967, 2000.
- KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Renal Physiology**, Capítulo 6, pp. 93-114, 5ª Ed., Elsevier, Canadá, 2013.
- KOREN, G. Alcohol consumption in early pregnancy. **Canadian Family Physician**, v. 42, pp. 2141-2143, 1996.
- KOREN, G.; KOREN, T.; GLADSTONE, J. Mild maternal drinking and pregnancy outcome: perceived versus true risks. **Clinica Chimica Acta**, v. 246, pp.155-162, 1996.
- KORNBLUM, H.I.; HUSSAIN, R.J.; BRONSTEIN, J.M.; GALL, G.M.; LEE, D.C.; SEROOGY, K.B. Pre-natal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 380, n. 2, p. 243-261, 1997.
- KOSTOWSKY, W.; KRZAŚCIK, P. Neonatal 5-Hydroxytryptamine depletion induces depressive-like behavior in adult rats. **Pol J Pharmacol**, v. 55, pp. 957–963, 2003.
- KOTKOSKIE, L.A.; NORTON S. Cerebral cortical morphology and behavior in rats following acute prenatal ethanol exposure. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 13, pp. 776-781, 1989.
- KRAUSE, E.G.; MELHORN, S.J.; DAVIS, J.F.; SCOTT, K.A.; MA, L.Y.; DE KLOET, A.D.; BENOIT, S.C.; WOODS, S.C.; SAKAI, R.R.. Angiotensin type 1 receptors in the subfornical organ mediate the drinking and hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic isoproterenol. **Endocrinology**, v. 149, n° 12, pp. 6416–6424, 2008.
- KREIDER, J.C.; BLUMBER, M.S. Geotaxis and beyond: Commentary on Motz and Alberts. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, pp. 535-537, 2005.
- KURIYAMA, K.; RAUSCHER, G.E.; SZE, P.Y. Effect of acute and chronic administration of ethanol on the 5-hydroxytryptamine turnover and tryptophan hydroxylase activity of the mouse brain. **Brain Res**, v. 26, pp. 450–454, 1971.
- LANGRAF, R.; MALKINSON, T.; HORN, T.; VEALE, W.L.; LEDERIS, K.; PITTMAN, Q.J. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular nucleus stimulation in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 258, pp. R155–R159, 1990.
- LAUDER, J.M. Hormonal and humoral influences on brain development, **Psychoneuroendocrinology**, v. 8, pp. 121, 1983.

- LAUDER, J.M. Ontogeny of serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. **Ann NY Acad Sci.**, v. 600, pp. 297–314, 1990.
- LAUDER, J.M.; BLOOM, F.E. Ontogeny of monoamine neurons in the *locus coeruleus*. raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. **J. Comp. Neurol.**, v. 155, n° 4, pp. 469-482, 1974.
- LECHNER, S.G.; MARKWORTH, S.; POOLE, K.; SMITH, E.S.; LAPATSINA, L.; FRAHM, S.; MAY, M.; PISCHKE, S.; SUZUKI, M.; IBANˆEZ-TALLON, I.; LUFT, F.C.; JORDAN, J.; LEWIN, G.R. The molecular and cellular identity of peripheral osmoreceptors. **Neuron**, v.69, 332–344, 2011.
- LEITE-DELLOVA, D.C.A.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H⁺-ATPase in proximal S3 segments. **Am.Jour. of Phys. Renal, Fluid and Electrol. Physiol.**, v.300, p. F682-F691, 2011.
- LESHEM, M. The ontogeny of salt hunger in the rat. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 23, pp. 649-659, 1999.
- LEUNG, P.S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. **J Physiol.**, v. 580, pp. 31-37, 2007.
- LINDEMANN, B. Receptors and transduction in taste. **Nature**, v.413, pp. 219–225, 2001.
- LIEDTKE, W.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, 13698–13703, 2003.
- LEWIS, J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 9, v. 583–589, 1998.
- LIDOV, H.G.; MOLLIVER, M.E. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. **Brain Res Bull**, v. 9, pp. 559–604, 1982.
- LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.**, v. 46, pp. 321-340, 1990.
- LIGHT, K.E.; GE, Y.; BELCHER, S.M. Early postnatal ethanol exposure selectively decreases BDNF and truncated TrkB-T2 receptor mRNA expression in the rat cerebellum. **Mol Brain Res.**, v. 93, pp. 46–55, 2001.
- LIN, W.; FINGER, T.E.; ROSSIER, B.C.; KINNAMON, S.C. Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone. **J. Comp. Neurol.**, v. 405, pp. 406–420, 1999.
- LIND, R.W. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and midbrain raphe system. **Brain Res**, v. 384, pp. 250–261, 1986.
- LIVYA, D.J.; MILLERB, E.K.; MAIERB, S.E.; WEST, S.E. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, pp. 447–458, 2003.

- LLOYD TC JR.; FRIEDMAN JJ. Effect of a left atrium pulmonary vein baroreflex on peripheral vascular beds. **Am J Phys. Heart Circ Phys.**, v. 233, pp. H587–H591, 1977.
- LUHMANN, H. J.; KARPUK, N.; QU, M.; ZILLES, K. Characterisation of neuronal migration disorders in neocortical structures. Intracellular in vitro recordings. **J. Neurophysiol.**, v. 80, n. 1, p. 92-102, 1998.
- LUSKIN, M. B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. **Neuron**, v. 11(1), p.173-189, 1993.
- LOEWY, A. D.; SPYER, K. M. Central regulations of autonomic functions. **Oxford University Press**, New York, 1990.
- LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, n. 5162, p.1145-1148, 1994.
- LOKHORST, D.K.; DRUSE, M.J. Effects of ethanol on cultured fetal serotonergic neurons, **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 17, pp. 86–93, 1993.
- LOLAIT, S.J.; O'CARROLL, A.M.; MCBRIDE, O.W.; KONIG, M.; MOREL, A.; BROWNSTEIN, M.J. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. **Nature**, v. 357, pp. 336-339, 1992.
- LOPES, D.B.; NASCIMENTO, G.N.L.; CARVALHO, A.A.V.; NETO, A.C.S.; LIMA, N.E.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Immunohistochemical Study of Acute Effects of Ethanol on Midbrain of Wistar Rats Associated with the Date of Birth of Neurons in Encephalon. **International Journal of Morphology**, v. 27, pp. 677-682, 2009.
- LORENZ, J.N.; WEIHPRECHT, H.; SCHNERMANN, J.; SKØTT, O.; BRIGGS, J.P. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. **Am J Physiol.**, v. 260, F486–F493, 1991.
- LOUVI A, ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signalling in vertebrate neural development. **Nat Rev Neurosci**, v.7, pp. 93–102, 2006.
- LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biol. Psychiatry**, v. 44, pp. 151–162, 1998.
- LUO, J.; MILLER, M.W. Transforming growth factor β 1-regulated cell proliferation and expression of neural cell adhesion molecule in B104 neuroblastoma cells: differential effects of ethanol. **J. Neurochem.**, v. 72, pp. 2286–2293, 1999..
- LUZ, C.; SOUZA, A.; REIS, R.; FREGONEZE, J. B. CASTRO e SILVA, E. Role of 5HT3 and 5-HT2C receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v.1099, p. 121-132, 2006
- LUZ, C.; SOUZA, A.; REIS, R.; MINEIRO, P.; FERREIRA, H.S.; FREGONEZE, J.B.; CASTRO e SILVA, E. The central amygdala regulates sodium intake in sodium-depleted rats: Role of 5-HT3 and 5-HT2C receptors. **Brain Research**, v.1139, p. 178-194, 2007.

- MAEDA, N.; NODA, M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTP beta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth associated molecule (HB-Gan) in neuronal migration. **The J. of Cell Biology**, v. 142, n. 1, p. 203-216, 1998.
- MAIER, S.E.; CHEN, W.J.; WEST, J.R.; Prenatal binge-like alcohol exposure alters neurochemical profiles in fetal rat brain. **Phar. Bioch. Behav.**, v. 55, pp. 521-529, 1996.
- MAIER, S.E.; WEST, J.R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. **Alcohol Res Health.**, v. 25, pp. 168-174, 2001.
- MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; BUSKIRK, E.V.; ROBINSON, K.; GENESTINE, M.; DICICCO-BLOOM, E. p57KIP2 regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. **Development.**, v. 139, n° 3, pp. 475-487, 2012.
- MARGATHO, L.O.; ELIAS, C.F.; ELIAS, L.L.K.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin in the central amygdaloid nucleus modulates the neuroendocrine responses induced by hypertonic volume expansion in the rat. **Journal of Neuroend.**, v. 25, p. 466-477, 2013.
- MARGATHO, L. O.; GIUSTI-PAIVA, A.; MENANI, J. V.; ELIAS, L. L.; VIVAS, L. M.; ANTUNESRODRIGUES, J. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus in renal and hormonal responses to isotonic blood volume expansion. **Am J Physiol**, v. 297, pp. 1190-1197, 2007.
- MARGATHO, L. O.; GODINO, A.; OLIVEIRA, F. R.; VIVAS, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Lateral parabrachial afferent areas and serotonin mechanisms activated by volume expansion. **J. of Neur. Research.**, v. 86, pp. 3613-3621, 2008.
- MARIN, F.; PUELLES, L. Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus. **Dev Biol**, v. 163, n°1, pp. 19-37, 1994.
- MARTINEZ, S.; WASSEF, M.; ALVARADO-MALLART, R.M. Induction of mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene en. **Neuron**, v. 6, n° 6, pp. 971-981, 1991.
- MATSUMURA, Y.; UCHIDA, S.; RAI, T.; SASAKI, S.; MARUMO, F. Transcriptional regulation of aquaporin 2 water channel gene by cAMP. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 8, pp. 861-867, 1997.
- MATSUSAKA, T.; ICHIKAWA, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. **Annu Rev Physiol.**, v. 59, pp. 395-412, 1997.
- MAURISSEN, J.P.J; MARABLE, B.R.; ANDRUS, A.K.; STEBBINS, K.E. Factors affecting grip strength testing. **Neurotoxicology and teratology**, v. 25, pp. 543-553, 2003.
- MAY, P.A.; GOSSAGE, J.P.; KALBERG, W.O.; ROBINSON, L.K.; BUCKLEY, D.; MANNING, M.; HOYME, H.E. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent school studies. **Dev Disabil Res Rev.**, v. 15, 76-82, 2009.

- MCCANN, S.M.; GUTKOWSKA, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, pp. 165– 181, 2003.
- MCEWEN, B.S.; LAMBDA, L.T.; RAINBOW, T.C.; DE NICOLA, A.F. Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats. **Neuroendocrin**, v. 43, pp. 38– 43, 1986.
- MCGANN, K.P.; SPANGLER, J.G. Alcohol, tobacco and illicit drug use among women. **Primary Care**. v. 24, pp. 113-121, 1997.
- MCKINLEY, M.J.; BADOER, E.; VIVAS, L.; OLDFIELD, B.J. Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. **Brain Res Bull.**, v. 37, pp. 131-137, 1995.
- MCKINLEY, M.J.; GERSTBERGER, R.D.; MATHA, M.L.; OLDFIELD, B.J.; SCHMID, H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.6, n°4, pp.289-301, 1999.
- MCKINLEY, M.J.; HARDS, D.K.; OLDFIELD, B.J. Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. **Brain Res**, v. 653, pp. 305–314, 1994.
- MCKINLEY, M.J.; JOHNSON, A.K. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. **News Physiol Sci.**, v. 19: pp.1-6, 2004.
- MCKINLEY, M.J.; MATHAI, M.L.; PENNINGTON, G.; RUNDGREN, M. VIVAS, L. Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. **Am. J. Physiol.**, v. 276, pp. R673-R683, 1999.
- MCLNNES, R.R; MICHAUD, J.L. Molecular genetics of the early development of hindbrain serotonergic neurons. **Clin. Genet**. v. 68, pp. 487–494, 2005.
- MECAWI, A.S.; LEPLETIER, A.; ARAUJO, I.G.; FONSECA, F.V.; REIS, L.C. Oestrogenic influence on brain AT1 receptor signalling on the thirst and sodium appetite in osmotically stimulated and sodium-depleted female rats. **Exp Physiol.**, v. 93, pp. 1002-1010, 2008.
- MECAWI, A.S.; LEPLETIER, A.; ARAUJO, I.G.; OLIVARES, E.L.; REIS, L.C. Assessment of brain AT1-receptor on the nocturnal basal and angiotensin-induced thirst and sodium appetite in ovariectomised rats. **J. RAA Syst.**, v. 8, pp. 169-175, 2007.
- MECAWI, A.S.; VILHENA-FRANCO, T.; FONSECA, F.V.; REIS, L.C.; ELIAS, L.L.K.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of Angiotensin II on sodium appetite after a low-sodium diet. **Jour. of Neuroendocrinol.**, v. 25, pp. 281-291, 2013.
- MELLO-AIRES, M. Fisiologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1. 1.232p.
- MELLO, C.F.; KRAEMER, C.K.; FILIPPIN, A.; MORSCH, V.M.; RODRIGUES, A.L.; MARTINS, A.F.; RUBIN, M.A. Effect of lead acetate on neurobehavioral development of rats. **Brazilian Journal of Medical e Biological Research**. v. 31, p. 943-950, 1998

- MENANI, J.V.; BARBOSA, S.P.; MCKINLEY, M.J.; WADE, J.D.; DE LUCA L.A.Jr. Serotonergic mechanism of the lateral parabrachial nucleus and relaxin-induced sodium intake. **Brain Res.** V.1030, pp. 74–80, 2004.
- MENANI, J.V.; COLOMBARI, D.S.A.; BELTZ, T.G.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, v. 801, pp. 29–35, 1998a
- MENANI, J.V.; DE LUCA JR., L.A.; JOHNSON, A.K.; Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 274, pp. R555–R560, 1998b.
- MENANI, J.V.; DE LUCA JR., L.A.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Hindbrain 5-HT the rapid induction of sodium appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 279, pp. R126–R131, 2000.
- MENANI, J. V.; DE LUCA, L.A.; JOHNSON, A.K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. *Am. Jour. of Physiol. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 306, p. R201-R210, 2014.
- MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 269, pp. R1044–R1049, 1995.
- MENANI, J.V.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 270, pp. –R168, 1996.
- MENESES, A.; LIY-SALMERON G. Serotonin and emotion, learning and memory. **Rev Neurosci.**, v. 23, pp. 543-553, 2012;
- MILLER M. W. Brain Development. Normal Processes and the Effects of Alcohol and Nicotine, pp. 182–198. **Oxford Univ Press**, New York, NY, 2006.
- MILLER, M.W. Effect of prenatal exposure to alcohol on the distribution and time of origin of corticospinal neurons in the rat. **J. Comp. Neurol.** 257, pp. 372–382, 1987.
- MILLER, M.W. Exposure to ethanol during gastrulation alters somatosensory-motor cortices and the underlying white matter in the macaque. **Cereb. Cort.**, v. 17, pp. 2961-2971, 2007
- MILLER, M.W.; Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. *Alcoholism: Clin. and Exp. Res.*, **Baltimore**, v. 17, n° 2, p. 304-314, 1993.
- MILLER, M.W.; JACOBS, J.S.; YOKOYAMA, R. Neg, a nerve growth factor-stimulated gene expressed by fetal neocortical neurons that is downregulated by ethanol. **J Comp Neurol.**, v. 460, pp. 212–222, 2003.
- MILLER, M.W.; ROBERTSON, S. Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. **J. Comp. Neurol., New York**, v. 337, n° 2, p. 253-266, 1993.

- MINETTI, A.; AROLFO, M.P.; VIRGOLINI, M.B.; BRIONI, J.D.; FULGINITI, S. Spatial learning in rats exposed to acute ethanol intoxication on gestational day 8. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 53, pp. 361-367, 1996.
- MIURA, M.; OKADA, J.; TAKAYAMA, K.; JINGU, H. Barosensitive and chemosensitive neurons in the rat medulla: a double labeling study with c-Fos/glutamate, GAD, PNMT and calbindin. **J. Auton. Ner. Syst.**, v. 61, n°9, pp. 17-25, 1996.
- MOE, K.E.; WEISS, M.L.; EPSTEIN, A.N. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. **Am J Physiol.**, v. 247, pp. R356-R365, 1984.
- MOLINA, J. C.; FERREYRA-MOYANO, H.; SPEAR, L. P.; SPEAR, N. E. Acute alcohol exposure during gestational day 8 in the rat: Effects upon physical and behavioral parameters. **Alcohol**, v. 1, pp. 459-464;1984.
- MOLINA, J.C.; HOFFMANN, H.; SPEAR, L.P.; SPEAR, N.E. Sensorimotor Maturation and Alcohol Responsiveness in Rats Prenatally Exposed to Alcohol During Gestational Day 8. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 9, pp. 121-128, 1987.
- MOONEY, S.M.; MILLER, M.W. Episodic exposure to ethanol during development differentially affects brainstem nuclei in the macaque. **J Necyt.**, v. 30, pp. 973-982, 2001.
- MOONEY, S. M.; MILLER, M.W. Time-specific effects of ethanol exposure on cranial nerve nuclei: gastrulation and neuronogenesis. **Exp Neurol.**, v.205, pp. 56-63, 2007.
- MOONEY, S. M.; MILLER, M.W. Vulnerability of macaque cranial nerve neurons to ethanol is time and site-dependent. **Alcohol.**, v. 43, n° 4, pp.323-331, 2009.
- MOONEY, S.M.; & VARLINSKAYA, E.I. Acute prenatal exposure to ethanol and social behavior: Effects of age, sex, and timing of exposure. **Behav. Brain Res.**, v. 216, pp. 358-384, 2011.
- MOORE, R.; HALARIS, A.E.; JONES, B.E. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. **J Comp Neurol.**, v. 180, pp. 417-438, 1978.
- MORRIS, S. M.; ALBRECHT, U.; REINER, O.; EICHELE, G.; YU-LE, L.Y. The lissencephaly Gene product *lis1*, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. **Curr. Biol.**, Cambridge, v. 8, n. 10, p. 603-606, 1998.
- MORROW, T.; SONG, M.R.; GHOSH, A. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. **Developm.**, v.128, pp.3585-3594, 2001
- MORTON, W.J.T.; SIMONDS, J.B. On the poisonous properties of brine. **The Veterinarian** v. 29, pp. 356-358, 1856.
- MOSER, P.C. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. **Psychopharmacology**, v. 99, pp. 48-53, 1989.

- MUKHERJEE, R. A. S.; HOLLINS, S.; ABOU-SALEH, M.T.; TURK, J. Low level alcohol consumption and the fetus: Abstinence from alcohol is the only safe message in pregnancy. **B.M.G.**, v. 19, n° 330 (7488), pp. 335-336, 2005.
- MUMENTHALER, M.S.; TAYLOR, J.L.; O'HARA, R.; YESAVAGE, J.A. Gender differences in moderate drinking effects. **Alcohol Research & Health.**, v.23, n°1, pp. 55-64, 1999.
- NADARAJAH, B.; ALIFRAGIS, P.; WONG, R.O.; PARNAVELAS, J.G. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. **Cereb. Cortex**, v.13, pp. 607–611, 2003.
- NAEINI, S.R.; WITTY, M.F.; SEGUELA, P.; BOURQUE, C. W. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. **Nature**, v. 9, pp. 93-98, 2006.
- NAKAGAWA, Y.; JOHNSON, J.E.; O'LEARY, D.D. Graded and areal expression patterns of regulatory genes and cadherins in embryonic neocortex independent of thalamocortical input. **J Neurosci.**, v. 19, pp. 10877–10885, 1999.
- NEGORO, H.; HIGUCHI, T.; TADOKORO, Y.; HONDA, K. Osmoreceptor mechanisms for oxytocin release in the rat. **Jpn J Physiol.**, v. 38, pp. 19–31, 1988.
- NEILL, J.C.; COOPER, S.J.; Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats. Evidence for 5-HT_{1C} receptor mediation. **Psychopharmacol.** v. 99, pp. 196–201, 1989.
- NEWMAN, E.A.; VOLTERRA, A. Glial control of synaptic function. **Glia**, v. 47, pp. 207-208, 2004.
- NIELSEN, S.; CHOU, C.L.; MARPLES, D.; CHRISTENSEN, E.L.; KISHORE, B.K.; KNEPPER, M.A. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 92, pp. 1013-1017, 1995.
- NITABACH, M.N.; SCHULKIN, J.; EPSTEIN, A.N. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. **Behav Brain Res**, v. 35, pp.127–134, 1989.
- NODA, M. The subfornical organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. **Neuroscientist**, v. 12, pp. 80–91, 2006.
- NODA, M.; HIYAMA, T.Y. Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. **Chem Senses**, v. 30, 44–45, 2005.
- ODERMATT, A.; ARNOLD, P.; FREY, F.J. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **J Biol Chem.**, v. 276, n° 30, pp. 28484-92, 2001.

- OGIHARA, C.A.; SCHOORLEMMER, G.H.; COLOMBARI, E.; SATO, M.A. Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 42, pp. 561-516, 2009.
- OLDFIELD, B.J.; BICKNELL, R.J.; MCALLEN, R.M.; WEISINGER, R.S.; MCKINLEY, M.J. Intravenous hypertonic saline induces Fos immunoreactivity in neurons throughout the lamina terminalis. **Brain Res.**, v. 561, pp. 151–156, 1991.
- O'LEARY, D.D.; NAKAGAWA, Y. Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 12, pp. 14 –25, 2002.
- OLIVARES, E.L.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; CAVALCANTE-LIMA, H.R.; LIMA, H.R.; CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; REIS, L.C. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, pp. 1709–1716, 2003.
- OHMAN, L.E.; JOHNSON, A.K. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 251, pp. R504–R509, 1986.
- OHNO, S. The reason for as well as the consequence of the Cambrian explosion in animal evolution. **J Mol Evol**, v. 44, pp. S23-S27, 1997.
- OHTA, K.; SAKATA-HAGA, H.; FUKUI, Y. Alteration in anxiety-related behaviors and reduction of serotonergic neurons in raphe nuclei in adult rats prenatally exposed to ethanol. **Congenit. Anom.**, v. 50, n°2, pp. 105–114, 2010.
- OHRTMAN, J.D.; STANCIK, E.K.; LOVINGER, D.M.; DAVIS, M.I. Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor stimulation of extracellular signal-regulated/mitogen-activated protein kinase in cerebellar granule cells. **Alcohol.**, v. 39, pp. 29–37, 2006.
- OHTSUKA, T.; ISHIBASHI, M.; GRADWOHL, G.; NAKANISHI, S.; GUILLEMOT, F. KAGEYAMA, R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. **Emb. J.**, v. 18, n° 8, pp. 2196-2207,1999.
- OLSEN, J.; TUNTISERANEE, P. Is moderate alcohol intake in pregnancy associated with the craniofacial features related to the fetal alcohol syndrome? **Scan J. Soc. Med.**, v. 23, n° 3, pp. 27-33, 1996.
- OOI, S.L.; HENIKOFF, S. Germline histone dynamics and epigenetics. **Current Opinion in Cell Biology.**, v. 19, n° 3, pp. 257–26, 2007.
- ORLOV, S.N.; MONGIN, A. A. Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, pp.H2039–H2053, 2007.
- OSBORN, J.A.; KIM, C.K.; STEIGER, J.; WEINBERG, J. Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research**. v. 22, pp. 685–696, 1998.

- PANDEY, S.C.; UGALE, R.; ZHANG, H.; TANG, L.; PRAKASH, A. Brain chromatin remodeling: A novel mechanism of alcoholism. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n° 14, pp. 3729–3737, 2008.
- PANHUUSEN, M.; VOGT-WEISENHORN, D.M.; BLANQUET, V.; BRODSKI, C.; HEINZMANN, U.; BEISKER, W. WURST. Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. **Mol Cell Neurosci**, v. 26, pp. 101-111, 2004.
- PARDO, B.; PAINO, C. L.; CASAREJOS, M. J. & MENA, M. A. Neuronal-enriched cultures from embryonic rat ventral mesencephalon for pharmacological studies of dopamine neurons. **Brain Res. Brain Res.**, v. 1, pp. 127-132, 1997.
- PARK, P.H.; MILLER, R.; SHUKLA, S.D. Acetylation of histone H3 at lysine 9 by ethanol in rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, n°2, pp.501–504, 2003.
- PARNELL, S.E.; O’LEARY-MOORE, S.K.; GODIN, E.A.; DEHART, D.B.; JOHNSON, B.W.; JOHNSON, G.A.; STYNER, M.A.; SULIK, K.K. Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 8. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 33, n° 6, pp. 1001-1011, 2009.
- PATUSKOVAS, C.V.; VIVAS, L. Effects of intravenous captopril on c-Fos expression. Induced by sodium depletion in neurons of the lamina terminalis. **Brain Res. Bull.**, v.44, pp. 233-236, 1997.
- PEARSON, E.G.; KALLFELZ, F.A. A case of presumptive salt poisoning (water deprivation) in veal calves. **Cornell Vet.**, v. 72, pp. 142-149, 1982.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; MIKE, B. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 14, 149–167, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol., Biochem. and Beh.**, v. 24, pp. 525-529, 1986.
- PERILLAN, C., COSTALES, M.; VIJANDE, M.; ARGUELLES, J. Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst. **Physiol Behav.**, v. 92, n° 4, pp. 554-559, 2007.
- PERILLÁN, C.; NÚÑEZ, P.; COSTALES, M.; VIJANDE, M.; ARGÜELLES, J. Ingestive behavior in rat pups is modified by maternal sodium depletion. **Psicothema**. v. 3, n° 24, pp. 422-426, 2012.
- PERRON, M.; HARRIS, W.A. Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. **Cell Mol Life Sci.**, v. 57, n° 2, pp. 215-223, 2000.
- PETI-PETERDI, J.; HARRIS, R.C. Macula Densa Sensing and Signaling Mechanisms of Renin Release, **Am Soc Nephrol.**, v. 21, pp. 1093–1096, 2010.

- PETROV, T.; KRUKOFF, T.L.; JHAMANDAS, J.H. The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 318, pp. 18–26, 1992.
- POON, A.; LI, Z.; WOLFE, G.W.; LU, L.; WILLIAMS, R.W.; HAYES, N.L.; NOWAKOWSKI, R.S.; GOLDOWITZ, D.. Identification of a Chr 11 quantitative trait locus that modulates proliferation in the rostral migratory stream of the adult mouse brain. **Eur J Neurosci.**, v. 32, n° 4, pp. 523-537, 2010.
- PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Phar**, v.47, n.4, p.379-91. 1978.
- POUGH, J.H; C.M. JANIS; J.B. HEISER. **A vida dos vertebrados**. 4^a ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2008.
- POW, C.V.; MORRIS, J.F. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohipophysial peptides by exocytosis. **Neuroscience**, v. 32, pp. 435-439, 1989.
- PRAKASH, N.; BRODSKI, C.; NASERKE, T.; PUELLES, E.; GOGOI, R. PUELLES, E.; GOGOI, R.; HALL, A.; PANHUYSSEN, M.; ECHEVARRIA, D.; SUSSEL, L.; WEISENHORN, D.M.V.; MARTINEZ, S.; ARENAS, E.; SIMEONE, A.; WURST, W. A Wnt1- regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain dopaminergic progenitors in vivo. **Development**, v. 133, pp. 89–98, 2006.
- PRAKASH, N.; WURST, W. Specification of midbrain territory. **Cell Tissue Res**, v. 318, pp.5-14, 2004.
- PRIESTLEY, J.V., Immunocytochemical techniques for the localization of neurochemically characterized nerve pathways. **Chapter 3, In: Neurochemistry a practical approach**, edited by: A.J.Tuner and H.S.Bachelard, Oxford, Washington DC, pp. 65-112, 1987.
- PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. **The Eur. J. of Pharm.**, v. 463, p. 3-33, 2003.
- PURYEAR, R.; RIGATTO, K.V.; AMICO, J.A.; MORRI, M. Enhanced salt intake in oxytocin deficient mice. **Exp Neurol.**, v. 171, pp. 323–328, 2001.
- QIU, D.L.; SHIRASAKA, T.; CHU, C.P.; WATANABE, S.; YU, N.S.; KATOH, T.; KANNAN, H. Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons in vitro. **Neurosci.**, v. 355, pp. 117-120, 2004.
- RAHMAN S.; MILES, M. F. Identification of novel ethanol-sensitive genes by expression profiling. **Pharmacol. Ther.** v. 92, pp. 123–134, 2001.
- RATHBUN, W.; DRUSE, M.J. Dopamine, serotonin, and acid metabolites in brain regions from the developing offspring of ethanol-treated rats. **J. Neurochem.**, v. 44, pp. 57–62, 1985.
- RAWLAND, N.E. Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: insights from use of immediate early gene mapping. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, pp. 49–63, 1998.

- REDECKER, C.; HAGEMANN, G; WITE, O. W.; MARRET, S; EVRARD, P.GRESSENS, P. Long term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p.109-113, 1999.
- REIS, L. C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **An Acad Bras Cienc**, v. 79, pp. 261-283. 2007.
- REIS, L. C.; RAMALHO, M. J.; FAVARETTO, A. L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **PNAS**, v. 91, pp. 12022-12026. 1994.
- REIS, L. C.; RAMALHO, M. J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Effect of central administration of serotonergic agonists on electrolyte excretion control. **Braz J M Biol Res**, 24: 633-641, 1991.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n° 5532, pp. 1089–1093, 2001.
- RICE, K.K.; RICHTER, C.P. Increased sodium chloride and water intake of normal rats treated with desoxycorticosterone acetate. **Endocrinology**, v. 33, pp. 106–115, 1943.
- RICHARD, D.; BOURQUE, C.W. Synaptic activation of rat supraoptic neurons by osmotic stimulation of the organum vasculosum of the lamina terminalis. **Neuroendocrinology**, v. 55, pp. 609–611, 1992.
- RICHTER, C.P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **Am. Journ. Physiol.**v.115, pp.155-161, 1936.
- RILEY, E.P.; MCGEE, C.L. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. **Exp Biol Med.**, v. 230, pp. 357–365, 2005.
- RODGERS, R. J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Basilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, pp. 289-304, 1997
- ROUAH-ROSILIO, M.; OROSCO, M.; NICOLAIDIS, S. Serotonergic modulation of sodium appetite in the rat. **Physiol Behav.**, v. 55, pp. 811–816, 1994.
- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N.J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, pp. 297-303, 1995.
- ROOM, R.; BABOR, T.; REHM, J. Alcohol and public health. **Lancet**, v. 365, pp. 519-530, 2005.
- ROWLAND, N.E.; FREGLY, M.J.; HAN, L.; SMITH, G. Expression of Fos in rat brain in relation to sodium appetite: Furosemide and cerebroventricular renin. **Brain Res.**, v. 728, pp. 90–96, 1996.
- RUBENSTEIN, J.L. Development of serotonergic neurons and their projections. **Biol Psychiatry**, v. 44, pp. 145–150, 1998.

- RUBENSTEIN, J.L.; MARTINEZ, S.; SHIMAMURA, K.; PUELLES, L. The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. **Science**, v. 266, pp. 578–580, 1994.
- SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J. Angiotensin-(1-7) and the reninangiotensin system. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.16, pp. 122-128, 2007.
- SANNA, A.; CONGEDDU, E.; SABA, L.; PORCELLA, A.; MARCHESE, G.; RUIU, S.; CASTI, P.; SABA, P.; PANI, L. The cerebellar GABAA alpha6 subunit is differentially modulated by chronic ethanol exposure in normal (R100R) and mutated (Q100Q) sNP rats. **Brain Research**. v. 998, n. 2, p. 148-54, 2004.
- SAKAI, R.R.; CHOW, S.Y.; EPSTEIN, A.N. Peripheral angiotensin II is not the cause of sodium appetite in the rat. **Appetite**, v.15, 161–170, 1990.
- SAKAI, R.R.; MA, L.Y.; ZHANG, D.M.; MCEWEN, B.S.; FLUHARTY, S.J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendocrinology**, v. 64, pp. 425–429, 1996
- SAKAI, R.R.; MCEWEN, B.S.; FLUHARTY, S.J.; MA, L.Y. The amygdala: site of genomic and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. **Kidney Int**. v. 57, pp. 1337- 1345, 2000.
- SAKAI, R.R.; NICOLAIDIS, S.; EPSTEIN, A.N. Salt appetite is suppressed with by interference with angiotensine II and aldosterone **American Journal. Physiol.**, v.251, pp. R762-768, 1986.
- SARI, Y.; POWROZEK, T.; ZHOU, F.C. Alcohol deters the outgrowth of serotonergic neurons at midgestation. **J Biomed Sci.**, v. 8:119–125, 2001.
- SARI, Y.; ZHOU, F.C. Prenatal alcohol exposure causes long-term serotonin neuron deficit in mice. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 28, pp. 941–948, 2004.
- SATHYAN, P.; GOLDEN, H.B.; MIRANDA, R.C. Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: Evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n° 32, pp. 8546–8557, 2007.
- SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. **Prog. Brain Res.**, v. 60, pp. 19-29, 1983.
- SCARRATT, K.; COLLINS, T.J.; SPONENBERG, D.P. Water deprivation-sodium chloride intoxication in a group of feeder lambs. **J. Am. Vet. Med. As.**, v. 186, pp. 977-978, 1985.
- SCHAMBRA, U.B.; LAUDER, J.M.; PETRUSZ, P.; SULIK, K.K. Development of neurotransmitter systems in the mouse embryo following acute ethanol exposure: a histological and immunocytochemical study. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 8, pp. 507–522, 1990.

- SCHEFE, J.H.; NEWNANN, C.; GOEBEL, M. Prorenin engages the (pro)retmin receptor like retmin and both ligand activities are Wlopposed by aliskiren. **J Hypertens.** v. 26, pp. 787-794, 2008.
- SCHMIDT-NIELSEN, K., **Animal Physiology: Adaptation and Environment.** Cambridge University Press. 1997.
- SCHULKIN, J. **Sodium Hunger: The Search for a Salty Taste,** Cambridge, Cambridge University Press, 1991.
- SCHULKIN, J.; MARINI, J.; EPSTEIN, A.N. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. **Behav Neurosci.**, v. 103, pp. 179–185, 1989.
- SCHREIHOFER, A.M.; ANDERSON, B.K.; SCHILTZ, J.C.; XU, L.; SVED, A.F.; STRICKER, E.M. Thirst and salt appetite elicited by hypovolemia in rats with chronic lesions of the nucleus of the solitary tract. **Am J Physiol.**, v. 276, pp. R251-R258, 1999.
- SCHREIHOFER, A.M.; STRICKER, E.M.; SVED, A.F.. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 279, pp. R239–R247, 2000.
- SEABOLD, G.K.; LUO, J.; MILLER, M.W. Effect of ethanol on neurotrophin-mediated cell survival and receptor expression in cultures of cortical neurons. **Dev Brain Res.**, v. 108, pp. 139–145, 1998.
- SHEMER, A. V., AZMITIA, E. C., WHITAKER-AZMITIA, P. M. Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. **Dev. Brain Res.**, v. 59, pp. 59-63, 1991.
- SHEN, Q.; WANG, Y.; DIMOS, J.T.; FASANO, C.A.; PHOENIX, T.N.; LEMISCHKA, I.R.; IVANOVA, N.B.; STIFANI, S.; MORRISEY, E.E.; TEMPLE, S. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. **Nat Neurosci.** v. 9, n° 6, pp. 743-51, 2006.
- SHETTY, A.K.; BURROWS, R.C.; PHILIPS, D.E. Alterations in neuronal development in the substantia nigra pars compacta following in utero ethanol exposure immunohistochemical and Golgi studies. **Neuroscience.** v. 52, p.311-322, 1993.
- SHUEY, D.L.; SADLER, T.W.; TAMIR, H.; LAUDER, J.M. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. **Anat Embryol,** v. 187, pp. 75– 85, 1993.
- SIEGENTHALER, J.; MILLER, M.W. Ethanol disrupts cell cycle regulation in developing rat cortex interaction with transforming growth factor beta1. **J. of Neurochemistry,** v. 95, pp. 902–912, 2005.
- SIEGENTHALER, J.A.; MILLER, M.W. Transforming growth factor β 1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. **Cereb.Cortex,** v. 14, pp. 791–802, 2004.

- SIMPSON, P. Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. **Curr Opin Genet Dev**, v. 7, pp. 537-542, 1997.
- SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 33; pp. 303-314, 1971.
- SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 28; pp. 85-95, 1971.
- SMITS, J.F.M.; VAN ESSEN, H.; STRUKER-BOUDIER, A.A.J. Serotonin mediated cardiovascular responses to electrical stimulation of the raphe nuclei in the rat. **Life Sci.**, v. 23, pp. 173–178, 1978.
- SNAR, D.S.; RONCARI, C.F.; DE LUCA LA JR.; PAULA, P.M.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V. Involvement of central cholinergic mechanisms on sodium intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience Letters**, v. 534, p. 188-192, 2013.
- SOBRIAN, S.K.; BURTON, L.E.; ROBINSON, N.L.; ASHE, W.K.; JAMES, H.; STOKES, D.L.; TURNER, L.M.. Neurobehavioral and immunological effects of prenatal cocaine exposure in rat. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 35, n°3, p. 617-29, 1990.
- SOTELO, C.; CHOLLEY, B.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT1A autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. **Eur. J. Neurosci.**, v. 2, pp. 1144–1154, 1990.
- SOUZA, A.G.; VIEIRA, C.M.S.; MATEUS, M.V.C; AVERSI-FERREIRA, T.A. Estudo imunohistoquímico do cerebelo de ratos wistar submetidos à exposição aguda ao etanol no 12º dia de vida intrauterina. **Rev. Elet. Farm. UFG**, v.3, n.1, pp. 06-14, 2006.
- STOCKER, S.D.; HUNWICK, K.J.; TONEY, G.M. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. **J Physiol.**, v. 15, pp. 249-263, 2005.
- STEINBUSCH, H.W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v. 6, pp. 557–618, 1981.
- STREISSGUTH, A.P.; LANDESMAN-DWYER, S.; MARTIN, J.C.; SMITH, D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. **Science**, v. 209, p. 353-361, 1980.
- STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. **Regul Pept.**, v. 66, pp. 83–85, 1996.
- STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibitory control of sodium appetite in rats: correlation with pituitary oxytocin secretion. **Beh Neurosci.**, v. 101, pp. 560–567, 1987.

- STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Hormones and behavior. Biological basis of thirst and sodium appetite. **Am Sci.**, v. 76, pp. 261–267, 1988.
- STRICKER, E.M.; THIELS, E.; VERBALIS, J.G. Sodium appetite in rats after prolonged dietary sodium deprivation: a sexually dimorphic phenomenon. **Am J Physiol.**, v. 260, pp. R1082-R1088, 1991.
- SUGITA, M. Taste perception and coding in the periphery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, pp. 2000–2015, 2006.
- SUTER, B.; NOWAKOWSKI, R.S.; BHIDE, P.G.; CAVINESS, V.S. Navigating Neocortical Neurogenesis and Neuronal Specification: A Positional Information System Encoded by Neurogenetic Gradients. **The Jour. of Neurosc**, v. 27, n° 40, pp.10777–10784, 2007.
- STELLAR, E. Salt appetite: its neuroendocrine basis. **Act N. Exp.**, v. 5, p.p. 475- 484, 1993.
- SULIK, K. K.; JOHNSTON, M. C. Sequence of developmental alterations following acute ethanol exposure in mice craniofacial features of the fetal alcohol syndrome. **Am. J. Anat.**, v. 166, pp. 257-269; 1983.
- SULIK, K. K.; JOHNSTON, M. C.; WEBB, M. A. Fetal alcohol syndrome: Embryogenesis in a mouse model. **Science**, v. 214, pp. 936-938, 1981.
- SUMMERS, B.L.; ROFE, A.M.; COYLE, P. Prenatal Zinc Treatment at the Time of Acute Ethanol Exposure Limits Spatial Memory Impairments in Mouse Offspring. **Pediatric Research**, v. 59, pp. 66-71, 2006.
- SUNDSTROM, E.; KOLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSSON, E.B.; PSCHERA H.; LUNELL, N.O.; SEIGER, A. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain. Res. Dev. Brain. Re.s**, v. 75, pp. 1–12, 1993.
- SUPÉR, H.; SORIANO, E.; UYLINGS, H. B. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 40-64, 1998.
- TAIT. S.A.; TAIT, J.F.; COGHLAN, J.P. The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 217, n° 1-2, pp.1-21, 2004.
- TAJUDDIN, N.; DRUSE, M.J. Chronic maternal ethanol consumption results in decreased serotonergic 5-HT1 sites in cerebral cortical regions from offspring. **Alcohol**, v. 5, pp. 465-470, 1988.
- TAJUDDIN, N.F.; DRUSE, M.J. A persistent deficit of serotonin neurons in the offspring of ethanol-fed dams: protective effects of maternal ipsapirone treatment. **Brain Res Dev Brain Res.**, v. 129, pp. 181–188, 2001.

- TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS Jr., V. S. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. **J. Neurosc.**, Portland, v. 16, n. 19, p. 6183-6196, 1996.
- TAKEI, Y. Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation.; **Jpn J Physiol.** v. 50, pp. 171-186, 2000.
- 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. **Neurosci Lett.**, v. 357, pp. 41-44, 2004.
- TANAKA, J.; KARIYA, K.; NOMURA, M. Angiotensin II reduces serotonin release in the rat subfornical organ area. **Peptides.** v. 24, pp. 881-887, 2003.
- TANAKA, J.; USHIGOME, A.; HORI, K.; NOMURA, M. Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Res Bull.**, v. 45, pp. 315-318, 1998.
- THAMES, M.D.; MILLER, B.D.; ABOUD, F.M. Baroreflex regulation of renal nerve activity during volume expansion. **A J Phys H. Cir Phys** , v. 243, pp. H810-H814, 1982.
- THIBONNIER, M.; AUZAN, C.; MADHUN, Z.; WILKINS, P.; BERTI-MATTERA, L.; CLAUSER, E. Molecula cloning sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a AVP receptor. **J Biol Chem**, v. 269, pp. 3304-3310, 1994.
- THIEL, C.M.; MULLER, C.P.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K.W. High versus low reactivity to a novel environment: behavioral, pharmacological and neurochemical assessment. **Neuroscience**, v. 93, pp. 243-251, 1999.
- THORNTON, S.N.; SANCHEZ, A.; NICOLAÏDIS, S. An angiotensin-independent, hypotension induced sodium appetite in the rat. *Physiol Behav* 1995; 57: 555-61.
- THUNHORST, R.L.; EHRLICH, K.J.; SIMPSON, J.B. Subfornical organ participates in salt appetite. **Behav Neurosci.**, v. 104, pp. 637-642, 1990.
- THUNHORST, R.L.; BELTZ, T.G.; JOHNSON, A.K. Effects of subfornical organ lesions on acutely induced thirst and salt appetite. **Am. J. Physiol.**, v. 277, pp R56- R65, 1999.
- THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 266, pp. R458-465, 1994.
- THUNHORST, R.L.; XU, Z.; CICHA, M.Z.; ZARDETTO-SMITH, A.M.; JOHNSON, A.K. Fos Expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **AM. J. Physiol.**, v. 274, p. R1807-R1814, 1998.
- TORRES, C.; ESCARABAJAL, M.D. Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. **Life Sci.**, v. 70, pp. 1751-1758, 2002.
- TOTH, E.; STELFOX, J.; KAUFMAN, S. Cardiac control of salt appetite. **Am J Physiol.** v. 252, pp. R925-929, 1987.

- TREMBLAY, C.; BERRET, E.; NEHMÉ, B.; NADEAU, L.; MOUGINOT, D. Sodium Leak Channel Is Responsible for the Detection of Sodium in the Rat Median Preoptic Nucleus. **Jour. Neurophys.**, v. 105, pp. 650-660, 2010.
- TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 23, pp. 177-183, 2002.
- TYLLER, C.R.; ALLAN, A.M. Prenatal alcohol exposure alters expression of neurogenesis-related genes in an ex vivo cell culture model. **Alcohol**. v. 48, pp. 483-492, 2014.
- UEDA, S.; GU, X.F.; NARUSE, I.; WHITAKER-AZMITIA, P.M.; AZMITIA, E.C. Neuroglia neurotrophic interactions in the S-100 beta retarded mutant mouse (Polydactyl Nagoya.), **Brain Res.**, v. 633, pp. 275-277, 1993.
- US Department of Health and Human Services. US Surgeon General releases advisory on alcohol use in pregnancy. **Washington, DC: US Department of Health and Human Services**; 2005. disponível em <http://www.surgeongeneral.gov/pressreleases>.
- UZBEKOV, M. G.; MURPHY, S.; ROSE, S. P. R. Ontogenesis of serotonin “receptors” in different regions of rat brain. **Brain Res.**, v. 168, pp. 195-199, 1979.
- VALLES, S.; SANCHO-TELLO, M.; MINÁNA, R.; CLIMENT, E.; RENAU-PIQUERASM, J.; GUERRI, C. Glial fibrillary Acidic Protein Expression in Rat Brain and in Radial Glia Culture is Delayed by Prenatal Ethanol Exposure. **J. Neurochem.**, v. 67, n. 6, p. 2425-2433, 1996.
- VAN DEN POL, A.N. The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. **J Comp Neurol.**, v. 20, pp. 317-345, 1982.
- VAN ESCH, J.H.; SCHUIJT, M.P.; SAYED, J.; CHOUDHRY, Y.; WALTHER, T.; JAN DANSER, A. H. AT2 receptor-mediated vasodilation in the mouse heart depends on AT1A receptor activation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, pp. 452-458, 2006.
- VARLINSKAYA, E.I.; MOONEY, S.M. Acute exposure to ethanol on gestational day 15 affects social motivation of female offspring. **Behav Brain Res.**, v.15, pp.106-109, 2014.
- VELEZ-DOMINGUES, L.C. Neuronal migration disorders. **Gac. Med. Mex.**, Mexico, v. 134, n. 2, p. 207-215, 1998
- VERBALIS, J.G. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v. 17(4), p.p. 471–503, 2003.
- VERNEY, E.B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc Soc Lond B Biol.**, v. 135, pp. 25–105, 1947.
- VIGLIECCA, N.S, MOYANO, H. F.; MOLINA, J.C. Acute prenatal alcohol exposure in rats: a behavioral study. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.**, v. 36, pp. 463–472, 1986.

- VIGLIECCA, N. S.; FULGINITI, S.; MINETTI, S. A. Acute ethanol exposure during pregnancy in rats: Effects upon a multiple learning task. **Alcohol**, v. 6, pp. 363-368, 1989.
- VILLA, P.S.; CAMARGO, G.M.; CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A. Activation of paraventricular nucleus of hypothalamus 5-HT_{1A} receptor on sodium intake. **Regulatory Peptides**, v.140, n.3, p. 142-147, 2007.
- VIVAS, L.; CHIARAVIGLIO, E. The effects of reversible lidocaine-induced lesion of the tissue surrounding the anterior ventral wall of the third ventricle on drinking in rats. **Behav Neural Biol.**, v. 57, pp. 124-130, 1992.
- VIVAS, L.; CHIARAVIGLIO, E.; CARRER, H.F. Rat organum casculosum lamina terminalis in vitro: responses to change in sodium concentration. **B. Res.**, v. 519, pp. 294-300, 1990.
- VIVAS, L.; GODINO, A.; DALMASSO, C.; CAEIRO, X.; MACCHIONE, F.; CAMBIASSO, M.J. Neurochemical circuits subserving fluid balance and baroreflex: a role for serotonin, oxytocin and gonadal steroids. In **“Neurobiology of Body Fluids Homeostasis: Transduction and Integration”**. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Ed. De Luca Jr., L.A; Johnson, A.K.; Menani, J.V. 2013
- VIVAS, L.; PATUSKOVAS, C.V.; TONELLI, L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.**, v. 679, pp. 31-34, 1995.
- XIONG, Y.; LIU, R., XU, Y.; DUAN, L.; CAO, R.; TU, L.; ZHAO, G.; RAO, Z. Effects of vagotomy, splanchnic nerve lesion and fluorocitrate on the transmission os caute hyperosmotic stress signals to the supraoptic nucleus. **J. Neurosci. Res.**, v. 89, n° 2, pp. 256-266, 2011.
- XU, Z.; HERBERT, J. Effects of unilateral or bilateral lesions within the anteroventral third ventricular region on c-fos expression induced by dehydration or angiotensin II in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. **Brain Res.**, v. 713, pp. 36–43, 1996.
- YAMAMOTO, T.; SASAKI, S.; FUSHIMI, K.; ISHIBASHI, K.; YAOITA, E.; KAWASAKI, K.; MARUMO, F.; KIHARA, I. Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. **Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.**, v. 268, pp. F1546–F1551, 1995.
- YANG, Z.F.; EPSTEIN, A.N.; Blood-borne and cerebral angiotensin and the genesis of salt intake. **Hormo Behav.**, v. 25, pp. 461–476, 1991.
- YE, W.; SHIMAMURA, K.; RUBENSTEIN, J.L.; HYNES, M.A.; ROSENTHAL, A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. **Cell**, v. 93, pp. 755-766, 1998.
- YUAN, H.; GAO, B.; DUAN, L.; JIANG, S.; CAO, R.; XIONG, Y.F.; RAO, Z.R. Acute hyperosmotic stimulus-induced Fos expression in neurons depends on activation of astrocytes in the supraoptic nucleus of rats. **J. Neu. Res.**, v. 88, pp. 1364-1373, 2010.

- WADDINGTON, C.H. The epigenotype. 1942. **International Journal of Epidemiology**. v. 41, n° 1, pp. 10–13, 2012.
- WALKER, B.R.; CHILDS, M.E; ADAMS, E.M. Direct cardiac effects of vasopressin: role of V1- and V2 vasopressinergic receptors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 255, pp. H261–H265, 1988.
- WALLACE, J.A.; LAUDER, J.M. Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. **Brain Res Bull**, v. 10, pp. 459–479, 1983.
- WANG, M.Z.; JIN, P.; BUMCROT, D.A.; MARIGO, V.; MCMAHON, A.P.; WANG, E.A.; WOOLF, T. PANG, K. Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. **Nat Med**, v. 1, n° 11, pp. 1184–1188, 1995.
- WANG, X.; GOMUTPUTRA, P.; WOLGEMUTH, D.J.; BAXI, L.V. Acute alcohol exposure induces apoptosis and increases histone H3K9/18 acetylation in the mid-gestation mouse lung. **Reproductive Sciences**. v.17, n° 4, pp. 384–390, 2010.
- WANG, L.L.; ZHANG, Z.; LI, Q.; PEI, X.; XU, Y.; WANG, J.; ZHOU, S.F.; LI, Y. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. **Human Reproduction**. v. 24, n°3, pp. 562–579, 2009.
- WATANABE, E.; FUJIKAWA, A.; MATSUNAGA, H.; YASOSHIMA, Y.; SAKO, N.; YAMAMOTO, T.; SAEGUSA, C.; NODA, M. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **J Neurosci**, v. 20, pp. 7743–7751, 2000.
- WATANABE, E.; HIYAMA, T.Y.; SHIMIZU, H.; KODAMA, R.; HAYASHI, N.; MIYATA, S.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K.; NODA, M. Sodium level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminae processes in the sensory circumventricular organs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, pp. R568–R576, 2006.
- WEBSTER, W. S.; WALSH, D. A.; LIPSON, A. H.; MCEWEN, S. E. Teratogenesis after acute alcohol exposure in inbred and outbred mice. **Neurobehav. Toxicol.**, v. 2, pp. 227–234, 1980.
- WEISINGER, R.S.; BLAIR-WEST, J.R.; CHEN, N., BURNS, P.; WEISINGER, H.S. **Neurobiology of Sodium Appetite. In: Neurobiology of Food and Fluid Intake, 2^a ed.**, STRICKER, E.; WOODS, S. , Handbook of Behavioral Neurobiology, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA v. 14, pp. 545– 585. 2004.
- WEISINGER, R.S.; BLAIR-WEST, J.R.; DENTON, D.A.; TARJAN, E. Central administration of atrial natriuretic peptide suppresses sodium and water intake of sheep. **Brain Res.**, v. 579, pp. 113–118, 1992.
- WEISINGER, R.S.; DENTON, D.A.; DI NICOLANTONIO, R; HARDS, D.K.; MCKINLEY, M.J.; OLDFIELD, B.; OSBORNE, P.G. Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. **Brain Res.**, v. 526, pp.23–30, 1990.

- WEISINGER, R.S.; DENTON, D.A.; MCKINLEY, M.J.; MULLER, A.F.; TARJAN, E. Cerebrospinal fluid sodium concentration and salt appetite. **Brain. Research.** v. 326, pp. 95–105, 1985.
- WEST, G.L.; SOBOTKA, T.J.; BRODIE, R.E.; BEIER, J.M.; O'DONNELL, M.W. Jr. Postnatal neurobehavioral development in rats exposed in utero to caffeine. **Neurobehav Toxicol Teratol.** v. 8, p. 29-43, 1986.
- WEST, C.H.; WEISS, J.M. A selective test for antidepressant treatments using rats bred for stress-induced reduction of motor activity in the swim test. **Psychopharmacology.** v. 182, pp. 9–23, 2005.
- WHISHAW, I.Q.; KOLB, B. The behavior of the laboratory rat. Oxford: **Oxford University Press.** 2005.
- WHITAKER-AZMITIA, P.M. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. **Pharmacol. Rev.,** v. 43, n° 4, pp. 553–561., 1991.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M. & AZMITIA, E. C. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. **Neurosci. Lett.,** v. 67, pp. 307-312, 1986.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M. & AZMITIA, E. C. Stimulation of astroglial 5-HT₁ receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. **Brain Res.,** v. 528, pp. 155-158, 1990.
- WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology,** v. 52, p. 90-110, 2005.
- WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neuroscience and Beh. Rev.,** v. 16, pp. 525-534, 1992.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology,** v. 93, p. 358-364, 1987.
- WHO, Department of Mental Health and Substance Abuse: **Global Status Report on Alcohol: 2004,** Geneva, Switzerland, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Department of Mental Health and Substance Abuse.** Global Status Report on Alcohol 2013. Geneva: WHO. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2013.
- WIDMARK, J.; GÖREL, S.; DAZA, D.O.; LARHAMMAR, D. Differential Evolution of Voltage-Gated Sodium Channels in Tetrapods and Teleost Fishes. **Mol. Biol. Evol.,** v. 28, n°1, pp.859–871, 2011.

- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, p. 358-364, 1987.
- WILLNER, P.; SAMPSON, D.; PAPP, M.; PHILLIPS, G.; MUSCAT, R. **Animals models of anhedonia**. In: Anxiety, Depression, and Mania. Animal Models of Psychiatric Disorders, edited by Soubrié P. Basel, Switzerland: Karger 1991, p. 71-99.
- WOLF, G. Effect of deoxycorticosterone on sodium appetite of intact and adrenalectomized rats. **Am. J. Physiol.**, v. 208, pp. 1281–1285, 1965.
- WOLPERT, L. Positional information and the spatial pattern of cell differentiation. **J. Theor. Biol.**, v. 25, pp. 1–47. 1969.
- WRIGHT, J.W.; HARDING, J.W. Brain renin-angiotensin: a new look at an old system. **Prog Neurobiol.**; v. 95, pp. 49-67, 2011.
- WURST, W.; BALLY-CUIF, L. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. **Nat Rev Neurosci.**, v. 2, pp. 99-108, 2001.
- XAVIER, G. F. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo: Editora Plêiade, 241p., 1999.
- ZHANG D.M.; EPSTEIN, A.N.; SCHULKIN J. Medial region of the amigdala involvement in adrenal steroid-induced salt appetite. **Brain Res**, v. 600, p. 20–26, 1993.
- ZHANG, L.; GOLDMAN, J.E. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. **Jour. Comp. Neurol.** v. 370, p. 536- 550, 1996.
- ZHOU, F.C.; SARI, Y.; ZHANG, J.K.; GOODLETT, C.R.; LI, T. Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 126, pp. 147–155, 2001.
- ZHOU, F.C.; SARI, Y.; LI, T.K.; GOODLETT, C.; AZMITIA, E.C. Deviations in brain early serotonergic development as a result of fetal alcohol exposure. **Neurotox Res.**, v. 4, pp. 337–342, 2002.
- ZHOU, F.C.; SARI, Y.; POWROZEK, T.A. Fetal alcohol exposure reduces serotonin innervation and compromises development of the forebrain along the serotonergic pathway. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 29, pp.141–149, 2005.