

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR**  
CENTRO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PARTICIPAÇÃO DA ÁREA SEPTAL MEDIAL NAS RESPOSTAS  
SIALOGOGA, DIPSOGÊNICA E CARDIOVASCULAR  
INDUZIDAS PELA PILOCARPINA.**

**Orientadora: Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari**

**Renata Fabris Paulin**

SÃO CARLOS  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR**  
CENTRO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PARTICIPAÇÃO DA ÁREA SEPTAL MEDIAL NAS RESPOSTAS  
SIALOGOGA, DIPSOGÊNICA E CARDIOVASCULAR  
INDUZIDAS PELA PILOCARPINA.**

**Renata Fabris Paulin**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia.

SÃO CARLOS

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P328pa

Paulin, Renata Fabris.

Participação da área septal medial nas respostas sialogoga, dipsogênica e cardiovascular induzidas pela pilocarpina / Renata Fabris Paulin. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

103 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Fisiologia. 2. Área septal. 3. Salivação. 4. Pressão arterial. 5. Ingestão de água. 6. Pilocarpina. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Renata Fabris Paulin

Profª. Dra. Patrícia Maria de Paula.....*Patrícia M. de Paula*

Profª. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.....*Luciane Helena Gargaglioni Batalhão*

Profª. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi.....*Juliana Irani Fratucci de Gobbi*

## **DEDICATÓRIA**

A minha família: aos meus pais, Darci e Osvaldo e ao meu irmão Ricardo que sempre foram um exemplo para mim e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

- A Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari pela orientação tanto na iniciação científica quanto no mestrado, pela dedicação, amizade e por me ensinar tudo que eu sei sobre Fisiologia.
- Aos professores do laboratório, José Vanderlei Menani, Patrícia Maria De Paula, Laurival Antonio De Luca Jr e Eduardo Colombari pela dedicação e pelas sugestões e ajuda no decorrer do meu trabalho.
- Aos meus queridos amigos do laboratório e principalmente a Graziela, André, Beto e Lili pela amizade, companheirismo e pelo conhecimento adquirido nesses anos de convivência.
- Aos funcionários do laboratório: Ana Victor, Silas P. Barbosa, Reginaldo C. Queiroz, Silvana Malavolta e Sílvia Fógliã pela amizade e pelo auxílio técnico prestado ao meu trabalho.
- Aos meus queridos amigos Marina, Andréa, Fabiane, Emileine, Plínio, Marcela e Carla pela companhia, amizade durante toda a realização desse trabalho.
- A minha família: aos meus pais, Darci e Osvaldo; meu irmão, Ricardo; minha cunhada, Grasielle; em especial a minha tia Vera e minha madrinha Márcia pelo apoio, amor e dedicação e por estarem tão presentes na minha vida.
- A todos os professores do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas do convênio UFScar/ UNESP.
- A FAPESP (processo: 06/54716-3) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## PENSAMENTO

De tudo, ficaram três coisas:

a certeza de que ele estava sempre começando,

a certeza de que era preciso continuar e

a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo.

Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.

(Fernando Sabino)



## **RESUMO**

A injeção periférica de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal), agonista colinérgico muscarínico, induz salivação, ingestão de água e resposta pressora. A área septal medial (ASM) é uma importante área cerebral envolvida com a regulação cardiovascular e com o controle do balanço hidroeletrólítico. No presente estudo, investigamos: 1) o efeito da lesão eletrolítica da ASM ou do bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos da ASM na salivação, na ingestão de água e nas respostas cardiovasculares induzida pela pilocarpina periférica; 2) a participação do sistema nervoso simpático e da vasopressina sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina periférica; 3) os efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação, ingestão de água e respostas cardiovasculares. Ratos Holtzman (280 - 320 g), foram submetidos à lesão eletrolítica (2 mA x 5 s) da ASM (1 ou 15 dias) ou ao implante de cânula-guia de aço inoxidável na ASM. Verificamos que a injeção periférica de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) produz secreção salivar, ingestão de água e aumento da pressão arterial média (PAM). Este aumento da pressão arterial é decorrente da ativação do sistema nervoso simpático, pois foi reduzida significativamente pelo tratamento prévio com prazosin (1 mg/kg de peso corporal), mas não pelo antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (10  $\mu$ g/kg de peso corporal). A salivação e a resposta dipsogênica induzidas pela pilocarpina periférica foram reduzidas pela lesão eletrolítica ou pelo bloqueio colinérgico muscarínico da ASM. Entretanto, a resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica não depende da ASM, já que a lesão eletrolítica ou o bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos da ASM não alteraram esta resposta. A injeção de pilocarpina na ASM induz resposta dipsogênica (200 e 500 nmol/0,5  $\mu$ L), salivação (500 nmol/0,5  $\mu$ L) e resposta pressora (500 nmol/0,5  $\mu$ L). Nossos resultados mostram que a pilocarpina periférica ou na ASM induz salivação, ingestão de água e resposta pressora. A resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica é decorrente de um aumento na atividade simpática. A ASM e seus receptores colinérgicos muscarínicos participam do controle da secreção salivar e ingestão de água, mas não da resposta

pressora induzida pela pilocarpina periférica, sugerindo um controle diferencial da ASM nas respostas induzidas pela administração periférica de pilocarpina.

**Palavras-chaves:** área septal, agonista colinérgico muscarínico, salivação, ingestão de água, pressão arterial, prosencéfalo.

## **ABSTRACT**

Peripheral injection of pilocarpine (PILO, 1 mg/Kg of body weight), muscarinic cholinergic agonist, induce salivation, water intake and pressor response. The medial septal area (MSA) is an important brain area involved in cardiovascular regulation and hydroelectrolytic control. In this present study, we investigated: 1) the effect of MSA electrolytic lesion or the blockade of muscarinic cholinergic receptors into MSA on salivation, water intake and cardiovascular responses induced by peripheral pilocarpine; 2) the role of the sympathetic nervous system and/or vasopressin on the cardiovascular responses induced by peripheral pilocarpine; 3) the effect of injection of pilocarpine into MSA on salivation, water intake and cardiovascular responses. Male Holtzman rats weighing 280 to 320 g were submitted to 1 or 15 days MSA electrolytic lesion (2 mA x 5 s) or stainless steel guide cannulas were stereotaxically implanted into the MSA. We observed that peripheral pilocarpine (1 mg/kg of body weight) induces salivary secretion, water intake and an increase in mean arterial pressure (MAP) . This increase in MAP is due to an activation of sympathetic nervous system, since it was significantly reduced by previous treatment with prazosin (1 mg/kg of body weight), but not by vasopressin  $V_{1a}$  receptor antagonist (10  $\mu$ g/kg of body weigh). The salivary secretion and dipsogenic response induced by peripheral pilocarpine was reduced by MSA eletrolytic lesion or MSA muscarinic cholinergic blockade. Nonetheless, the pressor response induced by peripheral pilocarpine was not depend of MSA, since MSA eletrolytic lesion or muscarinic cholinergic receptors blockade did not change this response. Pilocarpine injection into MSA induced water intake (200 e 500 nmol/0,5  $\mu$ L), salivary secretion (500 nmol/0,5  $\mu$ L) and MAP increase (500 nmol/0,5  $\mu$ L). Our results show that peripheral or MSA injection of pilocarpine induce salivary secretion, water intake and pressor response. The pressor response induced by peripheral pilocarpine is due to sympathetic activation. The MSA and its muscarinic cholinergic receptors are involved in the salivary secretion and water intake, but not in the control of pressor response induced by peripheral pilocarpine, suggesting that MSA has a differential control on the responses induced by peripheral pilocarpine.

**Key-words:** septal area, muscarinic cholinergic agonist, salivation, water intake, blood pressure, forebrain.

## **LISTA DE FIGURAS**

**FIGURA 1:** Fotomicrografia de corte transversal do prosencéfalo de um animal representativo do grupo mostrando o local de lesão da ASM (seta). ca: comissura anterior, VL: ventrículo lateral. Aumento de 12,5 X.

**FIGURA 2:** Fotomicrografia de corte transversal do prosencéfalo de um animal representativo do grupo mostrando o local de injeção na ASM (seta). ca: comissura anterior, VL: ventrículo lateral. Aumento de 12,5 X.

**FIGURA 3:** Esquema mostrando o espalhamento da metil-atropina na ASM. O bregma inicial é de 1,56mm e o bregma final é de 0,12 mm.

**FIGURA 4:** Secreção salivar induzida pela pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip ou salina ip em ratos com: **A)** lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF) ou **B)** lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF). \* diferente de salina ip e † diferente de LF + PILO ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher;  $P < 0,05$ .

**FIGURA 5:** Ingestão de água induzida pela pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip ou salina ip em ratos com: **A)** lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF) ou **B)** lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF). \* diferente de salina ip e † diferente de LF + PILO ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de duas vias associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 6:** **A)** variação da pressão artéria média (PAM) em ratos com lesão aguda (1 hora) da ASM ou lesão fictícia (LF), **B)** variação da frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão aguda (1 hora) da ASM ou lesão fictícia (LF) após a administração

intravenosa (iv) de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ou salina. \*diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 7:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM) em ratos com lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF), **B)** variação da frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão aguda (1 dia) da ASM ou LF após a administração intravenosa (iv) de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ou salina. \*diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 8:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM) em ratos com lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF), **B)** variação da frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão crônica (15 dias) da ASM ou LF após a administração intravenosa (iv) de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ou salina. \*diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 9:** Ingestão diária de água em ratos submetidos à lesão ASM ou lesão fictícia (LF). A lesão foi realizada no dia 0 (seta). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias associado ao teste LSD de Fisher.

**FIGURA 10:** Secreção salivar após pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip ou salina ip em ratos pré-tratados com metil-atropina na ASM ou salina na ASM: **A)** metil-atropina (4 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM, **B)** metil-atropina (8 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM. \* diferente de salina ip e † diferente de salina na ASM + PILO ip. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de

animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 11:** Ingestão de água induzida pela pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip em ratos pré-tratados com metil-atropina ou salina na ASM: **A)** metil-atropina (4 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM, **B)** metil-atropina (8 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM. \* diferente de salina ip e † diferente de salina na ASM + PILO ip. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 12:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos em ratos pré-tratados com metil-atropina (4 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. \* diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 13:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos em ratos pré-tratados com metil-atropina (8 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. \* diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 14:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de acetilcolina (8 nmol/0,1 mL/rato) iv antes e após metil-atropina (4 nmol/ 0,5  $\mu$ L) na ASM. \* diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via de com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 15:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam prévia injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) ou salina seguida de injeção iv de pilocarpina (PILO, 1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 16:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam prévia injeção iv de prazosin (1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal) ou salina seguida de injeção iv de pilocarpina (PILO, 1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal). \* diferente de salina iv + PILO iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via de com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 17:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam prévia injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) e de prazosin (1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal) ou salina seguida de injeção iv de pilocarpina (PILO, 1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal). \* diferente de salina iv + PILO iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via de com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 18:** **A)** secreção salivar após pilocarpina (PILO, 100  $\text{nmol}/0,5 \mu\text{L}$ ) ou salina na ASM, **B)** secreção salivar após pilocarpina (PILO, 200  $\text{nmol}/0,5 \mu\text{L}$ ) na ASM ou salina na ASM, **C)** secreção salivar após pilocarpina (PILO, 500  $\text{nmol}/0,5 \mu\text{L}$ ) na ASM ou salina na ASM. \* diferente de salina na ASM. Os resultados foram



expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 19:** **A)** ingestão de água após pilocarpina (PILO, 100 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM, **B)** ingestão de água após pilocarpina (PILO, 200 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM, **C)** ingestão de água após pilocarpina (PILO, 500 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM. \* diferente de salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 20:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de pilocarpina (100 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 21:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de pilocarpina (200 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**FIGURA 22:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de pilocarpina (500 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. \* diferente de salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**TABELA 1:** Salivação em ratos que receberam injeção de metil-atropina (4 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

**TABELA 2:** Salivação em ratos que receberam injeção de metil-atropina (8 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

**TABELA 3:** Ingestão de água em ratos que receberam injeção de metil-atropina (4 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

**TABELA 4:** Ingestão de água em ratos que receberam injeção de metil-atropina (8 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

**TABELA 5:** Alterações cardiovasculares induzidas pela pilocarpina em ratos tratados com metil-atropina ou salina injetados ao redor da ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

**TABELA 6:** Alterações cardiovasculares induzidas pela pilocarpina em ratos tratados com antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu$ g/kg de peso corporal) e/ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais.

### **ABREVIATURAS:**

Acetil-CoA = acetil-coenzima A

Ach = acetilcolina

APM = área pré-óptica medial

ASM = área septal medial

AV3V = região anteroventral do terceiro ventrículo

BDB= banda diagonal de Broca

ca = comissura anterior

FC = frequência cardíaca

HL = hipotálamo lateral

icv = intracerebroventricular

ip = intraperitoneal

iv = intravenosa

LF = lesão fictícia

MnPo = núcleo pré-óptico mediano

NPV = núcleo paraventricular do hipotálamo

NSO= núcleo supra-óptico

OSF = órgão subfornical

OVLT = órgão vasculoso da lâmina terminal

PAM = pressão arterial média

PAP = pressão arterial pulsátil

PILO = pilocarpina

SNC = sistema nervoso central

VL = ventrículo lateral

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>3.1. Animais</b> .....	26
<b>3.2. Técnica de lesão eletrolítica da ASM</b> .....	26
<b>3.3. Técnica de implante de cânula-guia na ASM</b> .....	27
<b>3.4. Microinjeção de drogas</b> .....	27
<b>3.5. Coleta da Saliva</b> .....	27
<b>3.6. Medida de ingestão de água</b> .....	28
<b>3.7. Registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados e anestesiados</b> .....	28
<b>3.8. Drogas</b> .....	28
<b>3.9. Histologia</b> .....	29
<b>3.10. Análise Estatística</b> .....	29
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	30
<b>4.1. Estudo dos efeitos da lesão eletrolítica da ASM sobre a salivação e sobre as respostas dipsogênicas e cardiovasculares induzidas pela pilocarpina periférica</b> 30	
<b>4.1.1. Efeitos da lesão eletrolítica da ASM (1 ou 15 dias) na secreção salivar induzida pela pilocarpina ip</b> .....	30
<b>4.1.2. Efeitos da lesão eletrolítica da ASM (1 ou 15 dias) sobre a ingestão de água em ratos tratados com pilocarpina ip</b> .....	30
<b>4.1.3. Efeitos da lesão eletrolítica na ASM (1 hora) sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela injeção de pilocarpina iv em ratos anestesiados</b> 31	
<b>4.1.4. Efeitos da lesão eletrolítica na ASM (1 ou 15 dias) sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela injeção de pilocarpina iv em ratos não anestesiados</b> .....	31
<b>4.2. Estudo dos efeitos do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a salivação, sobre a resposta dipsogênica e sobre a resposta pressora induzidas pela pilocarpina periférica</b> .....	32

4.2.1. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip.....	32
4.2.2. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a resposta dipsôgenica induzida pela pilocarpina ip.....	32
4.2.3. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre as respostas cardiovasculares induzida pela pilocarpina iv em ratos acordados.....	33
4.2.4. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre as respostas cardiovasculares induzida pela acetilcolina iv em ratos acordados.....	33
4.3. Participação do sistema nervoso simpático e da vasopressina sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina.....	34
4.3.1. Efeito do bloqueio dos receptores de vasopressina ( $V_{1a}$ ) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina .....	34
4.3.2. Participação do sistema nervoso simpático sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina.....	35
4.3.3. Efeitos do duplo bloqueio (simpático e vasopressinérgico) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina.....	35
4.4. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação, sobre a resposta dipsogênica e sobre as respostas cardiovasculares.....	36
4.4.1. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação .....	36
4.4.2. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a ingestão de água .....	36
4.4.3. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados .....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Histologia .....	38
5.2. Esquema com o espalhamento da metil-atropina na ASM.....	40
5.3. Efeitos da lesão eletrolítica na ASM (1 ou 15 dias) sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip .....	42
5.4. Efeitos da lesão eletrolítica da ASM (1 ou 15 dias) sobre a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip .....	44

<b>5.5.</b> Efeitos da lesão eletrolítica (1 hora) da ASM sobre as alterações na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela pilocarpina iv em ratos anestesiados .....	46
<b>5.6.</b> Efeitos da lesão eletrolítica (1 ou 15 dias) da ASM sobre as alterações na PAM e FC induzidas pela pilocarpina iv em ratos não anestesiados .....	48
<b>5.7.</b> Efeitos da lesão da ASM sobre a ingestão diária de água .....	51
<b>5.8.</b> Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip .....	52
<b>5.9.</b> Efeitos do bloqueio colinérgico muscarínico ao redor da ASM sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip .....	54
<b>5.10.</b> Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip .....	58
<b>5.11.</b> Efeitos do bloqueio colinérgico ao redor da ASM sobre a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip .....	60
<b>5.12.</b> Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela pilocarpina iv .....	64
<b>5.13.</b> Efeitos do bloqueio colinérgico ao redor da ASM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina iv.....	67
<b>5.14.</b> Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre as alterações cardiovasculares induzida pela acetilcolina iv.....	69
<b>5.15.</b> Participação do simpático e da vasopressina sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina .....	71
<b>5.16.</b> Efeito do bloqueio dos receptores de vasopressina ( $V_{1a}$ ) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina iv .....	71
<b>5.17.</b> Participação do sistema nervoso simpático sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina.....	73
<b>5.18.</b> Efeito do duplo bloqueio (simpático e vasopressinérgico) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina .....	75
<b>5.19.</b> Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação .....	77
<b>5.20.</b> Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre ingestão de água .....	79

<b>5.21. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados .....</b>	<b>81</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental na regulação cardiovascular, no controle da ingestão de água e da salivação (Loewy, 1991; Renzi et al., 1993; Dampney, 1994; McKinley e Johnson, 2004; Whyte e Johnson, 2005). A ativação de determinadas áreas do SNC promove a alteração na atividade do sistema nervoso autônomo, secreção de hormônios, ativação de vias de sede e também secreção salivar. Tanto áreas do tronco cerebral, como áreas mais anteriores encefálicas estão envolvidas nestas funções regulatórias (Loewy, 1991; Renzi et al., 1993; Dampney, 1994; McKinley e Johnson, 2004; Whyte e Johnson, 2005).

Com relação às áreas mais anteriores do cérebro envolvidas com regulação cardiovascular e com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico podemos destacar a área septal medial (ASM), que é um subnúcleo da área septal ou septum (Negro-Vilar et al., 1967; Tanaka et al., 1988; Donevan and Ferguson, 1988; Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1994; Haibara et al., 1994; Callera et al., 1994). A área septal, que possui extensão rostro-caudal de 1,56 mm (Swanson e Cowan, 1979), pode ser dividida em uma porção medial (ASM), porção lateral (área septal lateral), em uma porção posterior e finalmente em uma porção ventral. A ASM é constituída primariamente de células colinérgicas e gabaérgicas (Freund e Antal, 1988; Jones e Yakel, 1997). Os neurônios colinérgicos bem como os não-colinérgicos presentes na ASM e na Banda Diagonal de Broca (BDB), que fica ventral à ASM, são ricos em receptores colinérgicos (Rouse e Levey, 1996), sejam eles muscarínicos (Disko et al., 1999) ou nicotínicos (Thinschmidt et al., 2005). Ademais, estudo utilizando hibridização *in situ* detectou a presença do RNAm da enzima colina-acetiltransferase, que cataliza a ligação da Acetil-CoA com a colina, formando a acetilcolina (Bender et al., 1999), mostrando que células da ASM tem a enzima necessária para a síntese da acetilcolina.

Dados neuroanatômicos demonstraram que a ASM envia projeções para a área pré-óptica medial (APM) e hipotálamo lateral (HL) (Meibach e Siegel, 1977a; Swanson e Cowan, 1979), que são regiões hipotalâmicas muito importantes para a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico e também importantes para o controle da secreção salivar (Kucharczyk e Mogenson, 1975; Kucharczyk et al., 1976; Haibara et al., 1994; Renzi et al., 2002; Lopes de Almeida et al., 2006). A ASM também envia



projeções aos núcleos paraventricular do hipotálamo (NPV) e supra-óptico (NSO), que contém os neurônios que secretam vasopressina e ocitocina (Oldfield et al., 1985). Por outro lado, a ASM recebe importante projeção do núcleo subfornical (OSF) (Swanson e Cowan, 1979; Ferguson et al., 1985; Donevan e Ferguson, 1988), que também está muito envolvido com o controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico (Simpson e Routtenberg, 1973; Tanaka et al., 1988; Donevan e Ferguson, 1988; Colombari et al., 1992a; Babic et al., 2004).

Interações funcionais de diferentes áreas do SNC, como o OSF, HL e área pré-óptica lateral com a ASM para o controle do equilíbrio hidroeletrolítico e regulação cardiovascular foram descritos (Franci et al., 1980; Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1992b; Colombari et al., 1994; Haibara et al., 1994). Franci e cols. (Franci et al., 1980) utilizando lesões eletrolíticas, mostraram uma interação entre a ASM e o HL para o controle da natriurese e caliurese induzida pela estimulação colinérgica dessas áreas. Foi demonstrado também que a lesão eletrolítica da ASM reduz as respostas pressora, natriurética e dipsogênica induzida pela injeção intracerebroventricular (icv) do agonista colinérgico, carbacol (Luiz et al., 1991). Uma interação funcional entre a ASM e o OSF, que é um órgão circumventricular, livre de barreira hematoencefálica e rico em receptores de angiotensina II e receptores colinérgicos [revisão em (Johnson e Loewy, 1990)] também foi demonstrada (Colombari et al., 1994). Neste trabalho, ratos com lesão da ASM tiveram uma redução da ingestão de água e da resposta pressora induzida pela angiotensina II injetada no OSF, enquanto que apenas a resposta pressora, mas não a dipsogênica induzida pela injeção de carbacol no OSF foi reduzida, sugerindo a existência de vias centrais separadas responsáveis pela ingestão de água induzida pela ativação colinérgica ou angiotensinérgica do OSF (Colombari et al., 1994).

Em adição aos estudos que empregaram lesão da ASM, trabalhos da literatura que utilizaram injeções de drogas centralmente, demonstraram que a estimulação adrenérgica ou colinérgica da ASM produz uma forte resposta dipsogênica, natriurética e pressora (Saad et al., 1976; Colombari et al., 1992b; Haibara et al., 1994). Ademais, Rocha e cols. (Rocha et al., 1985) mostraram a importância de vias colinérgicas e adrenérgicas da ASM para as respostas natriuréticas e caliuréticas à injeção icv de salina hipertônica em ratos, sugerindo uma interação entre os tecidos periventriculares e a ASM neste controle.

Entretanto, efeitos inibitórios para a ingestão de água foram observados em estudos que utilizaram uma lesão extensa da área septal, envolvendo mais de um subnúcleo (Blass e Hanson, 1970; Blass et al., 1974). De maneira semelhante, a estimulação elétrica de sítios localizados na área septal lateral promoveram hipotensão (Calaresu et al., 1976), enquanto que a estimulação com o agonista colinérgico carbacol na ASM produz aumento da pressão arterial (Colombari et al., 1992b; Haibara et al., 1994). Em conjunto, esses dados sugerem que embora o septum possa ter uma função heterogênea, a ASM teria um efeito preferencialmente excitatório sobre o controle da ingestão de água e sobre a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico.

A pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico inicialmente extraído da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi*, age sobre as glândulas salivares e sudoríparas, produzindo vasodilatação das artérias que irrigam as glândulas e conseqüente salivação e sudorese (Ferguson, 1993). Este efeito sialogogo, ou seja, a capacidade de induzir salivação, da pilocarpina tem sido usado clinicamente para a redução dos sintomas da xerostomia, que é caracterizada por uma redução/ausência da secreção salivar, e conseqüentemente boca seca, dificuldade de alimentação, desconforto ao falar (Ferguson, 1993). Embora uma ação direta da pilocarpina em receptores localizados nas glândulas salivares estimulando a secreção salivar seja um mecanismo bastante aceitável, estudos recentes têm demonstrado que a maior parte da salivação induzida pela injeção mesmo que periférica de pilocarpina depende de mecanismos encefálicos. Podemos citar, por exemplo, trabalhos em que a salivação induzida pela pilocarpina periférica (intraperitoneal, ip) foi reduzida pela lesão eletrolítica de estruturas prosencefálicas, como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), o HL e a APM (Renzi et al., 1993; Renzi et al., 2002; Lopes de Almeida et al., 2006). Outro dado experimental importante é que a injeção icv de pilocarpina também produz intensa salivação, que também é bloqueada pela lesão da região AV3V ou do HL (Renzi et al., 1993; Renzi et al., 2002). Portanto, estes estudos demonstraram claramente que a secreção salivar induzida pela pilocarpina administrada periférica ou centralmente depende de estruturas cerebrais. Além dos estudos de lesões, Takakura e cols. (Takakura et al., 2003b) demonstraram que a secreção salivar induzida pela pilocarpina ip foi reduzida após a injeção de metil-atropina icv. Este estudo sugere que a secreção salivar induzida pela

injeção ip de pilocarpina além de ativar receptores colinérgicos muscarínicos periféricos, também ativa receptores colinérgicos muscarínicos centrais (Takakura et al., 2003b). Até o momento não sabemos se a ASM participa das vias centrais envolvidas com a secreção salivar. Uma vez que a ASM tem uma estreita relação com a região AV3V (Colombari et al., 1992b) e o com o HL (Meibach e Siegel, 1977b; Swanson e Cowan, 1979), sendo que este último se projeta diretamente para os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do núcleo salivatório (Jansen et al., 1992) e diretamente para as glândulas salivares (Hübschle et al., 1998), seria possível que a ASM fizesse parte da circuitaria neural envolvida na secreção salivar induzida pela pilocarpina.

Além da secreção salivar, a injeção periférica (ip) de pilocarpina promove aumento da pressão arterial associada a um aumento na resistência vascular mesentérica, sem alterações na resistência para os membros posteriores ou na frequência cardíaca (Moreira et al., 2003a; Takakura et al., 2005). Este efeito pressor da pilocarpina ip muito se assemelha aos efeitos na pressão arterial após a injeção central de agonistas colinérgicos, como o carbacol (Hoffman et al., 1977; Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1992b; Colombari et al., 1994; Haibara et al., 1994). De fato, os efeitos cardiovasculares da pilocarpina ip dependem do SNC (Takakura et al., 2005), haja vista que a lesão aguda (1 h a 7 dias) da região AV3V bloqueia a resposta pressora induzida pela pilocarpina ip, sendo que 1 h ou 2 dias após a lesão, a resposta pressora da pilocarpina ip é até mesmo convertida em hipotensão, mostrando que o efeito pressor da pilocarpina depende exclusivamente de mecanismos centrais (Takakura et al., 2005). Na ausência destes mecanismos encefálicos, aparece apenas o efeito periférico hipotensor da pilocarpina que é semelhante ao da acetilcolina (Feigl, 1975; Takakura et al., 2005).

A pilocarpina ip, também produz uma vasodilatação na arteríola que irriga as glândulas salivares, que pode contribuir para a secreção salivar (Takakura et al., 2005). Visto que o efeito na pressão arterial induzido pela pilocarpina ip tem uma grande dependência de mecanismos encefálicos e que alterações na hemodinâmica podem alterar o fluxo sanguíneo que irriga as glândulas salivares, associado ao fato que a ASM tem receptores colinérgicos e tem conexões com regiões do encéfalo importantes para o equilíbrio hidroeletrólítico, também nos propusermos a estudar a participação da ASM sobre a resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica.

Outro efeito interessante da pilocarpina é que este agonista quando injetado ip induz ingestão de água (Fregly, 1980; Fregly et al., 1981; Sato et al., 2006). Ou seja, a pilocarpina além de aumentar a secreção salivar e a pressão arterial, também produz sede. A resposta dipsogênica da pilocarpina ip parece também depender de mecanismos encefálicos, pois a injeção de metil-atropina icv reduz esta ingestão de água (Sato et al., 2006). De maneira semelhante ao observado na pressão arterial, os efeitos da pilocarpina ip na ingestão de água, também se assemelham aos efeitos de agonistas colinérgicos injetados centralmente (Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1992a; Colombari et al., 1992b; Colombari et al., 1994; Haibara et al., 1994). Ou seja, também neste caso, é possível que haja uma possível participação da ASM nas respostas dipsogênicas induzidas pela pilocarpina ip.

Considerando a grande participação da ASM nos efeitos cardiovasculares e dipsogênicos induzidos pelas injeções centrais de agonistas colinérgicos, como o carbacol, é possível que haja uma participação da ASM nas respostas pressora, dipsogênica e sialogoga induzidas pela administração periférica do agonista colinérgico muscarínico pilocarpina. Outros estudos interessantes, que ainda não foram realizados, são verificar os efeitos na secreção salivar, ingestão de água e nas respostas cardiovasculares induzidas pela injeção de pilocarpina na ASM.

## **2. OBJETIVOS**

Portanto, os objetivos da dissertação presente foram:

- 1) verificar os efeitos da lesão eletrolítica da ASM sobre a salivação, resposta dipsogênica e respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina periférica;
- 2) verificar os efeitos do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a salivação, resposta dipsogênica e respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina periférica;
- 4) verificar a participação do sistema nervoso simpático (componente neural) e da secreção de vasopressina (componente hormonal) nas respostas cardiovasculares induzida pela pilocarpina periférica;
- 3) verificar os efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação, ingestão de água e respostas cardiovasculares.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***3.1. Animais***

Foram utilizados ratos Holtzman com peso variando entre 280 a 320 g, procedentes do Biotério do Câmpus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos com água de torneira e ração granulada *ad libitum* em gaiolas individuais. A temperatura ambiente foi de  $23 \pm 2$  °C, e o ciclo claro/escuro definido por luzes acesas das 7:30 às 20:00. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (protocolo: CEEA 14/2006).

#### ***3.2. Técnica de lesão eletrolítica da ASM***

Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o periósteo foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas, e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Determinado o ponto de introdução do eletrodo, foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica, tomando-se o cuidado para evitar lesão do seio venoso longitudinal. Através desse orifício, após o afastamento cuidadoso do seio venoso longitudinal com auxílio de uma agulha hipodérmica, foi introduzido um eletrodo de tungstênio, isolado em toda extensão, exceto 0,5 mm da extremidade. Os parâmetros estereotáxicos utilizados para a localização da área septal medial (ASM) foram baseados nos parâmetros estereotáxicos do Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1986), a saber: AP = 0,7 mm rostral ao bregma; L = 0,0 mm do seio venoso; V = 5,8 mm abaixo da superfície do osso. A lesão eletrolítica foi realizada por meio de duas correntes de 2 mA por 5 s, com intervalo de 30 s entre elas. Nos ratos com lesão fictícia (LF), o eletrodo foi posicionado nas mesmas coordenadas, exceto que não foi passada corrente. Após a lesão, a pele foi suturada e uma dose profilática de penicilina (50.000 UI) foi injetada intramuscularmente e uma dose de antiinflamatório foi injetada subcutaneamente (Ketoflex 1 %, 0,5 mg/kg de peso corporal).

### ***3.3. Técnica de implante de cânula na ASM***

Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o periósteo foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas, e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Determinado o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável (12 x 0,7 mm d.i.), foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica, tomando-se o cuidado para evitar lesão do seio venoso longitudinal. Através desse orifício, após o afastamento cuidadoso do seio venoso longitudinal com auxílio de uma agulha hipodérmica, a cânula foi introduzida baseado nos parâmetros estereotáxicos do Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986), a saber: AP = 0,7 mm rostral ao bregma; L= 0,0 mm do seio venoso; V = 3,8 mm abaixo da superfície do osso. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica e uma dose profilática de penicilina (50.000 UI) foi injetada intramuscularmente e uma dose de antiinflamatório foi injetada subcutaneamente (Ketoflex 1 % 0,5mg/kg de peso corporal).

### ***3.4. Microinjeção de drogas***

As injeções na ASM foram feitas com seringa de microlitro Hamilton (5 µL), conectada a uma cânula injetora de aço inoxidável com 14 mm de comprimento (2 mm a mais que a cânula-guia implantada na ASM), através de um tubo de polietileno (PE-10). O volume injetado foi de 0,5 µL.

### ***3.5. Coleta da Saliva***

Para testar a secreção salivar, em ratos anestesiados com ketamina (100 mg/kg peso corporal) a cavidade oral foi secada com algodão, e quatro pequenas bolas de algodão pré-pesadas foram inseridas na cavidade oral de cada rato: uma de cada lado entre os dentes e a mucosa bucal, e uma acima e outra abaixo da língua. As bolas de algodão foram removidas após 7 minutos e pesadas novamente em uma balança (Ohaus balance, 0.0001 g). A massa de saliva secretada foi calculada subtraindo o peso inicial

com o peso final das quatro bolas de algodão. Esta técnica foi descrita anteriormente por Renzi e cols. (Renzi et al., 1993).

### ***3.6. Medida de ingestão de água***

A quantidade de água ingerida foi quantificada por meio de buretas de vidro graduadas em 0,1 mL, adaptadas com um bico de metal. Os animais não tiveram acesso à ração durante os experimentos de ingestão.

### ***3.7. Registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados e anestesiados***

No dia anterior ao experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a canulação da artéria e veia femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e infusão de drogas respectivamente. As cânulas consistiam em tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50. No final da canulação da artéria e veia femoral, as cânulas foram exteriorizadas e suturadas na pele do dorso do animal. As cânulas foram então preenchidas com uma solução de heparina 2% (Liquemine, Roche, 500 U.I.). No dia seguinte, a cânula para registro da pressão arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Gould) e acoplado a um amplificador (ETH-200, CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). A PAP, PAM e a FC foram registradas simultaneamente. A PAM foi calculada a partir do sinal de PAP. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP.

### ***3.8. Drogas***

- cloridrato de pilocarpina injetada periféricamente (1 mg/kg de peso corporal) ou injetada na ASM (100, 200 e 500 nmol/0,5 µL): agonista colinérgico muscarínico.



- metil-atropina (brometo de metil-atropina), 4 e 8 nmol/0,5 µL: antagonista colinérgico muscarínico. Essas doses foram usadas baseadas em estudos anteriores do laboratório (Takakura et al., 2003b).
- fenilefrina 5 µg/kg de peso corporal: agonista adrenérgico  $\alpha$ 1.
- prazosin 1 mg/kg de peso corporal: antagonista  $\alpha$ 1-adrenoceptor.
- Vasopressina 12 ng/0,1 mL por rato: agonista vasopresinérgico.
- [B–Mercapto–B,B-cyclopentamethylenepropionyl,O-me-Tyr<sup>2</sup>,Arg<sup>8</sup>]-vasopressina (composto de Manning; antagonista seletivo de receptor de vasopressina V<sub>1a</sub> (10 µg/kg de peso corporal).
- cloridrato de acetilcolina (8 nmol/0,1 mL por rato): agonista colinérgico.

Todas as drogas foram adquiridas da Sigma, USA.

Todas as drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,15 M).

### **3.9. Histologia**

Ao final dos experimentos, os animais receberam injeção de 0,5 µL de corante na ASM, exceto os animais que sofreram lesão eletrolítica da ASM ou lesão fictícia e sob anestesia profunda com tiopental de sódio (60 mg/kg de peso corporal), o coração dos animais foi exposto cirurgicamente e foi realizada primeiramente perfusão de solução salina isotônica e a seguir de solução de formalina a 10%. A seguir, os encéfalos foram retirados e mergulhados no mesmo agente fixador por pelo menos 72h. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em cortes coronais de 50 µm de espessura em um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R). Os cortes obtidos foram corados pela técnica de Nissl para posterior análise do local da lesão ou implante de cânula na ASM.

### **3.10. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA, uma ou duas vias conforme o indicado) seguida de teste LSD de Fisher ou teste *t* de Student foram usados para comparações. O índice de significância foi fixado em  $P < 0,05$ .

## **4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

### ***4.1. Estudo dos efeitos da lesão eletrolítica da ASM sobre a salivação e sobre as respostas dipsogênicas e cardiovasculares induzidas pela pilocarpina periférica***

Com o objetivo de verificar se as vias neurais da ASM estão envolvidas com as respostas induzidas pela administração de pilocarpina periférica, a saber: secreção salivar, ingestão de água e respostas cardiovasculares, foram realizados grupos de animais diferentes para cada procedimento experimental. Dentro de cada protocolo, foram realizados grupos de animais com lesão aguda ou crônica e seus respectivos controles com lesão fictícia. A administração de pilocarpina foi realizada intraperitonealmente (ip) ou intravenosamente (iv), conforme o protocolo experimental.

#### ***4.1.1. Efeitos da lesão eletrolítica da ASM (1 ou 15 dias) na secreção salivar induzida pela pilocarpina ip***

Animais com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da ASM e seus respectivos grupos com lesão fictícia (LF), foram anestesiados com ketamina, (100 mg/kg de peso corporal). Após serem anestesiados, foi realizada uma injeção de pilocarpina ip (1 mg/kg de peso corporal). Um outro grupo com lesão ASM ou LF recebeu injeção de salina ip (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal). Após 10 minutos da injeção de pilocarpina ip ou salina ip, as bolas de algodão pré-pesadas foram inseridas na cavidade oral e a saliva foi coletada por 7 minutos.

O período de 7 minutos para a coleta da saliva foi escolhido, pois: a) sob a ativação com pilocarpina, uma quantidade significativa de volume é secretada nesses 7 minutos; b) as quatro bolas de algodão têm capacidade de incorporar (ou absorver) toda a saliva secretada durante estes 7 minutos pela ativação pela pilocarpina na dose utilizada neste estudo. Esta metodologia foi descrita anteriormente por Renzi e cols. (Renzi et al., 1993).

#### ***4.1.2. Efeitos da lesão eletrolítica da ASM (1 ou 15 dias) sobre a ingestão de água em ratos tratados com pilocarpina ip***

Em outro grupo de ratos com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da ASM e seus respectivos grupos com LF, a ingestão de água foi induzida pela administração de pilocarpina ip (1 mg/kg de peso corporal). Um outro grupo com lesão ASM ou LF recebeu injeção de salina ip (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal). Imediatamente após a injeção ip de pilocarpina ou salina, as buretas de água foram oferecidas aos animais e as medidas foram feitas aos 15, 30, 45, 60 minutos. Durante todo o experimento os animais não tiveram acesso à ração.

#### ***4.1.3. Efeitos da lesão eletrolítica na ASM (1 hora) sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela injeção de pilocarpina iv em ratos anestesiados***

Um grupo de animais foi submetido a canulação da artéria e veia femorais no dia anterior ao experimento. No dia seguinte, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados para o registro das variáveis cardiovasculares. A seguir, os ratos foram anestesiados com uma mistura de  $\alpha$ -cloralose (60 mg/kg) e uretana (1,0 g/kg), submetidos à traqueostomia para reduzir a resistência nas vias aéreas, e procedeu-se a lesão eletrolítica da ASM ou lesão fictícia (LF). Após uma hora da lesão eletrolítica da ASM ou LF, foi feita a administração de salina iv (NaCl 0,15 M 1 mg/kg de peso corporal), e 30 min após, foi realizada a administração de pilocarpina iv (1 mg/kg de peso corporal).

#### ***4.1.4. Efeitos da lesão eletrolítica na ASM (1 ou 15 dias) sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela injeção de pilocarpina iv em ratos não anestesiados***

No grupo com lesão aguda (1 dia) da ASM, a canulação da artéria e veia femorais foi realizada imediatamente após a lesão da ASM ou LF. No grupo com lesão crônica da ASM, a canulação da artéria e veia femorais foi realizada 14 dias após a lesão da ASM ou LF. No dia seguinte a canulação, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados para o registro das variáveis cardiovasculares. Após 20 min de registro controle, foi feita a administração de salina iv (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal), e 30 min após, foi realizada a administração iv de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal). Este protocolo foi realizado em ratos acordados.

Nos animais com lesão crônica da ASM, foi feita a medida da ingestão diária de água nos ratos com lesão eletrolítica da ASM ou LF desde 1 dia antes até o 12º dia após a lesão, com o objetivo de verificar se a lesão eletrolítica da ASM altera a ingestão diária de água como trabalhos anteriores mostram que a lesão total da área septal promove hiperdipsia.

#### ***4.2. Estudo dos efeitos do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a salivação, sobre a resposta dipsogênica e sobre a resposta pressora induzidas pela pilocarpina periférica***

Os objetivos destes protocolos foram verificar se vias colinérgicas da ASM estão envolvidas com os efeitos na secreção salivar, na ingestão de água e sobre os efeitos cardiovasculares induzidos pela pilocarpina periférica (ip ou iv).

##### ***4.2.1. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip***

Animais com implante de cânulas na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal). Após serem anestesiados, metil-atropina (4 ou 8 nmol/0,5 µL) ou salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) foram injetados na ASM 15 min antes da injeção de pilocarpina ip (1 mg/kg de peso corporal) ou salina ip. Após 10 minutos da injeção ip de pilocarpina ou salina, as bolas de algodão pré-pesadas foram inseridas na cavidade oral e a saliva foi coletada por 7 minutos. Os protocolos realizados foram: metil-atropina (ASM) + pilocarpina ip, salina (ASM) + pilocarpina ip, metil-atropina (ASM) + salina ip, salina (ASM) + salina ip. Metade do grupo dos animais recebeu um tratamento e outra metade recebeu outro tratamento. A cada dois dias os protocolos eram invertidos de maneira contrabalanceada, de forma que todos os animais receberam todos os tratamentos. Foram realizados grupos experimentais diferentes para cada dose de metil-atropina.

##### ***4.2.2. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre a resposta dipsôgenica induzida pela pilocarpina ip***

Em outro grupo de ratos com implante de cânulas na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, a ingestão de água foi induzida pela administração de pilocarpina ip (1 mg/kg de peso corporal). Metil-atropina (4 ou 8 nmol/0,5 µL) ou salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) foram injetadas na ASM 15 min antes da injeção ip de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) ou salina ip. Imediatamente após as injeções de pilocarpina ou salina ip, as buretas de água foram oferecidas aos animais e as medidas foram feitas aos 15, 30, 45, 60 minutos. Durante todo o experimento os animais não tiveram acesso à ração. Os protocolos realizados foram: metil-atropina (ASM) + pilocarpina ip, salina (ASM) + pilocarpina ip, metil-atropina (ASM) + salina ip, salina (ASM) + salina ip. Metade do grupo dos animais recebeu um tratamento e outra metade recebeu outro tratamento. A cada dois dias os protocolos eram invertidos de maneira contrabalanceada, de forma que todos os animais receberam todos os tratamentos. Foram realizados grupos experimentais diferentes para cada dose de metil-atropina.

#### ***4.2.3. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre as respostas cardiovasculares induzida pela pilocarpina iv em ratos acordados***

Em um grupo com implante na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, a canulação da artéria e veia femorais foi realizada no dia anterior ao experimento. No dia seguinte, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados para o registro das variáveis cardiovasculares. As variáveis cardiovasculares foram analisadas em ratos acordados. Os animais receberam salina iv (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg peso corporal) e posterior injeção de metil-atropina (4 ou 8 nmol/ 0,5 µL) ou salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) na ASM 15 minutos antes da injeção iv de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal). Metade do grupo dos ratos recebeu salina na ASM + pilocarpina iv e a outra metade recebeu metil-atropina na ASM + pilocarpina iv. Os grupos foram invertidos no dia seguinte. No dia seguinte os protocolos foram invertidos, de forma que todos os animais receberam todos os tratamentos. Foram realizados grupos experimentais diferentes para cada dose de metil-atropina.

#### ***4.2.4. Efeito do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM sobre as respostas cardiovasculares induzida pela acetilcolina iv em ratos acordados***

Com o objetivo de verificar se há uma possível alteração causada pela injeção de metil-atropina na ASM sobre as respostas induzidas pela pilocarpina periférica era decorrente de extravasamento da metil-atropina para a periferia, em um grupo de ratos com implante na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, foi feita a canulação da artéria e veia femorais no dia anterior ao experimento. No dia seguinte, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados para o registro das variáveis cardiovasculares. As variáveis cardiovasculares foram analisadas em ratos acordados, que receberam salina iv 15 minutos antes da injeção de acetilcolina (8 nmol/0,1 mL por rato) iv. Dez minutos após a injeção de acetilcolina iv, metil-atropina (4 nmol/0,5 µL) foi injetada na ASM. Quinze minutos após a injeção de metil-atropina na ASM, foi injetado novamente acetilcolina iv.

#### ***4.3. Participação do sistema nervoso simpático e da vasopressina sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina periférica***

Os objetivos destes protocolos foram verificar a participação do componente neural (simpático) e hormonal (vasopressina) sobre a resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica.

##### ***4.3.1. Efeito do bloqueio dos receptores de vasopressina ( $V_{1a}$ ) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina***

Em um grupo de ratos, foi realizada a canulação da artéria e veia femorais no dia anterior ao experimento. No dia seguinte, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados para o registro das variáveis cardiovasculares realizadas em ratos acordados. Os animais receberam a injeção do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10 µg/kg de peso corporal) ou salina (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal). Quinze minutos após, foi feita a injeção iv de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal). Metade do grupo recebeu salina iv + pilocarpina iv e a outra metade recebeu antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning) iv + pilocarpina iv. No dia seguinte os grupos foram invertidos, de forma que todos os animais receberam todos os tratamentos. A eficácia do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de

vasopressina foi testada pela injeção iv de vasopressina (12 ng/0,1 mL por rato) antes e 60 min após a injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina.

#### ***4.3.2. Participação do sistema nervoso simpático sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina***

Em um grupo de ratos, foi realizada a canulação da artéria e veia femorais no dia anterior ao experimento. No dia do experimento, os animais receberam a injeção prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal). Quinze minutos após, foi feita a injeção iv de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal). Metade do grupo recebeu salina iv + pilocarpina iv e a outra metade recebeu prazosin iv + pilocarpina iv. No dia seguinte os grupos foram invertidos, de forma que todos os animais receberam todos os tratamentos. A eficácia do prazosin foi testada pela injeção iv de fenilefrina (5  $\mu$ g/kg de peso corporal) antes e 60 min após a injeção iv de prazosin.

#### ***4.3.3. Efeitos do duplo bloqueio (simpático e vasopressinérgico) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina***

Em um grupo de ratos, foi realizada a canulação da artéria e veia femorais no dia anterior ao experimento. No dia do experimento, os animais receberam a injeção iv de prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal) seguida após 2 min da injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu$ g/kg de peso corporal) ou de salina (NaCl 0,15 M, 1 mg/kg de peso corporal). Quinze min após o duplo bloqueio foi feita à injeção iv de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal). Metade do grupo dos ratos recebeu salina iv + salina iv + pilocarpina iv e a outra metade receberam prazosin iv + antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina iv + pilocarpina iv. No dia seguinte os grupos foram invertidos, de forma que todos os animais receberam todos os tratamentos. A eficácia do prazosin e do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina foi testada pela injeção iv de fenilefrina (5  $\mu$ g/kg de peso corporal) e de vasopressina (12 ng/0,1 mL por rato) antes e 60 min após a injeção iv de prazosin e do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina.

#### ***4.4. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação, sobre a resposta dipsogênica e sobre as respostas cardiovasculares***

Os objetivos destes protocolos foram verificar os efeitos da ativação direta de receptores colinérgicos muscarínicos na ASM pela pilocarpina sobre a secreção salivar, a ingestão de água e sobre os efeitos cardiovasculares.

##### ***4.4.1. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação***

Animais com implante de cânulas na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal). Após serem anestesiados, salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) foi injetada na ASM e após 10 min as bolas de algodão pré-pesadas foram inseridas na cavidade oral e a saliva foi coletada durante 7 minutos. Cinco minutos após a coleta de saliva após salina na ASM, foi feita a injeção de pilocarpina na ASM (100, 200 ou 500 nmol/0,5 µL). Após 10 minutos da injeção de pilocarpina na ASM, bolas de algodão pré-pesadas novamente foram inseridas na cavidade oral e a saliva foi coletada por 7 minutos. Os mesmos animais receberam na ASM injeções das diferentes doses de pilocarpina, em intervalos de dois dias entre cada injeção. As doses de pilocarpina na ASM foram realizadas de maneira aleatória.

##### ***4.4.2. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a ingestão de água***

Em outro grupo de ratos com implante de cânulas na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, a ingestão de água foi induzida pela administração de pilocarpina na ASM (100, 200 ou 500 nmol/0,5 µL) e de salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL). Salina foi injetada na ASM e imediatamente após a injeção, buretas de água foram oferecidas aos animais e as medidas foram feitas durante 60 minutos em intervalos de 15 minutos cada. No final desta 1 h, foi injetado pilocarpina na ASM (100, 200 ou 500 nmol/0,5 µL) e imediatamente após as medidas de ingestão de água foram feitas aos 15, 30, 45 e 60 minutos. Durante todo o experimento os animais não tiveram acesso à ração. Os mesmos animais receberam na ASM injeções de diferentes doses de pilocarpina, em intervalos de dois dias entre cada injeção. As doses de pilocarpina na ASM foram realizadas de maneira aleatória.



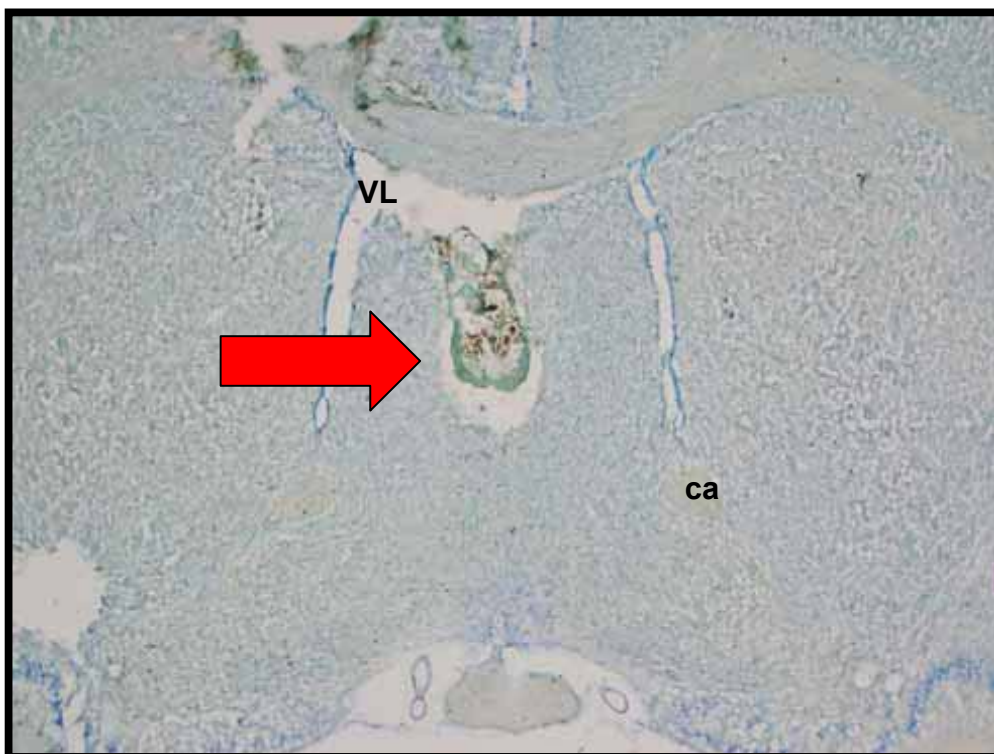
#### ***4.4.3. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados***

Em outro grupo de animais com implante de cânula-guia na ASM, realizado 5 a 7 dias antes do experimento, foi realizada a canulação da artéria e veia femorais no dia anterior ao registro das variáveis cardiovasculares. Em ratos acordados, foi feita a injeção de salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) na ASM 15 min antes da injeção de pilocarpina (100, 200 ou 500 nmol/0,5 µL) na ASM. Os protocolos foram realizados durante três dias seguidos em todos os animais, e as doses de pilocarpina foram injetadas de forma aleatória.

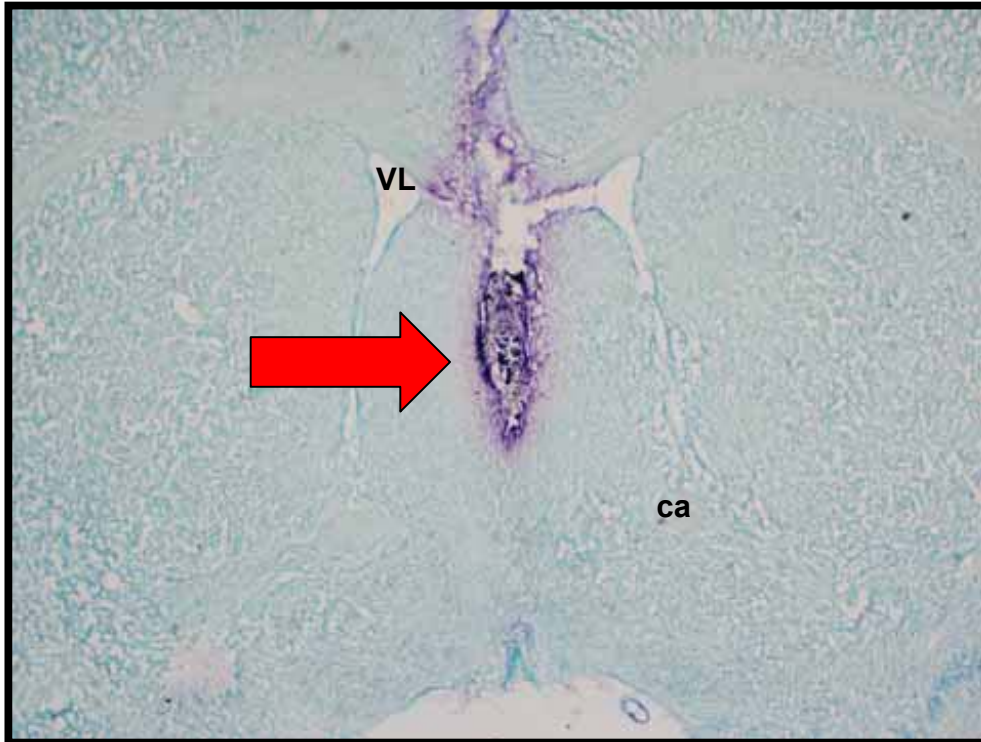
## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Histologia**

As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, fotomicrografias representativas de um animal com lesão eletrolítica da ASM e outro animal com microinjeção na ASM.



**FIGURA 1:** Fotomicrografia de corte transversal do prosencéfalo representativo de um animal do grupo mostrando o local de lesão da ASM (seta). ca: comissura anterior, VL: ventrículo lateral. Aumento de 12,5 X.



**FIGURA 2:** Fotomicrografia de corte transversal do prosencéfalo representativo de um animal do grupo mostrando o local de injeção na ASM (seta). ca: comissura anterior, VL: ventrículo lateral. Aumento de 12,5 X.

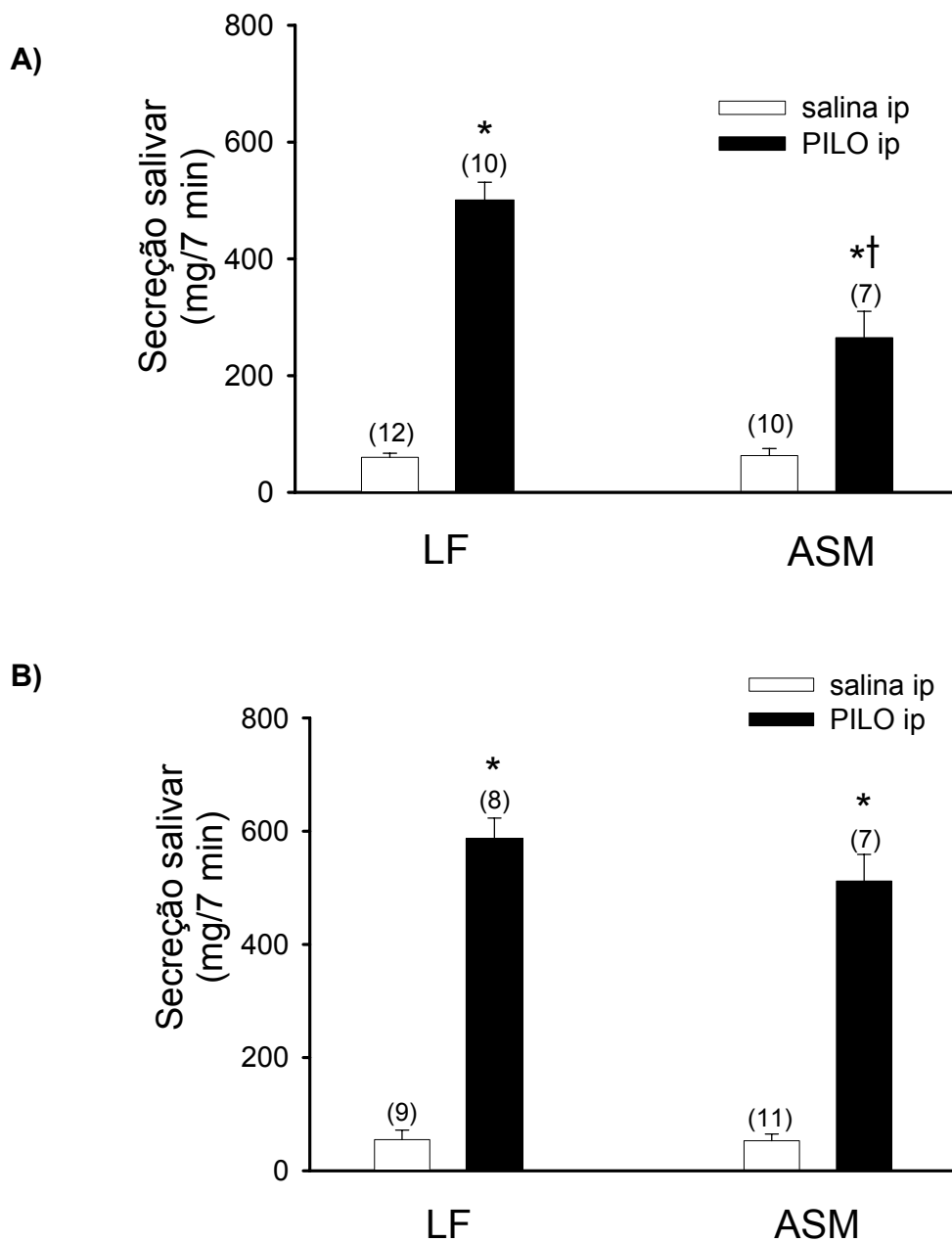




### **5.3. Efeitos da lesão eletrolítica na ASM (1 ou 15 dias) sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip**

Como podemos observar na figura 4A, a injeção ip de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) promoveu um aumento na secreção salivar nos ratos com lesão fictícia (LF,  $501 \pm 30$  vs. salina ip:  $60 \pm 7$  mg/7 min), bem como nos ratos com lesão aguda (1 dia) da ASM ( $262 \pm 45$  vs. salina ip:  $64 \pm 12$  mg/7 min). Entretanto, a salivação induzida pela PILO ip foi reduzida pela lesão aguda da ASM ( $262 \pm 45$  vs. LF:  $501 \pm 30$  mg/7 min), [F(3,35) = 91,848; P < 0,001].

No grupo com lesão crônica da ASM (15 dias), podemos observar na figura 4B que a injeção ip de PILO também promoveu um aumento na secreção salivar nos ratos com lesão fictícia ( $588 \pm 37$  vs. salina ip:  $55 \pm 17$  mg/7 min) e nos ratos com lesão crônica da ASM ( $512 \pm 47$  vs. salina ip:  $53 \pm 12$  mg/7 min), [F (3,31) = 98,406; P < 0,001]. No entanto, ao contrário do observado nos ratos com lesão aguda da ASM, a salivação induzida pela PILO nos ratos com lesão crônica da ASM foi equivalente à observada nos ratos LF (lesão ASM:  $512 \pm 47$  vs. LF:  $587 \pm 36$  mg/7 min), (P > 0,05).



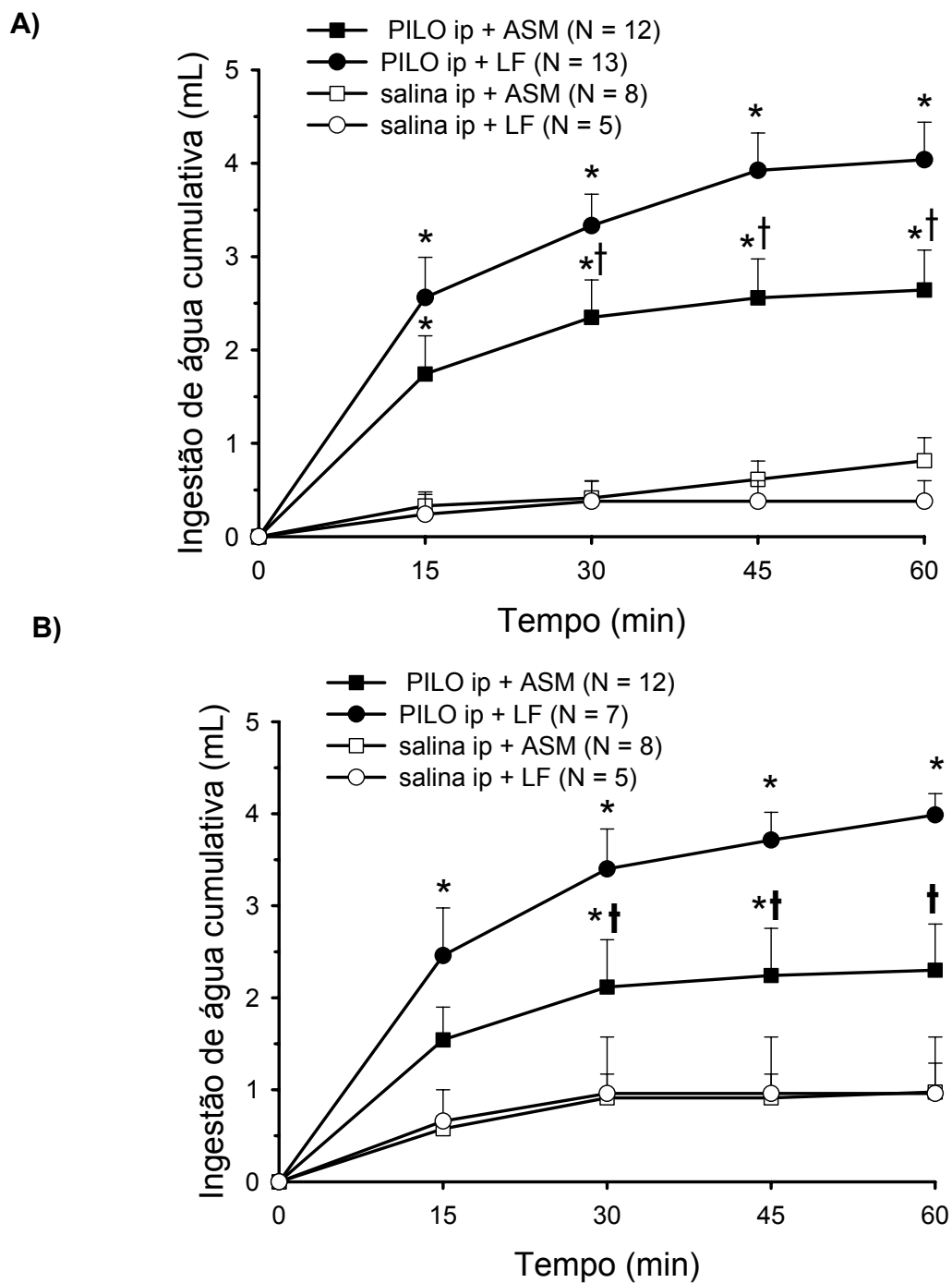
**FIGURA 4:** Secreção salivar induzida pela pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip ou salina ip em ratos com: **A)** lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF) ou **B)** lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF). \* diferente de salina ip e † diferente de LF + PILO ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher;  $P < 0,05$ .

#### **5.4. Efeitos da lesão eletrolítica da ASM (1 ou 15 dias) sobre a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip**

Os ratos com lesão aguda (1 dia) ASM e com lesão fictícia (LF) que foram submetidos à injeção de PILO (1 mg/kg peso corporal) ip tiveram um aumento da ingestão de água quando comparados com seus respectivos controles que receberam salina ip (lesão ASM + PILO ip:  $2,6 \pm 0,4$  vs. lesão ASM + salina ip:  $0,8 \pm 0,2$  mL/1h e LF + PILO ip:  $4,0 \pm 0,4$  vs. LF + salina ip:  $0,4 \pm 0,2$  mL/1h). Todavia, a resposta dipsogênica induzida pela PILO ip nos ratos com lesão aguda da ASM ( $2,6 \pm 0,4$  mL/1h) foi menor do que a observada nos ratos LF ( $4,0 \pm 0,4$  mL/1h), [F (3,132) = 51,182; P < 0,001], figura 5A.

No grupo com lesão crônica da ASM (15 dias), verificamos que a PILO ip também induziu aumento da ingestão de água nos grupos com lesão ASM ou LF comparada aos animais com o mesmo tipo de lesão submetidos à salina ip (lesão ASM + PILO ip:  $2,3 \pm 0,5$  vs. lesão ASM + salina ip:  $0,9 \pm 0,3$  mL/1h e LF + PILO ip:  $4,0 \pm 0,2$  vs. LF + salina ip:  $0,9 \pm 0,6$  mL/1h). À semelhança do observados nos ratos com lesão aguda, os ratos com lesão crônica da ASM também tiveram uma menor ingestão de água ( $2,3 \pm 0,5$  mL/1h) quando comparado àquela observada nos ratos LF ( $4,0 \pm 0,2$  mL/1h), [F (3,112) = 24,253; P < 0,001], figura 5B.





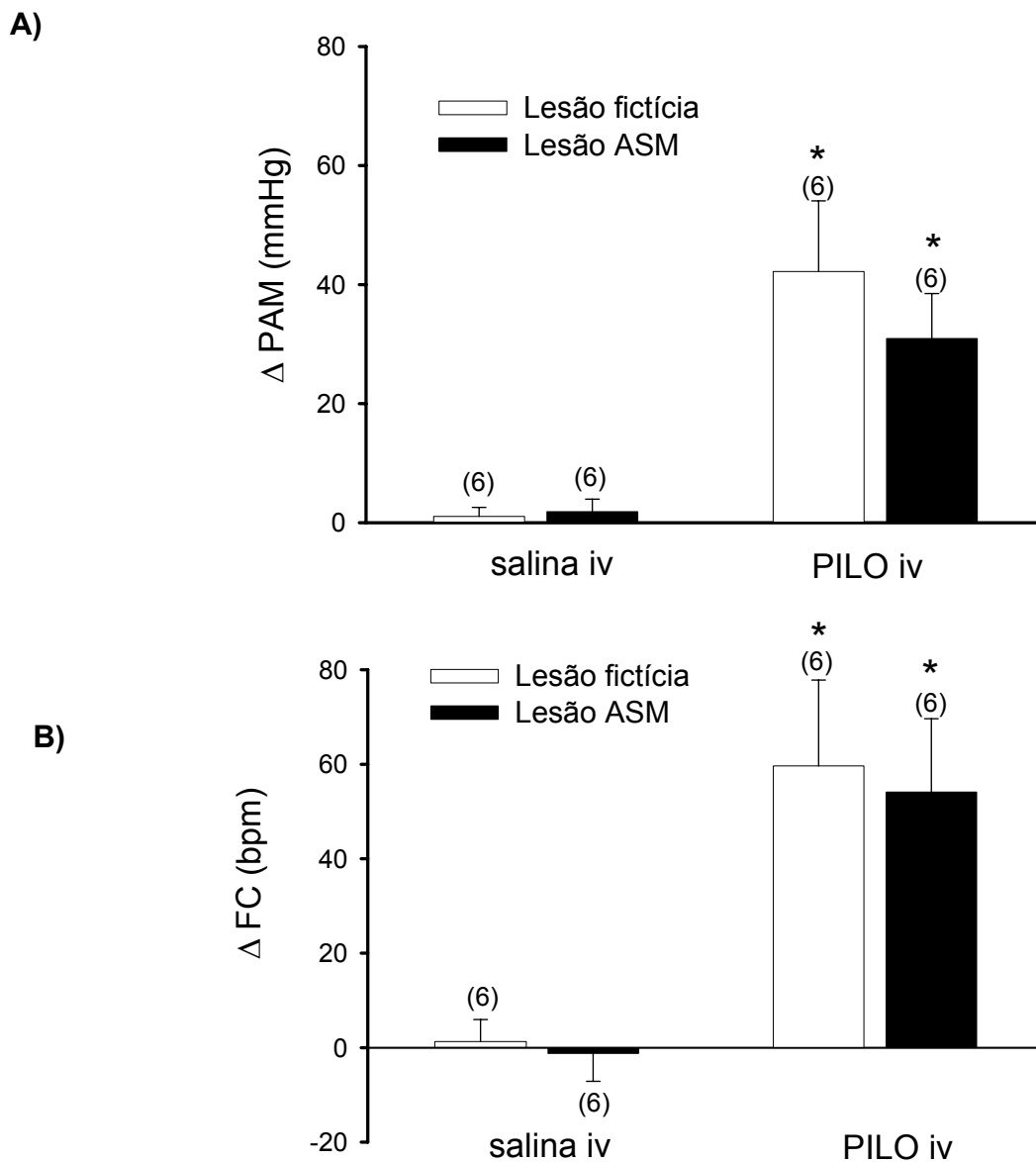
**FIGURA 5:** Ingestão de água induzida pela pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip ou salina ip em ratos com: **A)** lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF) ou **B)** lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF). \* diferente de salina ip e † diferente de LF + PILO ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de duas vias associado ao teste LSD de Fisher, P < 0,05.

### **5.5. Efeitos da lesão eletrolítica (1 hora) da ASM sobre as alterações na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela pilocarpina iv em ratos anestesiados**

Em ratos anestesiados, 1 hora após a lesão da ASM ou LF, observamos que a PILO (1 mg/kg de peso corporal) injetada intravenosamente aumentou significativamente a PAM tanto nos ratos com lesão aguda (1 hora) da ASM ( $31 \pm 8$  vs. salina ip:  $2 \pm 2$  mmHg) quanto nos ratos LF ( $42 \pm 12$  vs. salina ip:  $1 \pm 2$  mmHg), [F(3,20) = 8,431; P < 0,001]. Entretanto, não houve diferença estatística entre o aumento de PAM induzido pela PILO entre os ratos com lesão da ASM ( $31 \pm 8$  mmHg) e LF ( $42 \pm 12$  mmHg), (P = 0,279), figura 6A.

A PILO iv, em ratos anestesiados, causou taquicardia tanto nos ratos com lesão de 1 hora da ASM ( $54 \pm 15$  vs. salina ip:  $-1 \pm 6$  bpm) quanto nos ratos LF ( $60 \pm 18$  vs. salina ip:  $1 \pm 5$  bpm), [F(3,20) = 6,907; P < 0,05]. Da mesma forma que o observado na pressão arterial, não houve diferença entre a taquicardia induzida pela PILO iv em ratos com lesão ASM ( $54 \pm 15$  bpm) comparado com os ratos LF ( $60 \pm 18$  bpm), (P = 0,757), figura 6B.

Não houve diferença entre os grupos na PAM basal (lesão ASM:  $112 \pm 4$  vs. LF:  $117 \pm 3$  mmHg), [F(1,10) = 1,074; P= 0,324] e FC basal (lesão ASM:  $375 \pm 13$  vs. LF:  $383 \pm 19$  bpm), [F(1,10) = 0,109; P= 0,748].



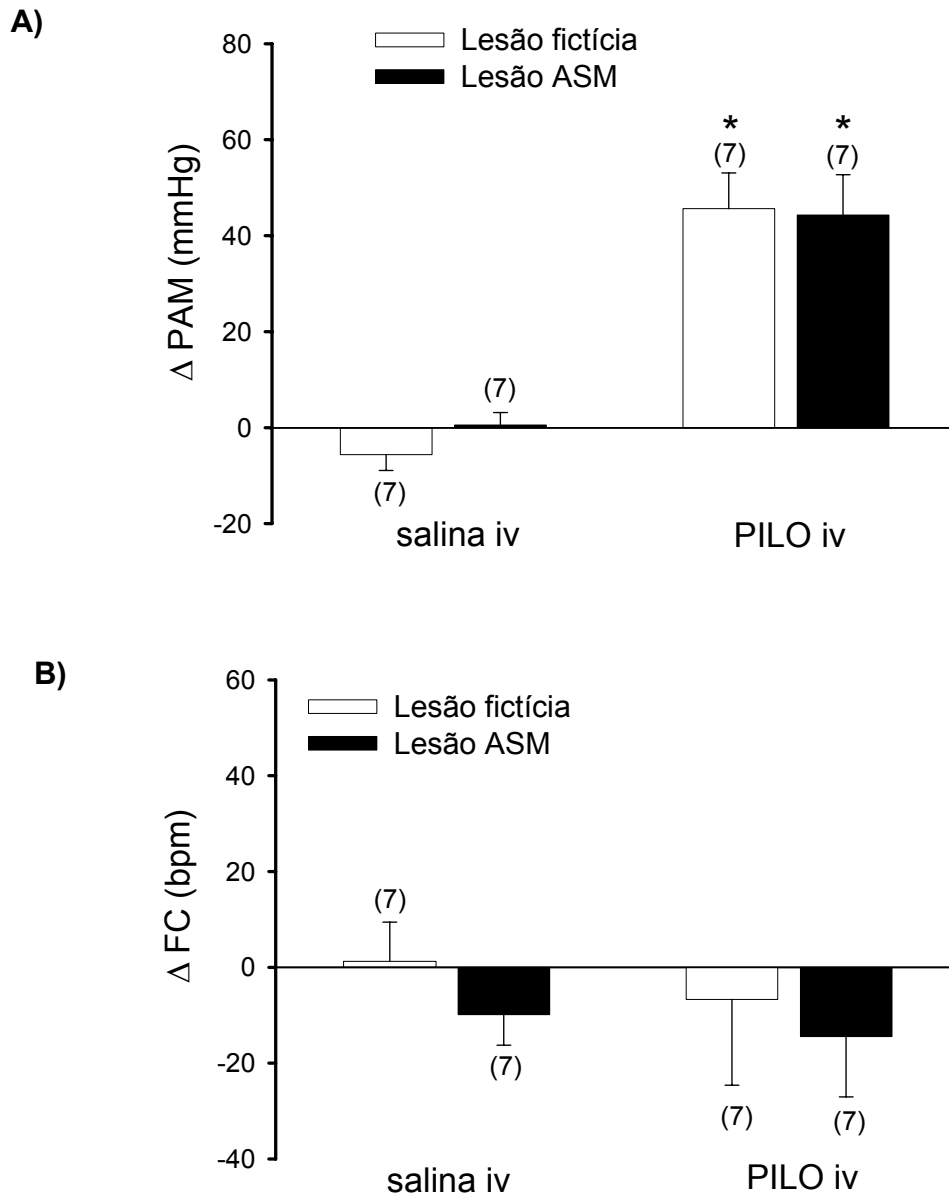
**FIGURA 6:** **A)** variação da pressão artéria média (PAM) em ratos com lesão aguda (1 hora) da ASM ou lesão fictícia (LF), **B)** variação da frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão aguda (1 hora) da ASM ou lesão fictícia (LF) após a administração intravenosa (iv) de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ou salina. \*diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.6. Efeitos da lesão eletrolítica (1 ou 15 dias) da ASM sobre as alterações na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela pilocarpina iv em ratos não anestesiados**

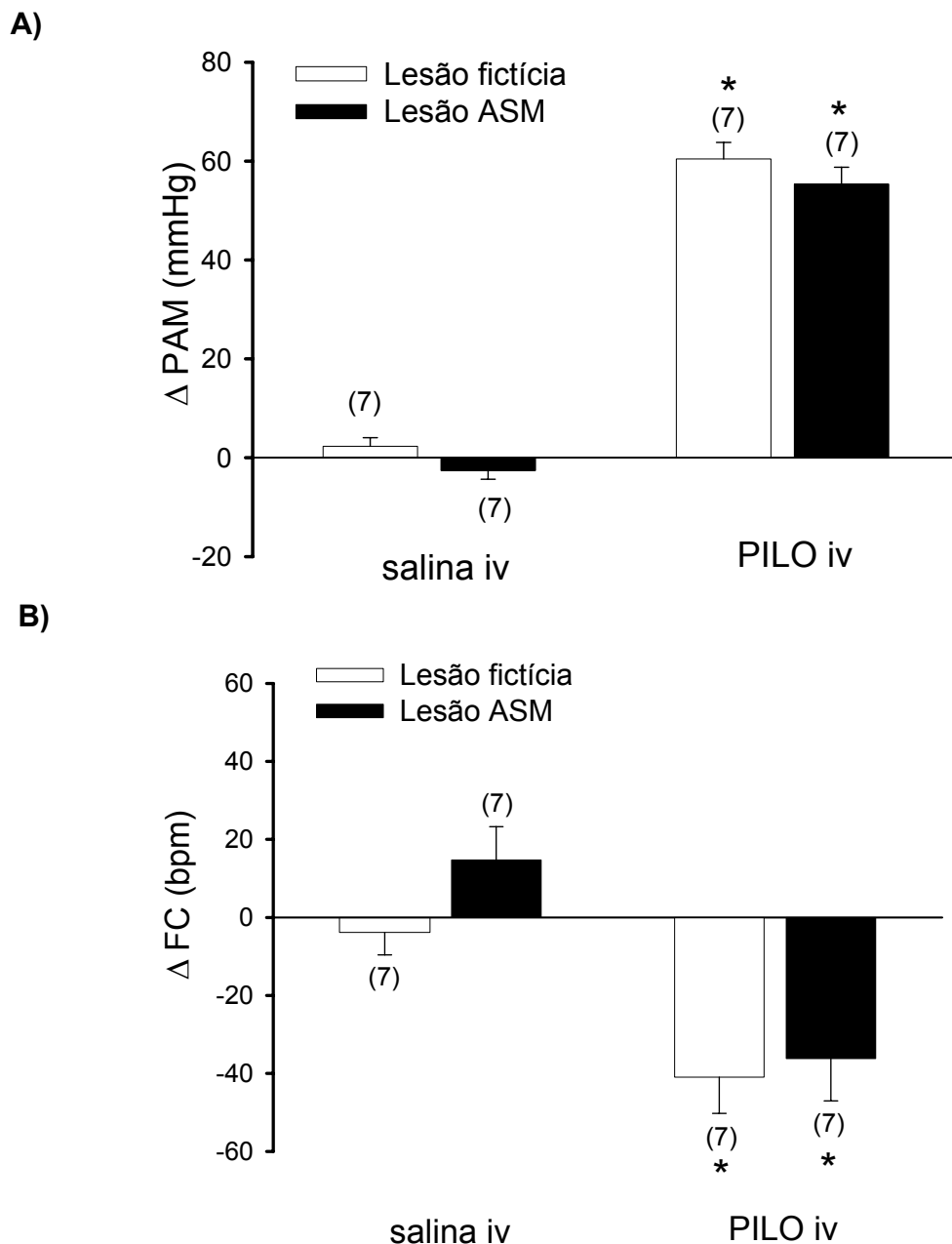
Foi observado um aumento da PAM após a injeção iv de PILO (1 mg/kg de peso corporal) em ratos acordados, submetidos à lesão aguda (1 dia) da ASM ( $44 \pm 8$  vs. salina:  $1 \pm 3$  mmHg) ou LF ( $46 \pm 7$  vs. salina:  $-6 \pm 3$  mmHg), [F (3,24) = 21,074; P < 0,001], figura 7A. A lesão de 1 dia da ASM não foi capaz de alterar o aumento de PAM causado pela injeção de pilocarpina iv (lesão ASM:  $44 \pm 8$  vs. LF:  $46 \pm 7$  mmHg), (P = 0,876). A injeção de PILO não causou alterações significantes na FC dos ratos lesados ( $-14 \pm 13$  vs. salina:  $-10 \pm 6$  bpm) ou nos ratos LF ( $-7 \pm 18$  vs. salina:  $1 \pm 8$  bpm), [F (3,24) = 0,299; P = 0,826], figura 7B.

Como podemos observar na figura 8A, nos ratos com lesão crônica (15 dias), a injeção iv de PILO em rato acordados, também causou aumento da PAM tanto nos ratos lesados ( $55 \pm 3$  vs. salina:  $-3 \pm 2$  mmHg) quanto nos ratos LF ( $60 \pm 3$  vs. salina:  $2 \pm 2$  mmHg), [F (3,24) = 156,040; P < 0,001]. A lesão crônica da ASM também não alterou o aumento da PAM induzida pela PILO iv ( $55 \pm 3$  vs. LF:  $60 \pm 3$  mmHg), (P = 0,194). A PILO iv causou bradicardia tanto nos ratos com lesão crônica da ASM ( $-36 \pm 11$  vs. salina:  $15 \pm 9$  bpm) quanto nos ratos com lesão fictícia ( $-41 \pm 9$  vs. salina:  $-4 \pm 6$  bpm), [F (3,24) = 9,165; P < 0,001], figura 8B. A lesão crônica (15 dias) da ASM não foi capaz de alterar a queda de FC observada nos ratos LF após PILO iv induzida pela injeção de pilocarpina iv (lesão ASM:  $-36 \pm 11$  vs. LF:  $-41 \pm 9$  bpm), (P = 0,705).

Não houve diferença entre os grupos com lesão aguda da ASM e LF na PAM basal (lesão ASM:  $108 \pm 13$  vs. LF:  $115 \pm 2$  mmHg), [F(1,12) = 4,222; P= 0,062] e FC basal (lesão ASM:  $373 \pm 8$  vs. LF:  $347 \pm 10$  bpm), [F(1,12) = 4,010; P= 0,068]. Também não houve diferença entre os grupos com lesão crônica da ASM e LF na PAM basal (lesão ASM:  $121 \pm 6$  vs. LF:  $110 \pm 1$  mmHg) [F (1,12) = 3,211; P = 0,098], e FC basal (lesão ASM:  $397 \pm 15$  vs. LF:  $372 \pm 13$  bpm), [F (1,12) = 1,158; P = 0,242].



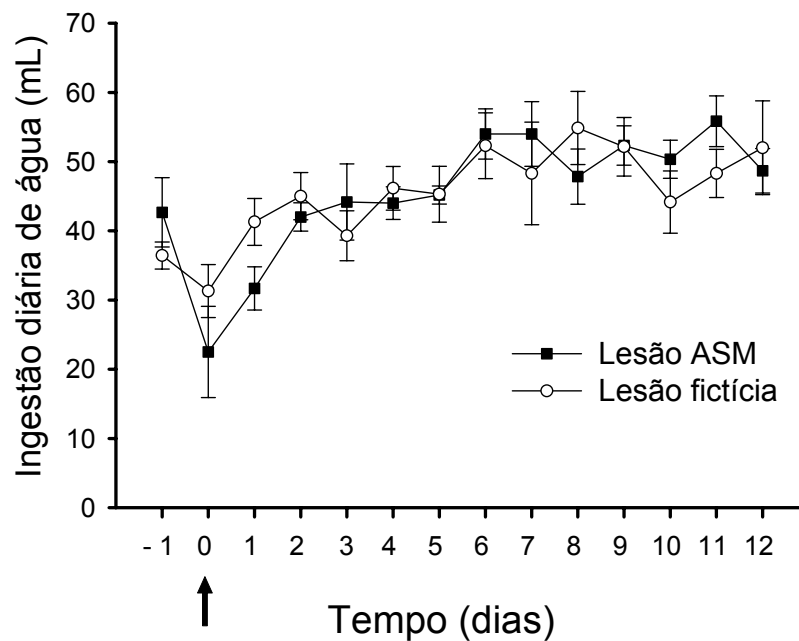
**FIGURA 7: A)** variação da pressão arterial média (PAM) em ratos com lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF), **B)** variação da frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão aguda (1 dia) da ASM ou lesão fictícia (LF) após a administração intravenosa (iv) de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ou salina. \*diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .



**FIGURA 8:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM) em ratos com lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF), **B)** variação da frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão crônica (15 dias) da ASM ou lesão fictícia (LF) após a administração intravenosa (iv) de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ou salina. \*diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.7. Efeitos da lesão da ASM sobre a ingestão diária de água**

Nos ratos que foram submetidos à lesão crônica da ASM ou LF crônica, e utilizados nos experimentos de alterações cardiovasculares à PILO iv, foi também medido a ingestão diária de água desde 1 dia antes da lesão até o 12º dia após a lesão. Observamos que não houve diferença significativa entre os ratos com lesão da ASM ou LF na ingestão diária de água por todo o período analisado, [F (2,166) = 0,679; P = 0,508], figura 9.



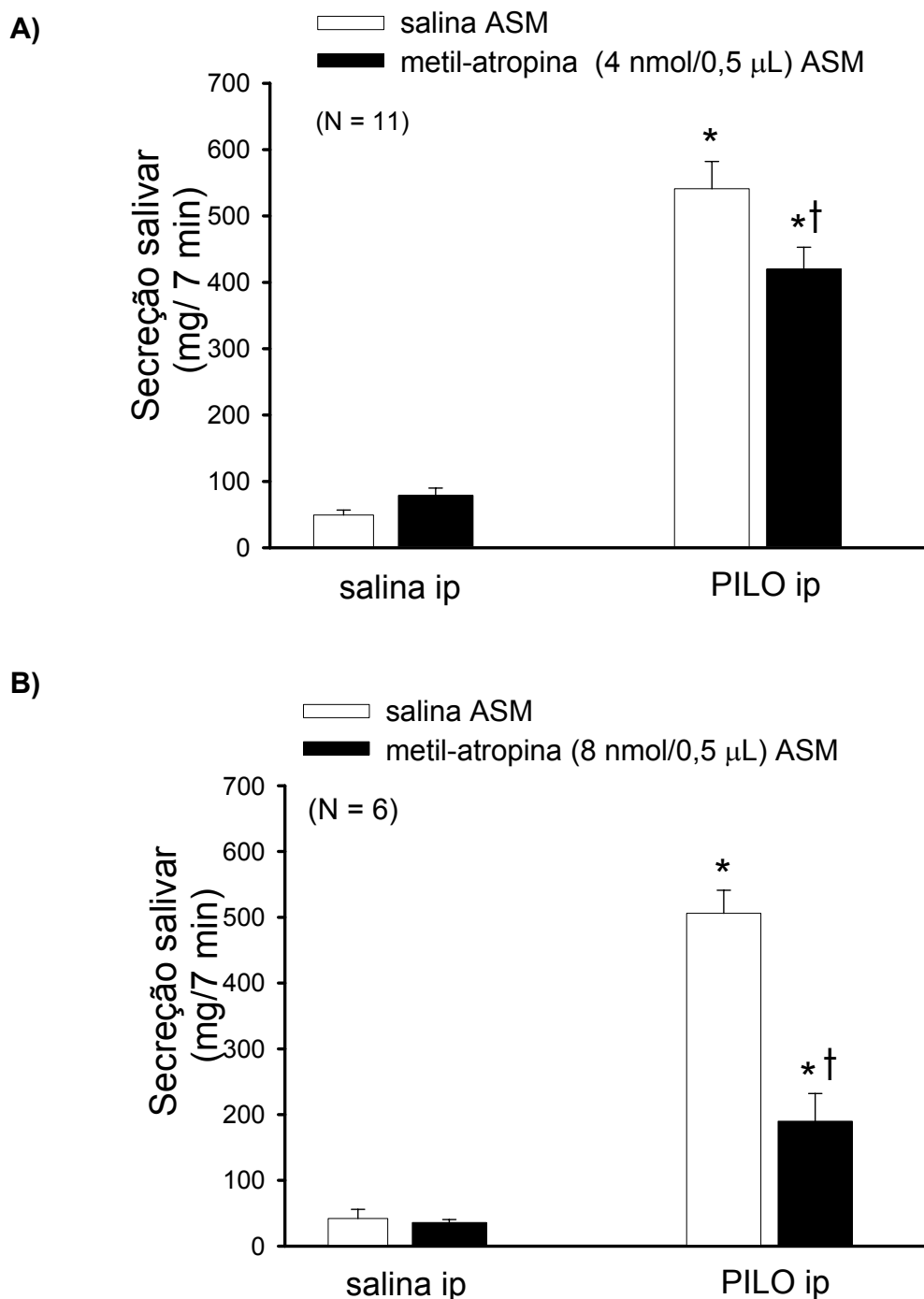
**FIGURA 9:** Ingestão diária de água em ratos submetidos à lesão ASM ou lesão fictícia (LF). A lesão foi realizada no dia 0 (seta). Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias associado ao teste LSD de Fisher.

### **5.8. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip**

Como podemos observar na figura 10A, a injeção ip de PILO (1 mg/kg de peso corporal) em ratos que receberam a injeção de salina na ASM promoveu um aumento na secreção salivar (salina ASM + PILO ip:  $545 \pm 41$  vs. salina ASM + salina ip:  $49 \pm 7$  mg/7 min). Este aumento da secreção salivar induzida pela PILO ip foi reduzida pela injeção prévia de metil-atropina de 4 nmol na ASM (metil-atropina ASM + PILO ip:  $420 \pm 33$  vs. salina ASM + PILO ip:  $545 \pm 41$  mg/7 min), [F (3,30) = 83, 593; P < 0,001]. A injeção de metil-atropina de 4 nmol na ASM em ratos que receberam salina ip não alterou a secreção salivar basal ( $79 \pm 11$  vs. salina ASM + salina ip:  $49 \pm 7$  mg/7 min), figura 10A.

Verificamos uma redução ainda maior na secreção salivar induzida pela PILO ip (salina ASM + PILO ip:  $506 \pm 35$  vs. salina ASM + salina ip:  $42 \pm 14$  mg/7 min), quando os animais foram submetidos à injeção prévia de metil-atropina de 8 nmol/0,5  $\mu$ L na ASM (metil-atropina ASM + PILO ip:  $190 \pm 42$  vs. salina ASM + PILO ip:  $506 \pm 35$  mg/7 min), [F (3,15) = 68,738, p < 0,001], figura 9B. A injeção de metil-atropina de 8 nmol na ASM em ratos que receberam salina ip não alterou a secreção salivar basal ( $36 \pm 4$  vs. salina ASM + salina ip:  $42 \pm 14$  mg/7 min), 10B.





**FIGURA 10:** Secreção salivar após pilocarpina (PILO, 1 mg/ kg de peso corporal) ip ou salina ip em ratos com pré-tratados com metil-atropina ou salina na ASM: **A)** metil-atropina (4 nmol/0,5 µL) na ASM, **B)** metil-atropina (8 nmol/0,5 µL) na ASM. \* diferente de salina ip e † diferente de salina na ASM + PILO ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**5.9. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico ao redor da ASM sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip**

Podemos observar nesses resultados que a injeção de metil-atropina de 4 ou 8 nmol ao redor da ASM não é capaz de alterar a salivação induzida pela pilocarpina ip. No entanto, há diferença significativa entre os grupos que receberam pilocarpina ip e os grupos que receberam salina ip.

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(4 nmol) + PILO</i>	<i>Peso inicial do</i> <i>algodão</i>	<i>Peso final do</i> <i>algodão</i>	$\Delta$
451	1.367,7	1.878,1	510,4
453	1.900,1	2.342,8	442,7
454	1.968,6	2.510,6	542
455	613,6	966	352,4
461	1.344,6	1.791,5	446,9
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>1.439,9 <math>\pm</math> 243,7</b>	<b>1.897,8 <math>\pm</math> 269,5</b>	<b>458,8 <math>\pm</math> 32,6 *</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + PILO</i>	<i>Peso inicial do</i> <i>algodão</i>	<i>Peso final do</i> <i>algodão</i>	$\Delta$
451	1531,1	1809,5	296,4
453	1.4060	1.952,5	546,5
454	1.408,5	2.081,8	673,3
455	1.362,2	2.037,3	675,1
461	1.373,5	1.766,9	393,4
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>1.412,6 <math>\pm</math> 266,7</b>	<b>1.929,6 <math>\pm</math> 617,2</b>	<b>516,9 <math>\pm</math> 75,6 *</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + salina</i>	<i>Peso inicial do</i> <i>algodão</i>	<i>Peso final do</i> <i>algodão</i>	$\Delta$
451	1.203,2	1.223,4	20,2
453	1.652	1.789,5	137,8
454	1.100,1	1.201	101
455	1.179	1.221,7	43
461	1.262	1.309	47,2
<b>Média ± EPM</b>	<b>1.279,1 ± 96,6</b>	<b>1.349 ± 111,6</b>	<b>69,8 ± 21,5</b>

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(4 nmol) + salina</i>	<i>Peso inicial do</i> <i>algodão</i>	<i>Peso final do</i> <i>algodão</i>	$\Delta$
451	1.231,2	1.345	113,8
453	1.135	1.272	137
454	1.451	1.561	110
455	1.445,1	1.472	26,7
461	1.249,2	1.272	22,7
<b>Média ± EPM</b>	<b>1.302,2 ± 62,6</b>	<b>1.384,3 ± 57,3</b>	<b>82 ± 24</b>

**TABELA 1:** Salivação em ratos que receberam injeção de metil-atropina (4 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina ou salina. \* diferente de salina ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de uma via com medidas repetidas associado ao teste de LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(8 nmol) + PILO</i>	<i>Peso inicial do</i> <i>algodão</i>	<i>Peso final do</i> <i>algodão</i>	$\Delta$
69	1.691,8	2,3437	651,9
70	1.352,7	1.8347	482
74	1.381,7	1.654,4	272,7
243	1.525	1.978,4	453,4
244	1.265,7	1.686,4	446,9
248	1.160	1.591	431
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>1.396,1 <math>\pm</math> 77,2</b>	<b>1.848,1 <math>\pm</math> 114,4</b>	<b>452 <math>\pm</math> 50 *</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + PILO</i>	<i>Peso inicial do</i> <i>algodão</i>	<i>Peso final do</i> <i>algodão</i>	$\Delta$
69	1.244,3	1.556,5	312,2
70	1.252	1.680,3	428,3
74	1.379,5	1.856,4	477
243	1.253	1.881,6	628,6
244	1.380	1.939,3	559,3
248	1.325	1.991	666,1
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>1.305,6 <math>\pm</math> 26,3</b>	<b>1.991 <math>\pm</math> 18,2</b>	<b>512 <math>\pm</math> 54 *</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + salina</i>	<i>Peso inicial do algodão</i>	<i>Peso final do algodão</i>	$\Delta$
69	1.259,1	1.264,1	5
70	1.275,6	1.302,3	26,7
74	1.369,1	1.384,5	15,4
243	1.506	1.648,3	142,3
244	1.226	1.504	278
248	1.347,3	1.435,6	88,3
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>1.330,5 <math>\pm</math> 41,4</b>	<b>1.423,1 <math>\pm</math> 57,3</b>	<b>92,6 <math>\pm</math> 43</b>

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina (8 nmol) + salina</i>	<i>Peso inicial do algodão</i>	<i>Peso final do algodão</i>	$\Delta$
69	1.685	1.694,4	9,6
70	1.542,5	1.557	14,5
74	1.369,1	1.384,5	15,4
243	1.499,2	1.596,7	97,5
244	1.252	1.499,3	247,5
248	1.344	1.368,1	24,3
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>1.448,5 <math>\pm</math> 64</b>	<b>1.516,6 <math>\pm</math> 51,4</b>	<b>68,1 <math>\pm</math> 38,3</b>

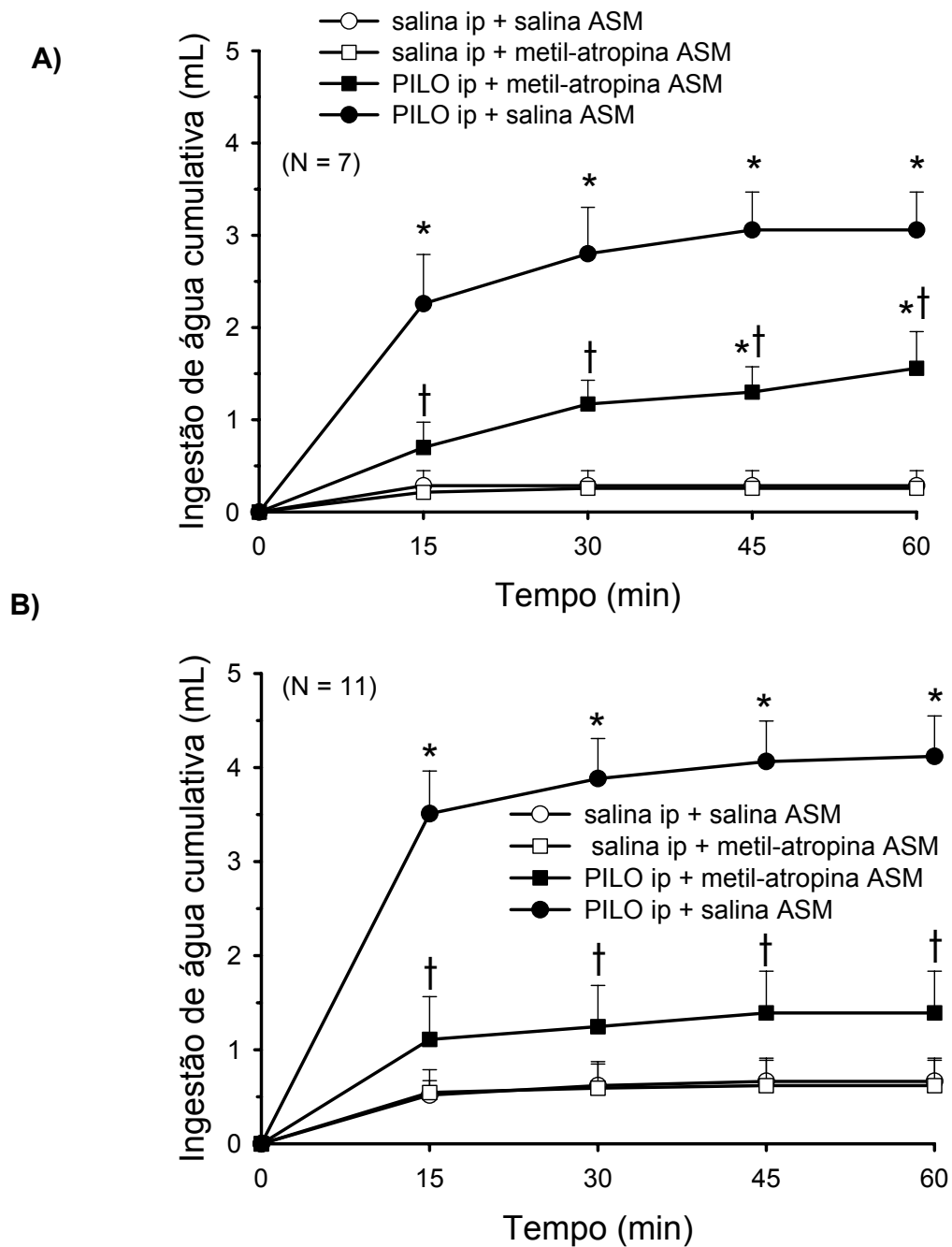
**TABELA 2:** Salivação em ratos que receberam injeção de metil-atropina (8 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina. \* diferente de salina ip. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Anova de uma via com medidas repetidas associado ao teste de LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.10. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip**

Como podemos observar na figura 11A, a injeção ip de PILO (1 mg/kg de peso corporal) em ratos que receberam a injeção de salina na ASM promoveu ingestão de água (salina ASM + PILO ip:  $3,0 \pm 0,4$  vs. salina ASM + salina ip:  $0,3 \pm 0,2$  mL/1h). A ingestão de água induzida pela PILO ip foi reduzida pela injeção prévia de metil-atropina de 4 nmol/0,5  $\mu$ L na ASM (metil-atropina ASM + PILO ip:  $1,4 \pm 0,4$  vs. salina ASM + PILO ip:  $3,0 \pm 0,4$  mL/1h), [F (6,54) = 18,972,  $p < 0,001$ ].

Em outro grupo de animais, também verificamos uma redução na resposta dipsogênica induzida pela PILO ip (salina ASM + PILO ip:  $4,1 \pm 0,4$  vs. salina ASM + salina ip:  $0,6 \pm 0,2$  mL/1h), quando os animais foram submetidos à injeção prévia de metil-atropina de 8 nmol/0,5  $\mu$ L na ASM (metil-atropina ASM + PILO ip:  $1,6 \pm 0,4$  vs. salina ASM + PILO ip:  $4,1 \pm 0,4$  mL/1h), [F (10,90) = 28,882,  $p < 0,001$ ], figura 11B.

A ingestão de água em ratos que receberam injeção de metil-atropina de 4 ou 8 nmol na ASM e salina ip não foi diferente daquela observada em ratos que receberam injeção de salina na ASM e de salina ip, figuras 11A e 11B.



**FIGURA 11:** Ingestão de água induzida pela pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal) ip em ratos pré-tratados com metil-atropina ou salina na ASM: **A)** metil-atropina (4 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM, **B)** metil-atropina (8 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM. \* diferente de salina ip e † diferente de salina na ASM + PILO ip. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**5.11. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico ao redor da ASM sobre a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip**

Podemos observar que a injeção de metil-atropina tanto na dose de 4 como de 8 nmol ao redor da ASM não é capaz de alterar a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip. No entanto, há diferença significativa entre os animais que receberam salina ip e os animais que receberam pilocarpina ip.

<i>Ratos</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
<i>Metil-atropina (4 nmol)+ PILO</i>				
46	1	1,7	1,7	1,7
47	1,1	2,5	2,7	2,7
48	1,3	2	2	2
52	1,5	3	3	3
53	0,8	3,1	3,1	3,1
<b>Média ± EPM</b>	<b>1,1 ± 0,1</b>	<b>2,5 ± 0,3</b>	<b>2,5 ± 0,3</b>	<b>2,5 ± 0,3 *</b>

<i>Ratos</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
<i>Salina + PILO</i>				
46	1,4	2,2	2,2	2,2
47	0,4	2,2	2,6	2,8
48	0,9	0,9	0,9	1,2
52	2,8	2,8	2,9	2,9
53	3,5	3,6	3,6	3,6
<b>Média ± EPM</b>	<b>1,8 ± 0,6</b>	<b>2,3 ± 0,4</b>	<b>2,4 ± 0,4</b>	<b>2,5 ± 0,4 *</b>



<i>Ratos</i> <i>Salina + salina</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
46	0,4	0,4	0,4	0,4
47	1	1	1	1
48	0,3	0,3	0,3	0,3
52	2	2	2	2
53	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Média ± EPM</b>	<b>0,8 ± 0,3</b>	<b>0,8 ± 0,3</b>	<b>0,8 ± 0,3</b>	<b>0,8 ± 0,3</b>

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(4 nmol)+ salina</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
46	0,6	0,6	0,6	0,6
47	0,9	0,9	0,9	0,9
48	0,1	0,1	0,1	0,1
52	0	0	0	0
53	0,3	0,5	0,5	0,5
<b>Média ± EPM</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>

**TABELA 3:** Ingestão de água em ratos que receberam injeção de metil-atropina (4 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina ou salina. \* diferente de salina ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de duas via com medidas repetidas associado ao teste de LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(8 nmol) + PILO</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
279	1	1	1	1
284	0,9	0,9	0,9	0,9
286	1	2	2	2
285	0	0	0	0
311	0,1	0,6	0,6	1,1
313	0,2	0,7	0,7	0,7
<b>Média ± EPM</b>	<b>0,5 ± 0,2</b>	<b>0,9 ± 0,3</b>	<b>0,9 ± 0,3</b>	<b>0,9 ± 0,3</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + PILO</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
279	0	0,5	0,5	0,5
284	1,2	1,2	1,2	1,2
286	0,7	0,7	1,2	1,2
285	1,4	1,4	1,4	1,4
311	1,1	1,2	1,3	1,3
313	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Média ± EPM</b>	<b>0,8 ± 0,2</b>	<b>0,9 ± 0,2</b>	<b>1 ± 0,2</b>	<b>1 ± 0,1</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + salina</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
279	0	0	0	0
284	0,2	0,3	1,3	1,3
286	0	0	0	0
285	0,4	0,4	0,6	0,6
311	0,9	0,9	0,9	0,9
313	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Média ± EPM</b>	<b>0,3 ± 0,1</b>	<b>0,3 ± 0,1</b>	<b>0,5 ± 0,2</b>	<b>0,5 ± 0,2</b>

<i>Ratos</i>	<i>15'</i>	<i>30'</i>	<i>45'</i>	<i>60'</i>
<i>Metil-atropina (8 nmol) + salina</i>				
<b>279</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>
<b>284</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>
<b>286</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>
<b>285</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>
<b>311</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>
<b>313</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Média ± EPM</b>	<b>0,8 ± 0,2</b>	<b>1 ± 0,1</b>	<b>1 ± 0,1</b>	<b>1 ± 0,1</b>

**TABELA 4:** Ingestão de água em ratos que receberam injeção de metil-atropina (8 nmol) ou salina ao redor da ASM seguido de injeção ip de pilocarpina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de duas via com medidas repetidas associado ao teste de LSD de Fisher, P = 0,885.

### **5.12. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela pilocarpina iv**

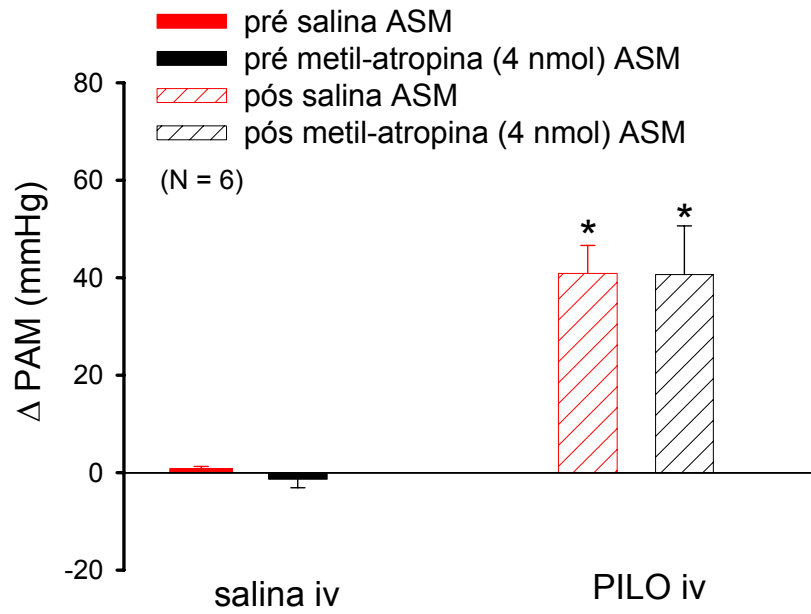
Podemos observar um aumento equivalente na PAM induzida pela injeção de PILO iv (1 mg/kg de peso corporal), em ratos pré-tratados com salina na ASM ou metil-atropina de 4 nmol na ASM (metil-atropina ASM + PILO iv:  $41 \pm 10$  vs. salina ASM + PILO iv:  $41 \pm 6$  mmHg), ( $P > 0,05$ ). Os aumentos na PAM induzida pela PILO iv em ratos pré-tratados com salina ou metil-atropina na ASM foram significativamente maiores do que os observados em ratos tratados com salina iv (pré metil-atropina ASM + salina iv:  $-1 \pm 2$  vs. pré-salina ASM + salina iv:  $1 \pm 0,5$  mmHg), [ $F(3,15) = 15,880$ ,  $P < 0,001$ ], figura 11A. Os valores basais de PAM e FC neste grupo foram respectivamente: (metil-atropina ASM + PILO iv:  $105 \pm 7$  e salina ASM + PILO iv:  $108 \pm 3$  mmHg), [ $F(1,11) = 0,245$ ,  $P = 0,642$ ]; (metil-atropina ASM + PILO iv:  $387 \pm 30$  e salina ASM + PILO iv:  $376 \pm 25$  bpm), [ $F(1,11) = 0,0401$ ,  $P = 0,849$ ]. Como podemos observar não ocorreu alterações significantes na PAM e FC basais.

Também ocorreu um aumento na PAM induzido pela injeção de PILO iv (1 mg/kg de peso corporal), em ratos pré-tratados com salina na ASM ou metil-atropina de 8 nmol na ASM (metil-atropina ASM + PILO iv:  $59 \pm 8$  vs. salina ASM + PILO iv:  $62 \pm 6$  mmHg), ( $P > 0,05$ ). Os aumentos na PAM induzidos pela PILO iv em ratos pré-tratados com salina ou metil-atropina na ASM foram significativamente maiores do que os observados em ratos tratados com salina iv (pré metil-atropina ASM + salina iv:  $3 \pm 1$  vs. pré salina ASM + salina iv:  $-1 \pm 1$  mmHg), [ $F(3,15) = 51,039$ ,  $p < 0,001$ ], figura 13A.

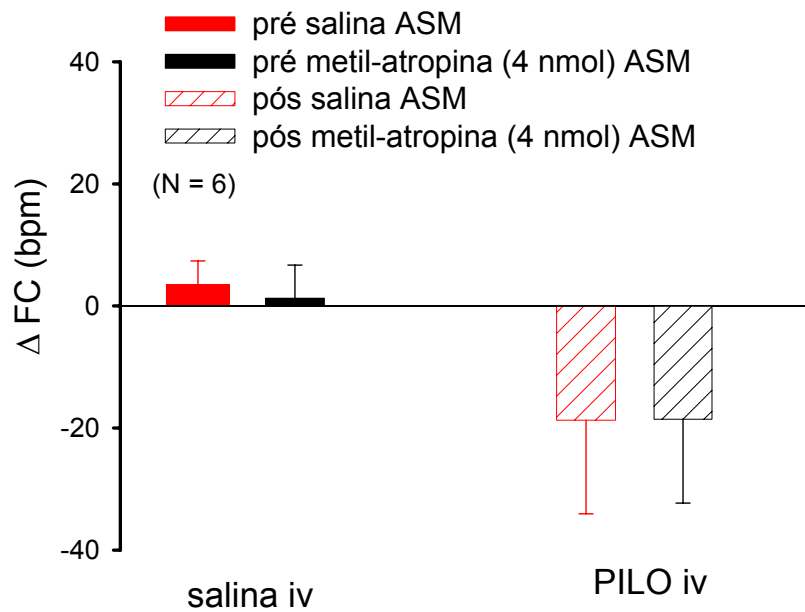
Em ratos acordados, a PILO não promoveu alterações significantes na FC, tanto no grupo de ratos que teve o pré-tratamento com metil-atropina de 4 ou 8 nmol (figuras 12B e 13 B, respectivamente).

Os valores basais de PAM e FC neste grupo foram respectivamente: (metil-atropina ASM + PILO iv:  $116 \pm 7$  vs. salina ASM + PILO iv:  $114 \pm 6$  mmHg), [ $F(1,11) = 0,0713$ ,  $P = 0,800$ ]; (metil-atropina ASM + PILO iv:  $402 \pm 11$  vs. salina ASM + PILO iv:  $387 \pm 17$  bpm), [ $F(1,11) = 0,437$ ,  $P = 0,538$ ].

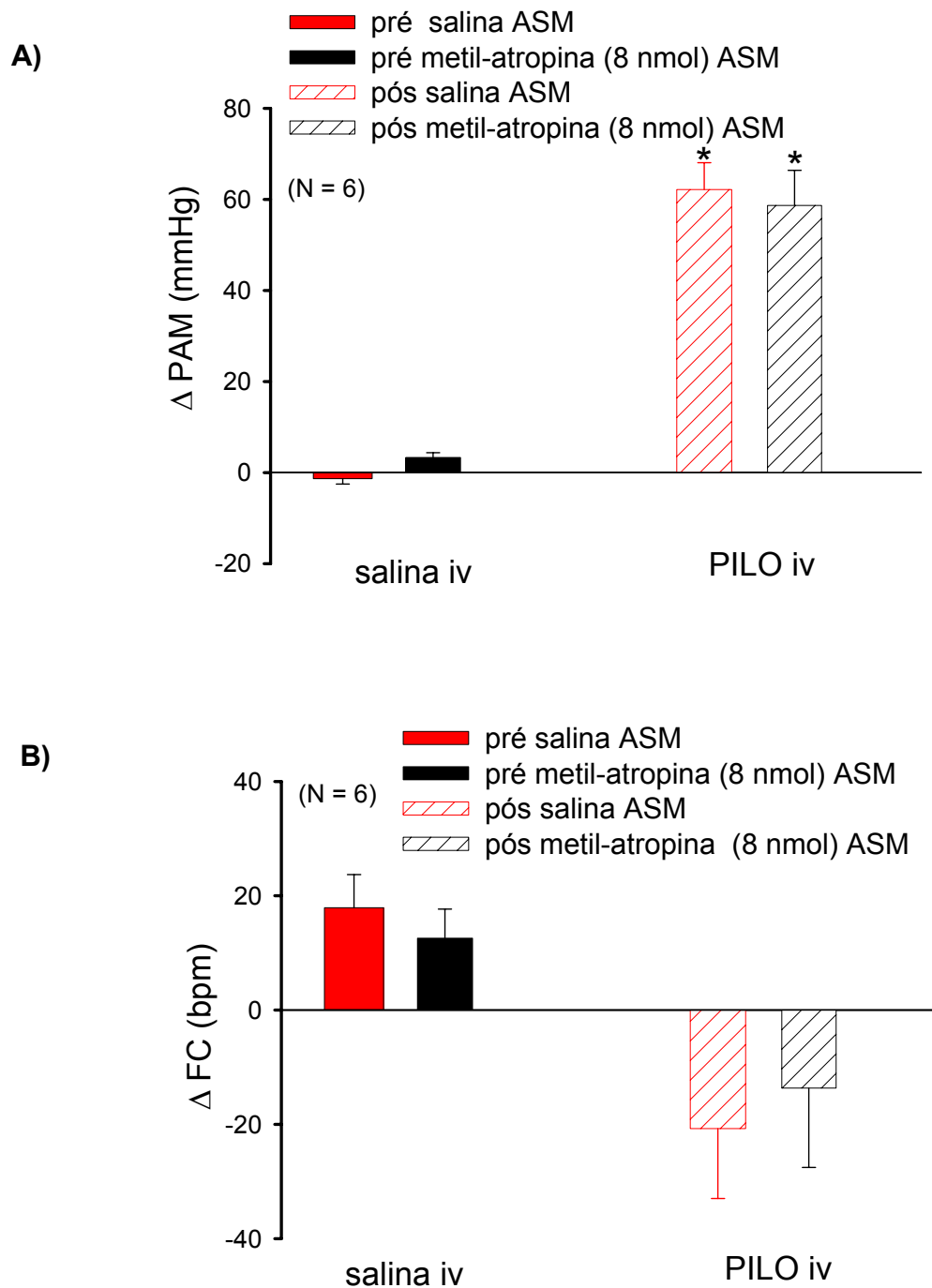
A)



B)



**FIGURA 12:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos em ratos pré-tratados com metil-atropina (4 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. \* diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .



**FIGURA 13: A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos em ratos pré-tratados com metil-atropina (8 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. \* diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

**5.13. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico ao redor da ASM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina iv**

Podemos observar que a injeção de metil-atropina de 8 nmol ao redor da ASM não é capaz de alterar as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina iv. No entanto, há diferença significativa na PAM entre os animais que receberam salina iv e os animais que receberam pilocarpina iv.

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(8 nmol) + PILO</i>	$\Delta PAM$	$\Delta FC$
331	62	-34
349	55	-16
352	71	29
354	30	-78
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>54/8 *</b>	<b>-25/22</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + PILO</i>	$\Delta PAM$	$\Delta FC$
331	47	-15
349	83	45
352	66	-117
354	13	12
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>52/15 *</b>	<b>-19/35</b>

<i>Ratos</i> <i>Salina + salina</i>	$\Delta PAM$	$\Delta FC$
331	3	-19
349	5	-7
352	3	28
354	-3	-7
<b>Média ± EPM</b>	<b>2/2</b>	<b>-15/5</b>

<i>Ratos</i> <i>Metil-atropina</i> <i>(8 nmol) + salina</i>	$\Delta PAM$	$\Delta FC$
331	-8	-2
349	10	-16
352	11	29
354	-5	-78
<b>Média ± EPM</b>	<b>2/5</b>	<b>-17/22,4</b>

**TABELA 5:** Alterações cardiovasculares induzidas pela pilocarpina em ratos tratados com metil-atropina ou salina injetados ao redor da ASM. \* diferente de salina ip. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Anova de uma via com medidas repetidas associado ao teste de LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

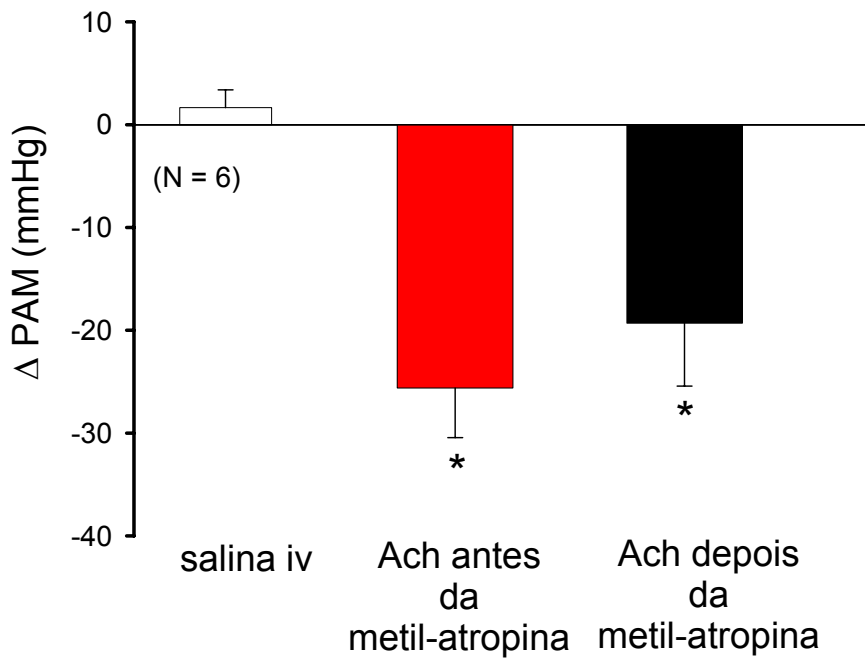


#### **5.14. Efeito do bloqueio colinérgico muscarínico da ASM sobre as alterações cardiovasculares induzida pela acetilcolina iv**

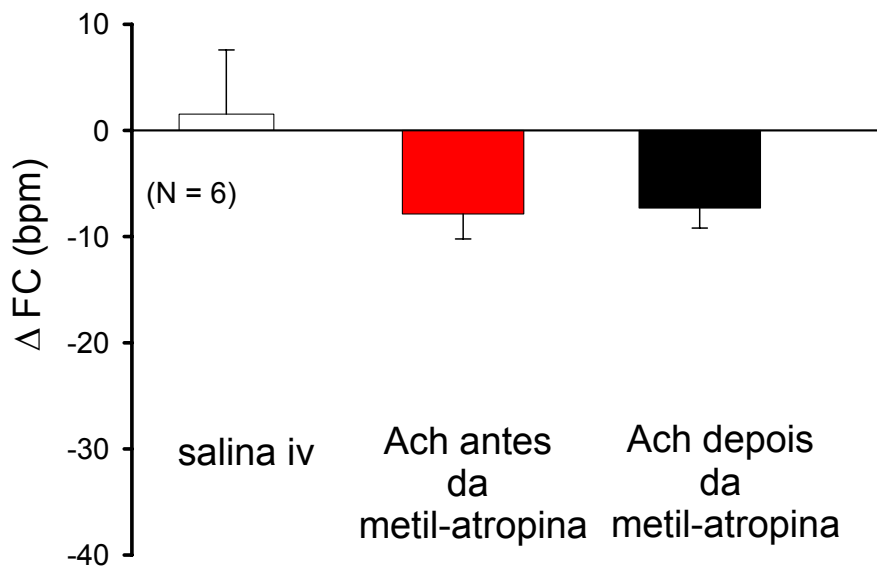
A acetilcolina (8 nmol/0,1 mL por rato) injetada iv causou hipotensão de magnitude semelhante tanto antes quanto após a injeção na ASM de metil-atropina de 4 nmol (pré metil-atropina ASM:  $-26 \pm 5$  vs. após metil-atropina ASM:  $-19 \pm 6$  mmHg) quando comparado aos mesmos ratos quando recebem injeção iv de salina ( $2 \pm 2$  mmHg) [F (2, 10) = 15, 196, P > 0,05], figura 14 A. Não observamos alterações significantes na FC após a injeção iv de acetilcolina, figura 14B [F (2, 10) = 2,145, P = 0,192].

Os valores basais de PAM e FC neste grupo foram respectivamente: (pré metil-atropina ASM:  $120 \pm 5$  vs. após metil-atropina ASM:  $112 \pm 2$  mmHg), [F (1,11) = 0,1639, P = 0,257]; (pré metil-atropina ASM:  $369 \pm 20$  vs. após metil-atropina ASM:  $363 \pm 12$  bpm) [F (1,11) = 0,0819, P = 0,786].

A)



B)



**FIGURA 14:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de acetilcolina (8 nmol/0,1 mL por rato) iv antes e após metil-atropina (4 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM. \* diferente de salina iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via de com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.15. Participação do simpático e da vasopressina sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina**

Ocorreu uma redução na PAM após a injeção de prazosin e após a injeção do composto de Manning (antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina) associado ao prazosin (duplo bloqueio), como podemos observar na tabela abaixo. Apenas a injeção iv do composto de Manning não alterou a PAM basal.

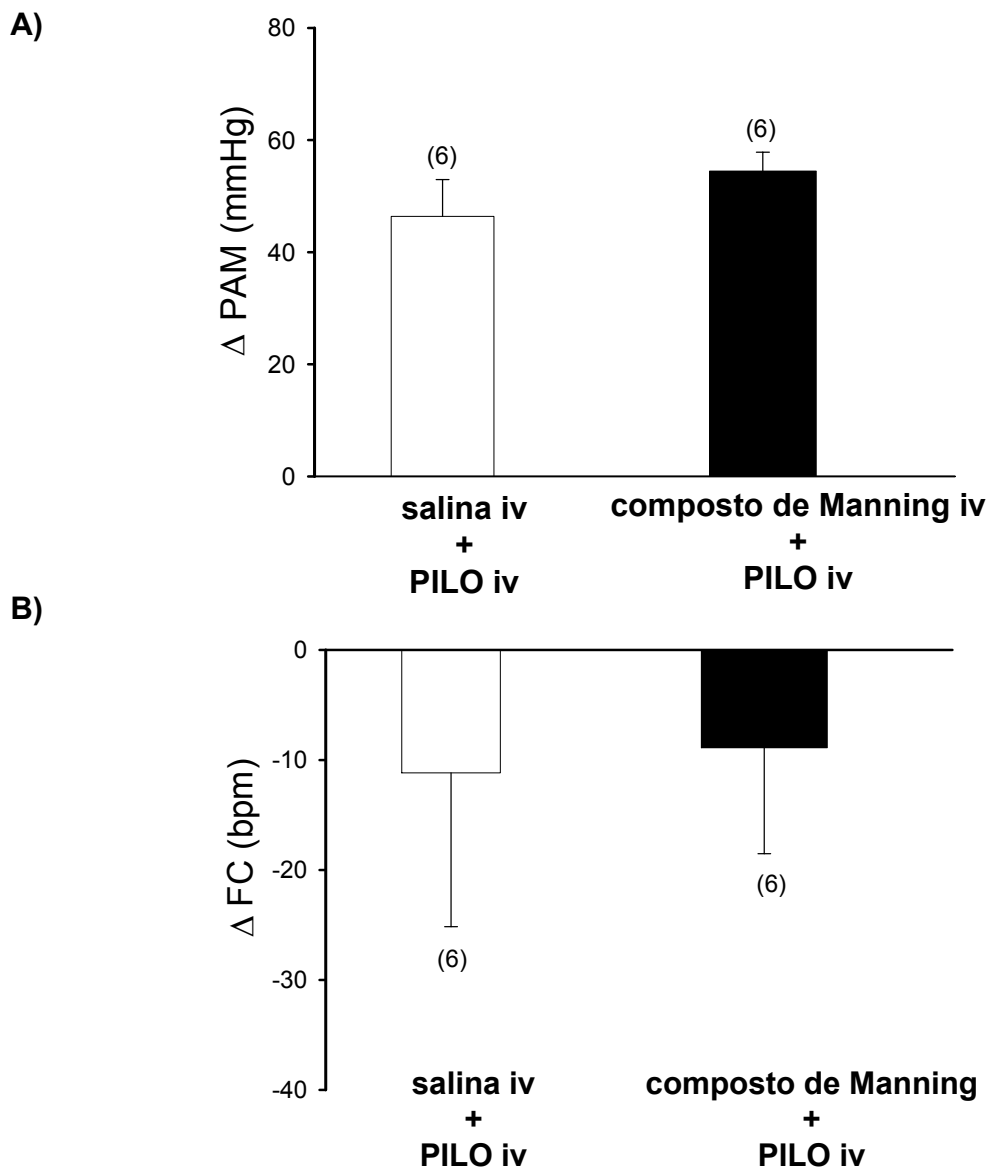
**TABELA 6:** Alterações cardiovasculares induzidas pela pilocarpina em ratos tratados com antagonista dos receptores  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) e/ou prazosin (1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais.

<b>Drogas</b>	<b>PAM basal (mmHg)</b>	<b>PAM pós antagonistas (mmHg)</b>
prazosin (n = 8)	117 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2*
composto de Manning (n = 6)	108 $\pm$ 2	101 $\pm$ 2
prazosin + composto de Manning (n = 7)	117 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2*

\* diferente PAM basal  $P < 0,05$  (teste  $t$  de Student)

### **5.16. Efeito do bloqueio dos receptores de vasopressina ( $V_{1a}$ ) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina iv**

A injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) não alterou a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv (54  $\pm$  3 vs. salina iv: 46  $\pm$  7 mmHg), [F (1,5) = 1,394,  $P = 0,291$ ] figura 15A. Não houve alterações na FC após pilocarpina com pré-tratamento com salina ou antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina, [F (1,5) = 0,0108,  $P = 0,921$ ] figura 15B.

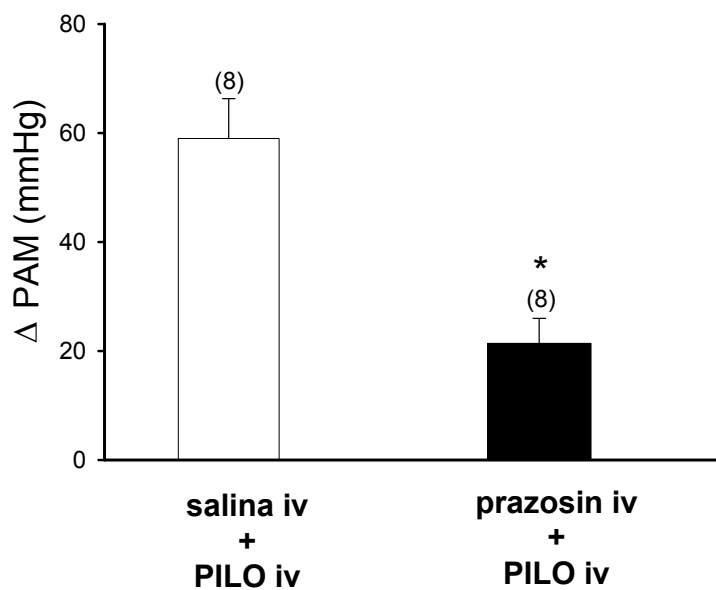


**FIGURA 15:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam prévia injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu$ g/kg de peso corporal) ou salina seguida de injeção iv de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

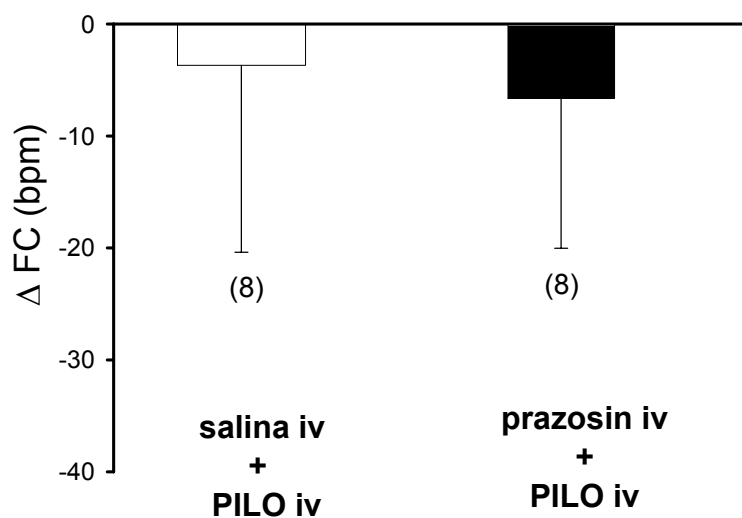
### **5.17. Participação do sistema nervoso simpático sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina**

A injeção iv de prazosin (1mg/kg de peso corporal) reduziu significativamente a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv ( $21 \pm 5$  vs. salina iv:  $59 \pm 7$  mmHg), [F (1,7) = 17,589, P < 0,004], figura 16A. Não houve alterações na FC após pilocarpina com pré-tratamento com salina ou prazosin, [F (1,7) = 0,0122, P = 0,915], figura 16B.

**A)**



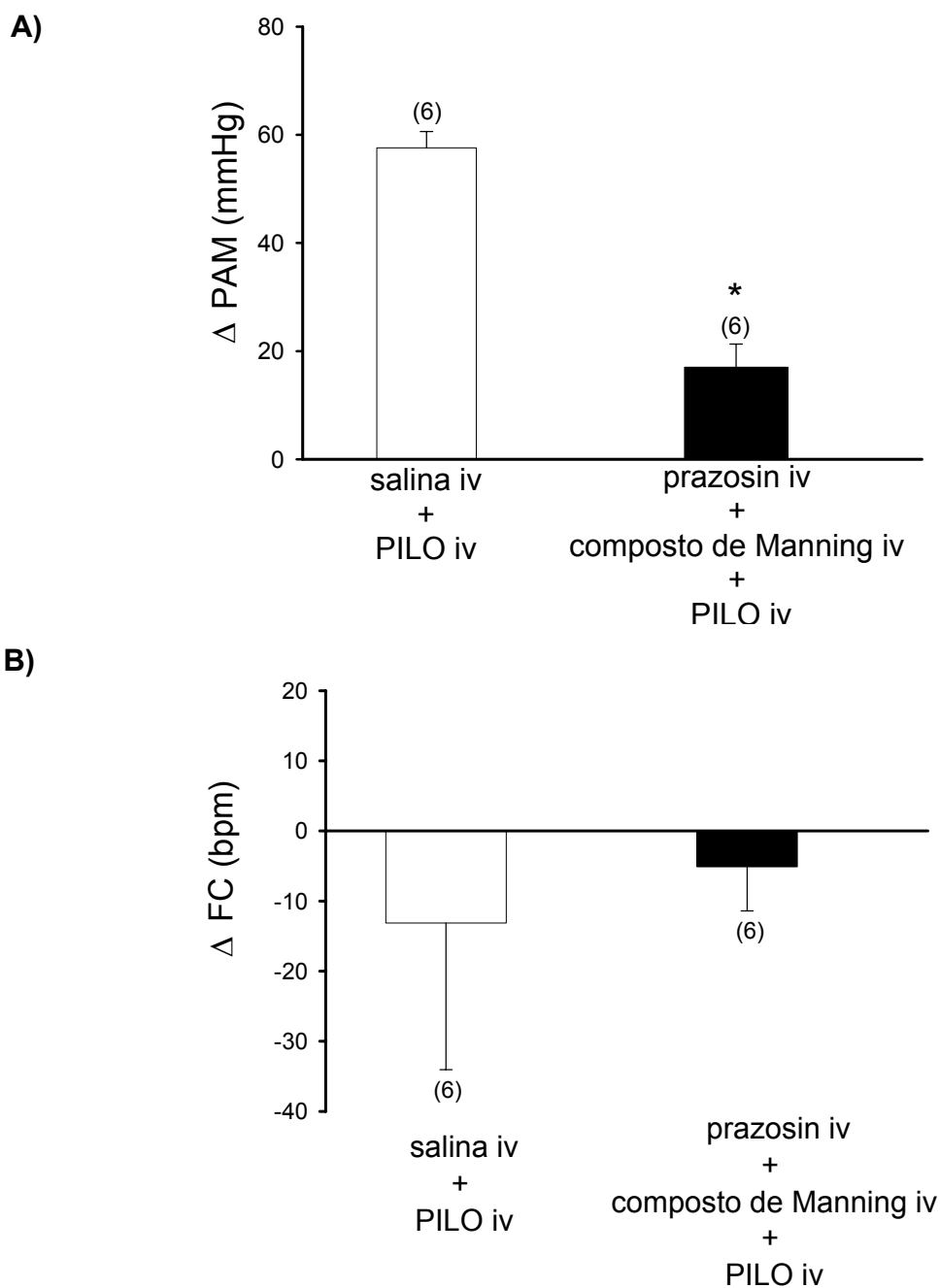
**B)**



**FIGURA 16:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam prévia injeção iv de prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina seguida de injeção iv de pilocarpina (PILO, 1 mg/kg de peso corporal). \* diferente de salina iv + PILO iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via de com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.18. Efeitos do duplo bloqueio (simpático e vasopressinérgico) sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção periférica de pilocarpina**

A injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) seguida da injeção de prazosin (1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal) reduziu a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv ( $17 \pm 4$  vs. salina iv:  $59 \pm 3$  mmHg), [F (1,6) = 113,121,  $P < 0,001$ ], figura 17A. Não houve alterações na FC após pilocarpina com pré-tratamento com salina ou prazosin + antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina, [F (1,6) = 0,131,  $P = 0,730$ ], figura 17B. Também não observamos uma redução adicional da PAM após o duplo bloqueio comparado ao bloqueio simpático ( $17 \pm 4$  vs. bloqueio simpático:  $21 \pm 5$  mmHg), [F (1,13) = 0,478,  $P = 0,501$ ].

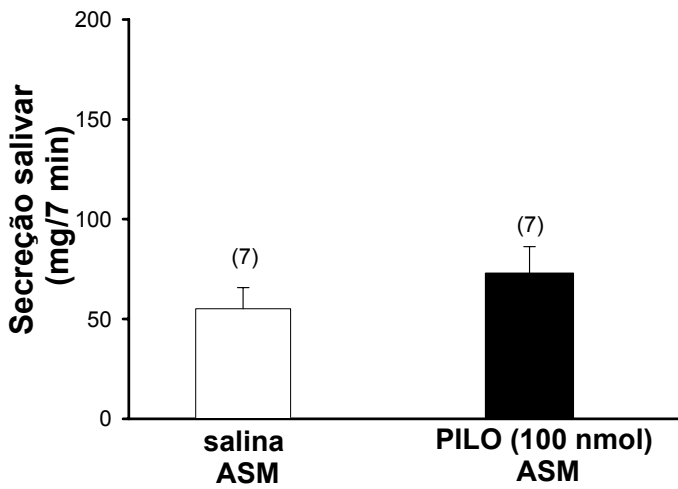
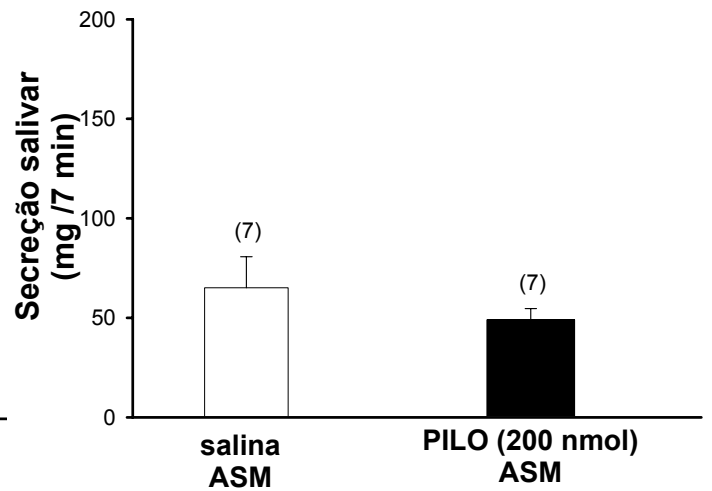
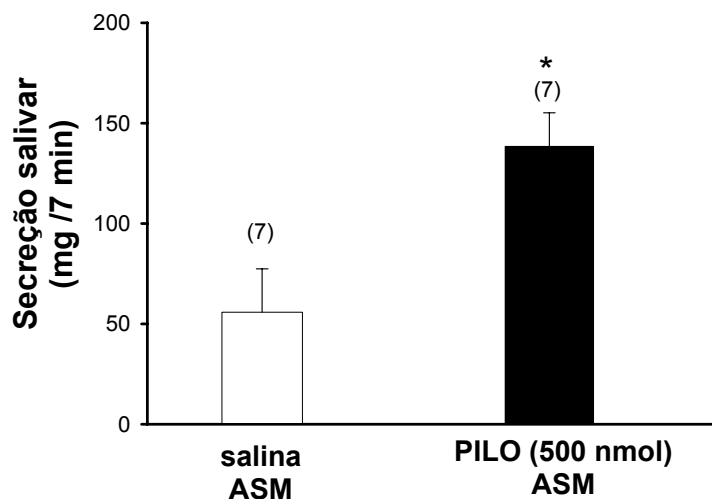


**FIGURA 17: A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam prévia injeção iv do antagonista do receptor  $V_{1a}$  de vasopressina (composto de Manning, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal), de prazosin (1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal) ou salina seguida de injeção iv de pilocarpina (PILO, 1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal). \* diferente de salina iv + PILO iv. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via de com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .



### **5.19. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a salivação**

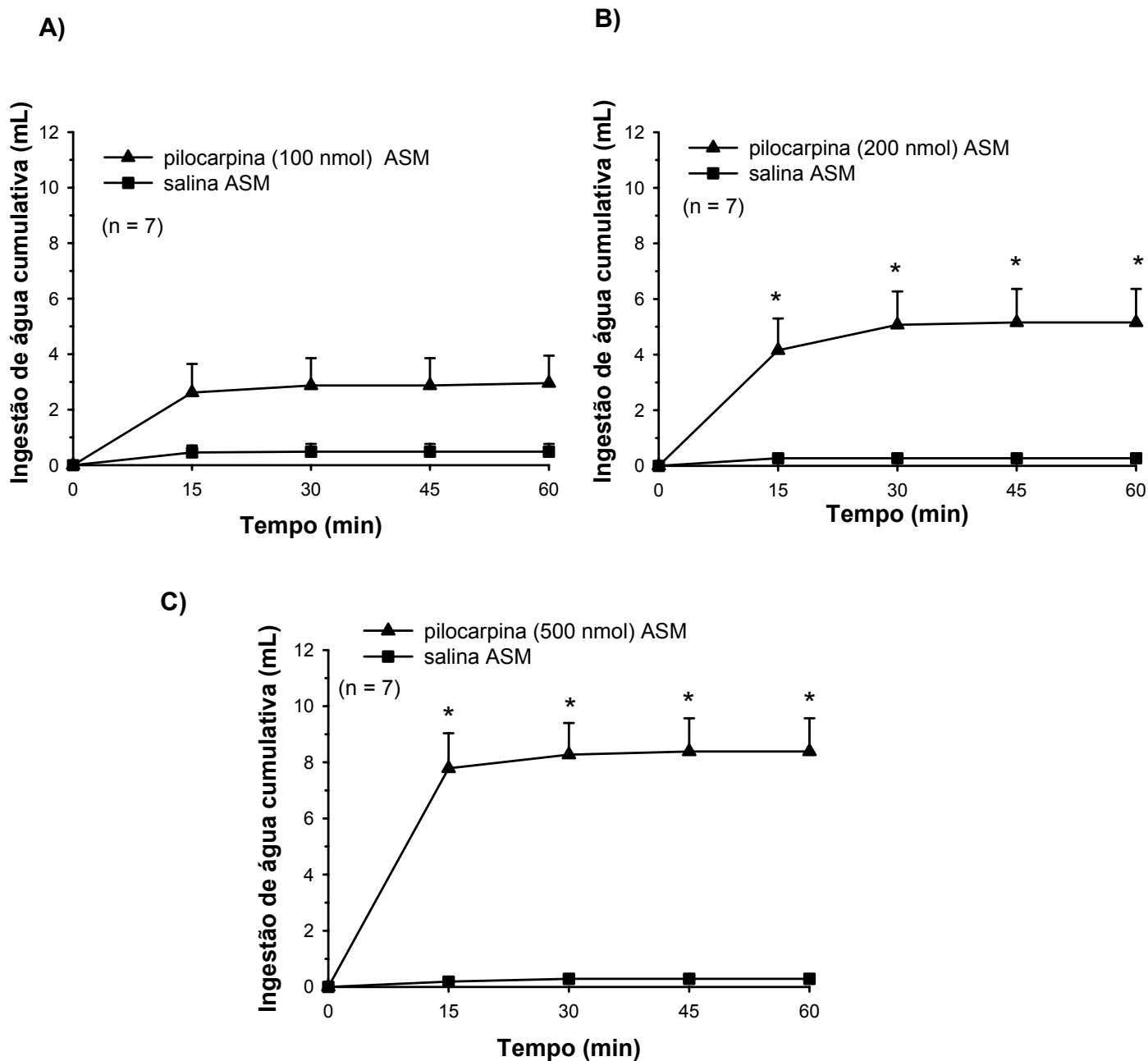
A salivação observada após pilocarpina na ASM na dose de 100 ( $73 \pm 13$  mg/7 min) e de 200 nmol/0,5  $\mu$ L ( $65 \pm 15$  mg/7 min) não foi diferente da observada após salina na ASM nos mesmos animais ( $55 \pm 11$  e  $49 \pm 6$  mg/7 min, respectivamente, controles de 100 e 200 nmol/0,5  $\mu$ L), [F (1,6) = 0,631, P = 0,457] e [F (1,6) = 1,042, P = 0,347], respectivamente. No entanto, a injeção de pilocarpina na dose de 500 nmol/0,5  $\mu$ L injetada na ASM aumentou significativamente a salivação comparado aos mesmos animais quando receberam injeção de salina na ASM (PILO na ASM:  $138 \pm 17$  vs. salina na ASM:  $55 \pm 22$  mg/7 min), [F (1,6) = 30,699, P <0,001. Esses resultados podem ser observados na figura 18 (A a C).

**A)****B)****C)**

**FIGURA 18:** A) Secreção salivar após pilocarpina (PILO, 100 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM, B) secreção salivar após pilocarpina (PILO, 200 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM, C) secreção salivar após pilocarpina (PILO, 500 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM. \* diferente de salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.20. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre ingestão de água**

A pilocarpina na dose de 100 nmol/0,5 µL injetada na ASM não causou alteração na ingestão de água quando comparado aos mesmos animais quando receberam injeção de salina na ASM ( $3 \pm 1$  vs. salina na ASM:  $0,5 \pm 0,3$  mL/1h), [F (1,18) = 4,383, P = 0,081]. A pilocarpina na dose de 200 nmol/0,5 µL aumentou significativamente a ingestão de água comparada aos mesmos animais quando receberam injeção de salina na ASM ( $5,2 \pm 1,2$  vs. salina na ASM:  $0,3 \pm 0,1$  mL/1h), [F (1,18) = 14,126, P < 0,009]. Observamos ainda que a dose de 500 nmol/0,5 µL de pilocarpina injetada na ASM foi capaz de promover um aumento ainda maior na ingestão de água quando comparada aos mesmos animais que receberam salina na ASM ( $8,4 \pm 1,2$  vs. salina na ASM:  $0,3 \pm 0,1$  mL/1h), [F (1,18) = 48,135, P < 0,001]. Todos esses resultados estão apresentados na figura 19.

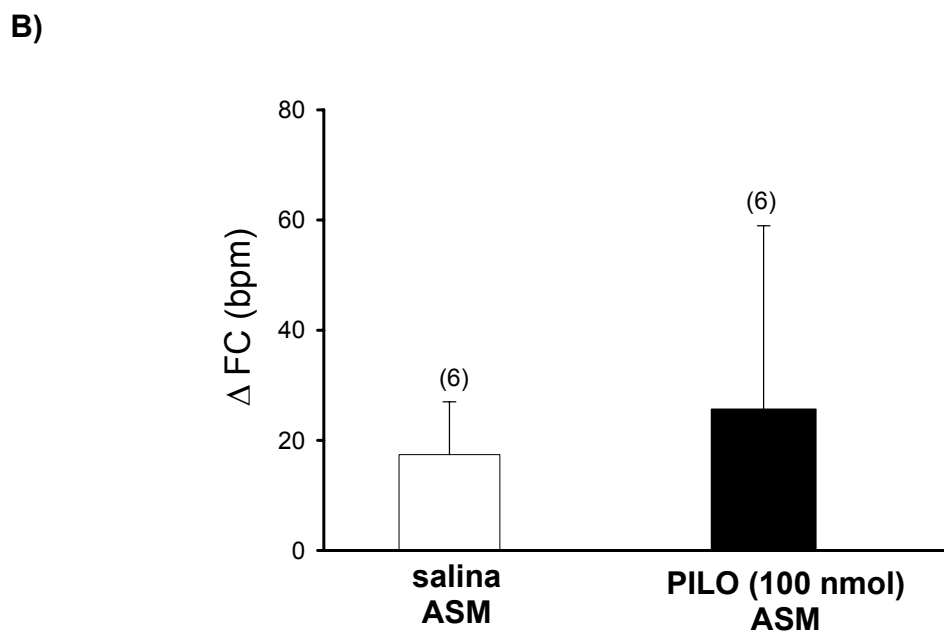
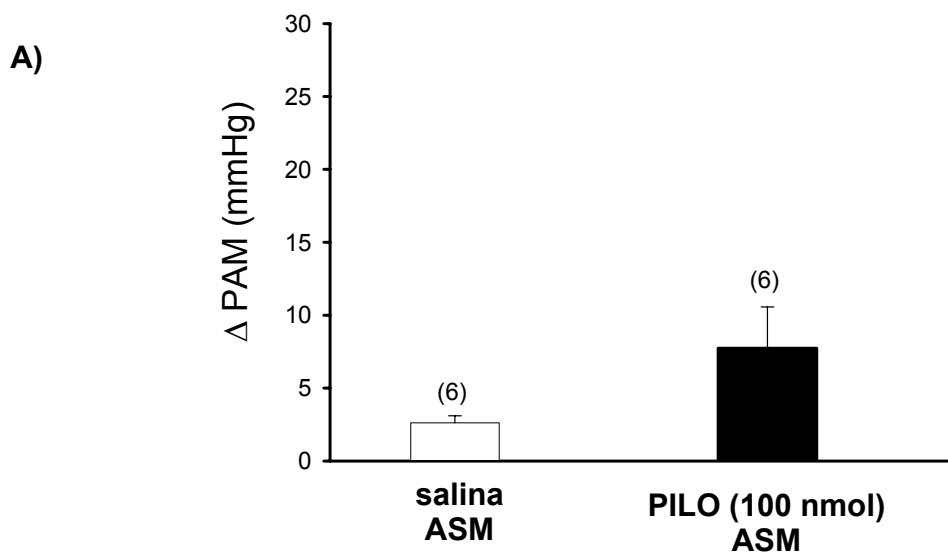


**FIGURA 19:** **A)** Ingestão de água após pilocarpina (PILO, 100 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM, **B)** ingestão de água após pilocarpina (PILO, 200 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM, **C)** ingestão de água após pilocarpina (PILO, 500 nmol/0,5  $\mu$ L) na ASM ou salina na ASM. \* diferente de salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

### **5.21. Efeitos da injeção de pilocarpina na ASM sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados**

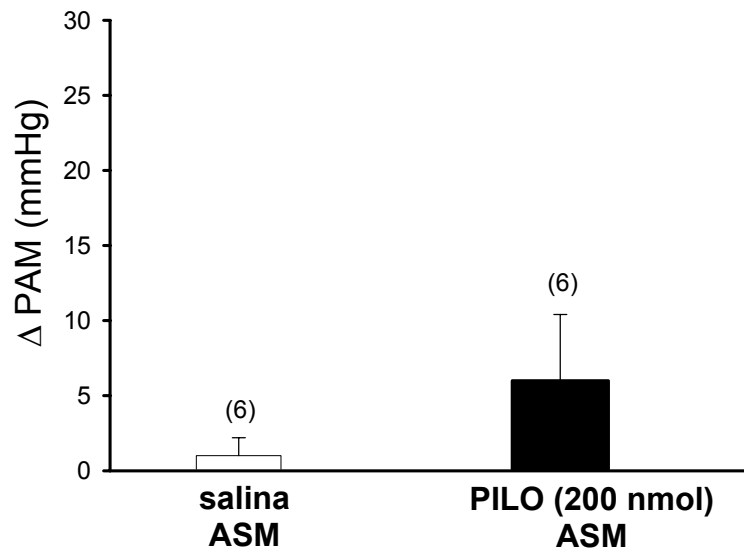
Podemos observar que a resposta pressora observada após pilocarpina na ASM na dose de 100 ( $8 \pm 3$  mmHg) e de 200 nmol/0,5  $\mu$ L ( $6 \pm 4$  mmHg) não foi diferente da observada após salina na ASM nos mesmos animais ( $3 \pm 1$  e  $1 \pm 1$  mmHg, respectivamente, controles de 100 e 200 nmol/0,5  $\mu$ L), [F (1,6) = 2,947, P = 0,137], figura 19A e [F (1,6) = 3,674, P = 0,104]. Essas doses de pilocarpina também não promoveram alterações significantes na FC (figuras 20B e 21B). No entanto, a injeção na ASM de pilocarpina na dose de 500 nmol/0,5  $\mu$ L causou aumento na PAM quando comparado os mesmos animais que receberam injeção de salina na ASM ( $21 \pm 6$  vs. salina na ASM:  $1 \pm 6$  mmHg), [F (1,6) = 18,178, P <0,005], figura 22A. Entretanto, esta dose não promoveu alteração na FC, como podemos observar na figura 22B.

Os valores basais de PAM e FC no grupo que recebeu PILO 100 nmol ou salina na ASM foram respectivamente: (PILO ASM 100 nmol:  $109 \pm 5$  vs. salina ASM:  $111 \pm 4$  mmHg) [F (1,13) = 1,668, p = 0,244]; (PILO ASM 100 nmol:  $349 \pm 11$  vs. salina ASM:  $343 \pm 8$  bpm), [F (1,13) = 0,304, p = 0,601]. Já no grupo que recebeu PILO 200 nmol ou salina na ASM, os valores basais de PAM e FC foram respectivamente: (PILO ASM 200 nmol:  $123 \pm 5$  vs. salina ASM:  $120 \pm 5$  mmHg), [F (1,13) = 0,818, p = 0,401]; (PILO ASM 200 nmol:  $386 \pm 19$  vs. salina ASM:  $394 \pm 30$  bpm), [F (1,13) = 0,0814, p = 0,785]. O grupo que recebeu PILO 500 nmol ou salina na ASM, os valores basais de PAM e FC foram respectivamente: (PILO ASM 500 nmol:  $121 \pm 3$  vs. salina ASM:  $125 \pm 4$  mmHg), [F (1,13) = 2,301, p = 0,180]; (PILO ASM 500 nmol:  $360 \pm 16$  vs. salina ASM:  $376 \pm 27$  bpm), [F (1,13) = 1,259, p = 0,305].

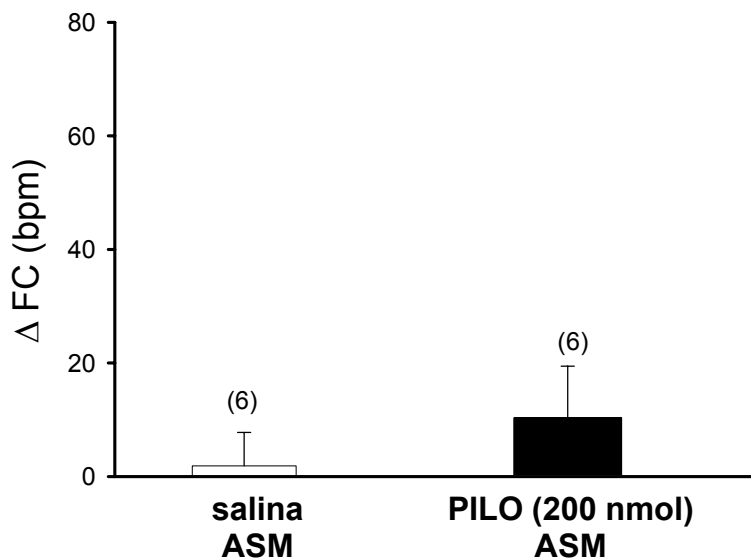


**FIGURA 20:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de pilocarpina (100 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .

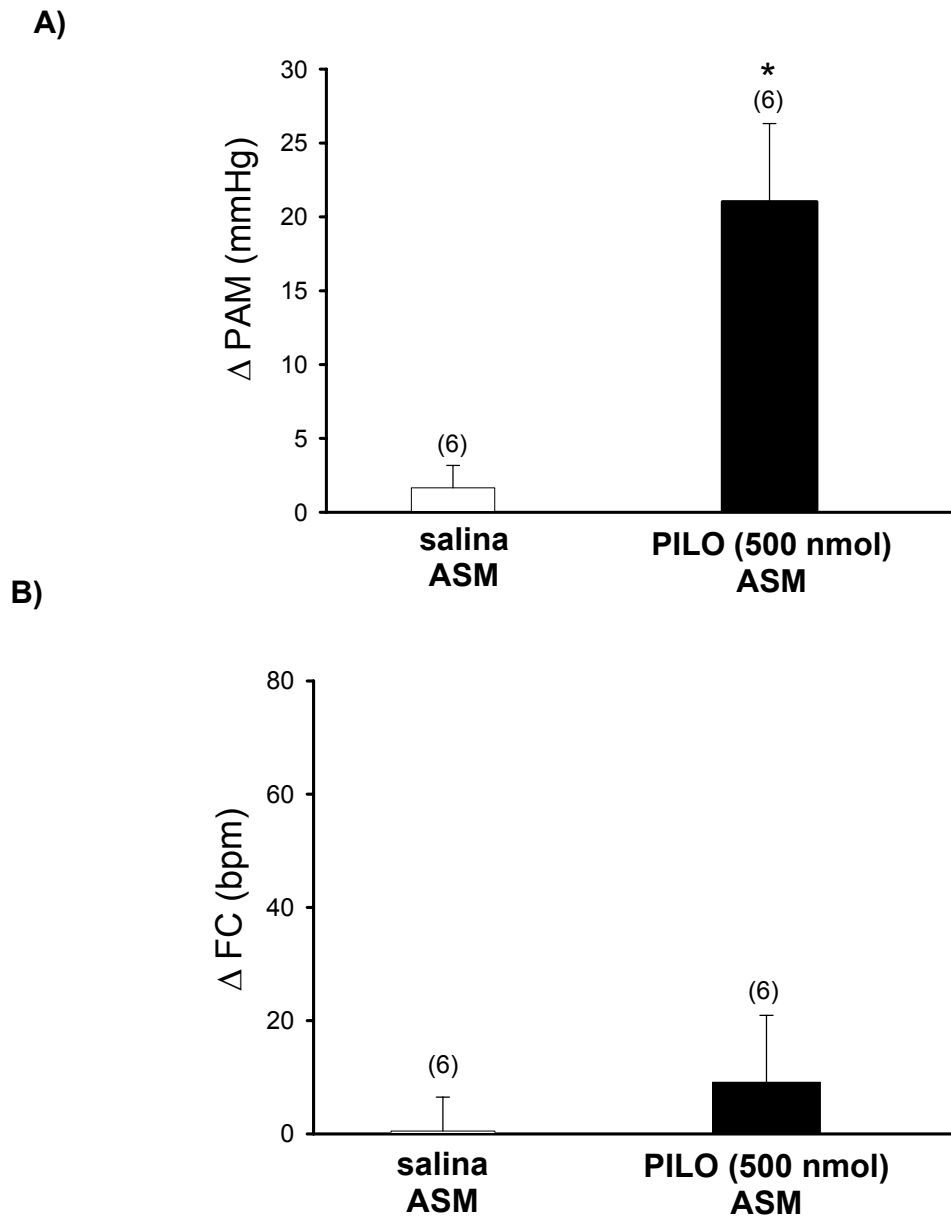
**A)**



**B)**



**FIGURA 21:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de pilocarpina (200 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ . ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .



**FIGURA 22:** **A)** variação da pressão arterial média (PAM), **B)** variação da frequência cardíaca (FC), em ratos que receberam injeção de pilocarpina (500 nmol/0,5  $\mu$ L) ou salina na ASM. \* diferente de salina na ASM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Entre parênteses está representado o número de animais. ANOVA de uma via com medidas repetidas, associado ao teste LSD de Fisher,  $P < 0,05$ .



## **6. DISCUSSÃO**

Os nossos resultados mostram que a injeção periférica e na ASM de pilocarpina induz secreção salivar, ingestão de água e aumento da PAM. O aumento na PAM após a pilocarpina periférica é provavelmente decorrente de um aumento na atividade do sistema nervoso simpático, já que a injeção de prazosin ou do duplo bloqueio foi eficaz em reduzir a resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica, além disso, o duplo bloqueio não promoveu uma redução adicional da resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica. A lesão aguda da ASM foi capaz de reduzir a secreção salivar e a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip. A lesão crônica foi capaz de reduzir apenas a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip, não alterando a secreção salivar. O tratamento prévio com metil-atropina na ASM reduziu tanto a secreção salivar como a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip. A resposta pressora induzida pela pilocarpina iv não foi alterada pela lesão aguda ou crônica da ASM ou pelo tratamento com metil-atropina na ASM. A injeção de pilocarpina na dose de 500 nmol na ASM induziu salivação, ingestão de água e resposta pressora, já a injeção de doses menores de pilocarpina (200 nmol) foi capaz de induzir ingestão de água.

Agonistas colinérgicos muscarínicos como a pilocarpina injetada ip ou icv induzem salivação (Renzi et al., 1993; Moreira et al., 2001; Moreira et al., 2002b; Takakura et al., 2003a; Takakura et al., 2003b; Lopes de Almeida et al., 2006). No presente estudo utilizamos a dose de 1 mg/kg de peso corporal, mas doses mais baixas como 1,2  $\mu$ mol/kg de peso corporal (equivalente a 0.3 mg/kg de peso corporal) já é capaz de induzir salivação (Sato et al., 2006). Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a lesão aguda da ASM (1 dia) foi capaz de reduzir a salivação induzida pela pilocarpina ip. Esses resultados se assemelham aos resultados observados em animais com lesão aguda da região AV3V (Renzi et al., 1993), HL (Renzi et al., 2002) ou APM (Lopes de Almeida et al., 2006), os quais tiveram uma redução da salivação induzida por pilocarpina ip após a lesão destas áreas centrais. Entretanto, a lesão crônica (15 dias) da ASM não alterou a salivação induzida pela pilocarpina ip, assim como lesões crônicas de outras áreas prosencefálicas (AV3V, HL e APM) também não foram capazes de alterar a salivação induzida pela pilocarpina ip (Renzi et al., 1993; Renzi et al., 2002; Lopes de Almeida et al., 2006).

É possível que a plasticidade neural seja o mecanismo envolvido com a recuperação dos efeitos centrais induzidos pela pilocarpina ip. Embora o controle exercido pela ASM sobre a salivação desapareça imediatamente após sua lesão, alguns dias após a lesão outras áreas do SNC podem se reorganizar, de modo que a função (no caso salivação) seja restabelecida. O restabelecimento de funções após vários dias de lesão da ASM tem sido descrito para a ingestão de água, resposta pressora e natriurética induzida pela estimulação colinérgica central (Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1994). A ASM tem conexões anatômicas e funcionais com a região AV3V, HL e APM (Swanson e Cowan, 1979; Ferguson et al., 1985; Donevan e Ferguson, 1988; Menani et al., 1990; Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1992b; Colombari et al., 1994; Haibara et al., 1994), e todas essas três áreas são importantes para o efeito sialogogo da pilocarpina. O efeito da pilocarpina em uma ou mais dessas áreas pode não depender da ASM em ratos com lesão crônica da ASM.

Takakura e cols. (Takakura et al., 2003b) demonstraram uma redução da salivação induzida por pilocarpina ip quando doses crescentes de metil-atropina foram injetadas no ventrículo lateral. Nossos dados também demonstraram que a injeção de 4 ou 8 nmol de metil-atropina na ASM promoveu uma redução da salivação induzida por pilocarpina ip, mostrando que os receptores colinérgicos muscarínicos da ASM também participam da salivação induzida pela pilocarpina ip. Os compostos derivados de amônio quaternário, como a metil-atropina, são conhecidos por se difundir fracamente pela barreira hematoencefálica (Ghelardine et al., 1990; Pertwee e Ross, 1991). Os nossos dados, bem como os observados por Takakura e cols. (Takakura et al., 2003b), os quais mostram que a injeção na ASM (presente resultados) ou icv (Takakura et al., 2003b) de metil-atropina não altera os efeitos cardiovasculares da acetilcolina iv, confirmam que a metil-atropina não atravessa a barreira hematoencefálica. Também demonstramos claramente através do esquema representado na figura 3 que a injeção de metil-atropina não está se espalhando para áreas adjacentes, como o ventrículo lateral. Segundo nosso esquema o espalhamento rostro-caudal promovido pela injeção de metil-atropina/Azul de Evans na ASM é de 1,44 mm (a extensão rostro-caudal da ASM é de 1,56 mm), e não há espalhamento radial. Além disso, podemos observar através das tabelas 2 a 6 que a injeção de matil-atropina em locais ao redor da ASM (animais com injeções ASM negativas) não promove

alteração da salivação ou da ingestão de água. Desta forma, a redução na salivação induzida pela metil-atropina observada nos nossos experimentos não é decorrente do extravasamento de metil-atropina para a circulação sistêmica, causando um bloqueio nos receptores colinérgicos muscarínicos das glândulas salivares, ou do espalhamento da droga para outras áreas encefálicas, mas sim do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos da ASM.

Nossos dados mostram pela primeira vez que a pilocarpina injetada diretamente na ASM é capaz de promover salivação. Renzi e cols. (Renzi et al., 1993) mostraram que a injeção de pilocarpina icv (500 nmol/1  $\mu$ L) promovia uma secreção salivar de magnitude similar àquela induzida pela pilocarpina injetada ip na dose de 1 mg/kg de peso corporal. Quando injetamos pilocarpina na ASM, o aumento observado na salivação na dose de 500 nmol/0,5  $\mu$ L foi menor do que aquele observado quando injetamos pilocarpina ip (1 mg/kg de peso corporal). É possível que nossos resultados diferem-se dos de Renzi e cols. (Renzi et al., 1993) porque quando é feita a injeção de pilocarpina icv, esta pode agir em várias áreas periventriculares para induzir a salivação. Já quando injetado na ASM, seu efeito fica restrito nesta área. Vale também salientar que a lesão da região AV3V, que lesa várias regiões periventriculares é muito mais eficaz em reduzir a secreção salivar induzida pela pilocarpina ip do que a lesão da ASM. Desta forma, embora a ASM seja importante para o efeito sialogogo da pilocarpina ip, outras áreas hipotalâmicas parecem exercer uma função maior sobre esta resposta.

As glândulas salivares e/ou os núcleos salivatórios do bulbo recebem projeções diretas do OSF e de áreas hipotalâmicas como HL, APM e do órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT – parte da região AV3V), (Hübschle et al., 1998; Hübschle et al., 2001). A ASM embora não inerve diretamente as glândulas salivares ou os núcleos salivatórios do bulbo, está conectada anatômica e funcionalmente com as áreas acima descritas (Swanson e Cowan, 1979; Ferguson et al., 1985; Donevan e Ferguson, 1988; Menani et al., 1990; Luiz et al., 1991; Colombari et al., 1992b; Colombari et al., 1994; Haibara et al., 1994). Assim, podemos explicar a indução da secreção salivar pela injeção de pilocarpina na ASM, e também porque ocorre a redução da resposta sialogoga da pilocarpina ip em ratos com lesão da ASM ou com os receptores colinérgicos muscarínicos da ASM bloqueados.

A salivação junto com o “grumming” (ato do rato se lamber) é um potente estímulo para a redução da temperatura corporal em ratos, e a participação de áreas centrais, como a região AV3V, no controle da secreção salivar (Renzi et al., 1993) e controle de temperatura por meio da salivação em ratos já foram estudados (Whyte e Johnson, 2002; Whyte e Johnson, 2005). Tem sido demonstrado que a ASM participa no controle da temperatura corporal e faz parte do mecanismo termorregulatório no rato (Srividya et al., 2005a; Srividya et al., 2005b), já que a lesão da ASM promove redução da temperatura corporal do animal e também promove uma perda de tolerância do animal ao frio ou ao calor (Srividya et al., 2005b). Desta forma, em termos funcionais, poderíamos pensar na hipótese de que a participação da ASM na regulação da secreção salivar possa estar relacionada ao controle de temperatura corporal. Evidentemente, mais estudos serão necessários para testar esta hipótese.

A participação da ASM na regulação da ingestão de água induzida por agonistas colinérgicos, como o carbacol, injetados em áreas cerebrais tem sido demonstrada. A injeção de carbacol icv, na ASM ou no OSF induz potente ingestão de água (Fitts e Simpson, 1986; Menani et al., 1990; Colombari et al., 1992a; Colombari et al., 1992b). A lesão aguda, mas não crônica, da ASM reduz a ingestão de água induzida pelo carbacol icv (Luiz et al., 1991). Além disso, a injeção ip de pilocarpina também é capaz de induzir ingestão de água, embora a dose de pilocarpina ip para produzir este efeito seja a partir de 4  $\mu\text{mol/kg}$ , ou seja, 1 mg/kg de peso corporal (Sato et al., 2006). Em nosso estudo demonstramos que a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip foi significativamente reduzida pela lesão aguda ou crônica da ASM, sugerindo que a ASM participa da resposta dipsogênica da pilocarpina ip. Esses nossos resultados diferem dos observados por Luiz e cols. (Luiz et al., 1991), onde apenas a lesão aguda da ASM foi efetiva em reduzir a respostas dipsogênica do carbacol. É possível que a pilocarpina ip, sendo altamente lipossolúvel e com capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica (Freedman et al., 1989), ative circuitos neurais diferentes dos ativados por carbacol icv (que não tem a capacidade de se difundir como a pilocarpina), e os circuitos neurais ativados pela pilocarpina ip são profundamente afetados pela lesão da ASM.

À semelhança do observado nos resultados de salivação, a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip também foi reduzida após o pré-tratamento com metil-

atropina na ASM. A participação de receptores colinérgicos muscarínicos centrais sobre a resposta dipsogênica tem sido documentada (Barbosa et al., 1995; Sato et al., 2006). Barbosa e cols. (Barbosa et al., 1995) demonstraram que o pré-tratamento com metil-atropina na ASM foi capaz de reduzir a resposta dipsogênica do carbacol injetado icv. Ademais, a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip foi reduzida pelo tratamento prévio com metil-atropina icv (Sato et al., 2006). Portanto, os resultados de lesão aguda e crônica da ASM em conjunto com os resultados do pré-tratamento com metil-atropina na ASM sugerem que esta área faz parte da circuitaria prosencefálica envolvida na resposta dipsogênica da pilocarpina ip e que esta resposta é mediada por receptores colinérgicos muscarínicos da ASM.

Observamos também resposta dipsogênica após a injeção de pilocarpina nas doses de 200 e 500 nmol na ASM. Uma vez que a dose de 200 nmol de pilocarpina na ASM já foi capaz de promover ingestão de água, podemos sugerir que a pilocarpina na ASM possui uma função predominante para ingestão de água induzida pela pilocarpina, já apenas doses maiores (500 nmol) de pilocarpina foram capazes de promover salivação ou resposta pressora (a ser discutido). Como já mencionado anteriormente, a injeção do agonista colinérgico carbacol em várias áreas do SNC, incluindo a ASM, ou a injeção periférica de pilocarpina é capaz de promover resposta dipsogênica (Fitts e Simpson, 1986; Menani et al., 1990; Colombari et al., 1992a; Colombari et al., 1992b; Sato et al., 2006). Desta forma, a ASM parece ser uma área do SNC que desempenha um papel fundamental na regulação da resposta dipsogênica induzida pela injeções centrais ou periféricas de agonistas colinérgicos.

Um aumento na ingestão diária de água ou um aumento na ingestão de água induzida por estímulos hipovolêmicos tem sido descritos em ratos com lesão da área septal (Negro-Vilar et al., 1967; Blass e Hanson, 1970; Blass et al., 1974). Entretanto, nosso presente estudo bem como de outros (Colombari et al., 1994) demonstraram que a lesão específica da ASM não promoveu alteração da ingestão diária de água. Desta forma, a hiperdipsia causada por lesões da área septal parece estar relacionada com o tamanho da lesão ou com lesão específica de sub-áreas da área septal.

Tem sido demonstrado que a ASM participa da resposta pressora induzida por agonistas colinérgicos como o carbacol, injetado centralmente (Luiz et al., 1991;

Colombari et al., 1994). Entretanto, nossos resultados mostram que ao contrário do observado com o carbacol central, o efeito pressor da pilocarpina ip não foi alterado pela lesão aguda (1 h ou 1 dia) ou crônica da ASM. Desta maneira os nossos resultados sugerem uma diferença de ativação de vias neurais pelo carbacol central e pela pilocarpina periférica para produzir aumento da pressão arterial. Alternativamente, poderia também se pensar, que a lesão da ASM não alterou o efeito pressor da pilocarpina iv, por esta droga causar hipertensão devido a uma ação periférica. Contudo já está bem determinado que a pilocarpina periférica promove aumento da pressão arterial devido à sua ação no SNC (Moreira et al., 2003b; Takakura et al., 2005). Takakura e cols. (Takakura et al., 2005) demonstraram claramente que em ratos com lesão aguda (1 h ou 2 dias) da região AV3V, a resposta pressora da pilocarpina ip foi convertida em hipotensão, a qual foi bloqueada pelo tratamento prévio com metil-atropina iv, mostrando que a ação periférica da pilocarpina ip é hipotensão.

A ausência de efeito da lesão da ASM na resposta pressora induzida pela pilocarpina ip sugere que a ASM não é ativada para que haja aumento da PAM induzida pela pilocarpina iv. Corroborando estes dados, nossos resultados também demonstraram que o tratamento prévio com metil-atropina na ASM, tanto na dose de 4 como de 8 nmol, não modificou a resposta pressora da pilocarpina iv. Uma vez que outras áreas encefálicas, como a região AV3V foi capaz de, pelo menos agudamente, bloquear (7 dias de lesão) ou mesmo converter em hipotensão (1 h ou 2 dias de lesão) a resposta pressora da pilocarpina ip (Takakura et al., 2005), sugere que embora a resposta pressora da pilocarpina periférica dependa de áreas do SNC, a ASM não faz parte desta via neural.

Além da pilocarpina ip, a injeção icv de carbacol ou de pilocarpina também causa potente resposta pressora (Menani et al., 1990; Colombari et al., 1992a; Colombari et al., 1992b; Moreira et al., 2002a). O efeito pressor do carbacol injetado no SNC é decorrente de um aumento na atividade simpática e da secreção de vasopressina (Hoffman et al., 1977; Imai et al., 1989). Dados da literatura mostraram que a resposta pressora da pilocarpina ip é devido a um grande aumento na resistência periférica mesentérica (Takakura et al., 2005). Verificamos que o bloqueio de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, mas não o bloqueio de receptores de vasopressina foi capaz de reduzir a resposta pressora da

pilocarpina iv, sugerindo que a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv é decorrente de uma ativação do simpático.

É interessante observar que apesar da lesão da ASM ou o bloqueio colinérgico muscarínico da ASM não ter alterado a resposta pressora da pilocarpina iv, a injeção de pilocarpina diretamente na ASM produziu resposta pressora na dose de 500 nmol. Essa resposta pressora induzida pela pilocarpina na ASM é de magnitude semelhante à resposta pressora induzida pela injeção de carbacol na ASM (Luiz et al., 1991 e Colombari et al, 1992b), no entanto, a resposta pressora induzida pela injeção de pilocarpina na ASM foi de magnitude muito inferior à observada após a injeção iv de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal). Podemos então pensar que os circuitos neurais envolvidos na resposta pressora da pilocarpina iv são diferentes dos envolvidos na resposta pressora induzida pela pilocarpina na ASM. Como citado anteriormente, a pilocarpina periférica pode atingir amplas regiões do sistema nervoso central, diferentemente da injeção de pilocarpina diretamente na ASM. Ademais, os mecanismos pelos quais a pilocarpina na ASM promove resposta pressora podem diferir do mecanismo pressor (aumento no simpático) induzida pela pilocarpina iv. É conhecido que a área septal tem conexões com o NSO (Tavares et al., 2005), que é o principal núcleo do SNC produtor/secretor de vasopressina. Seria interessante estudar os mecanismos pelos quais a pilocarpina na ASM promove sua resposta pressora, e se for um mecanismo dependente de vasopressina, poderia explicar as diferenças nas respostas obtidas (PILO iv + lesão ASM vs. PILO ASM).

Enquanto que os efeitos da pilocarpina na pressão arterial, em ratos anestesiados ou acordados foram consistentes, o mesmo não ocorreu com os seus efeitos na frequência cardíaca. Em ratos anestesiados observamos uma taquicardia, essa taquicardia pode ser devido ao estresse cirúrgico sofrido pelo animal, já que as respostas cardiovasculares foram medidas após 1 hora de lesão da ASM. E em ratos não anestesiados, por outro lado, houve uma grande variação nas respostas de frequência cardíaca. Nos ratos com lesão aguda da ASM ou lesão fictícia, no grupo de ratos que foi feito experimentos com metil-atropina ou no grupo de ratos que receberam injeção na ASM de pilocarpina não houve alterações significantes na frequência cardíaca. Nos ratos com lesão crônica da ASM ou com lesão fictícia houve uma ligeira bradicardia, mas no geral a injeção de

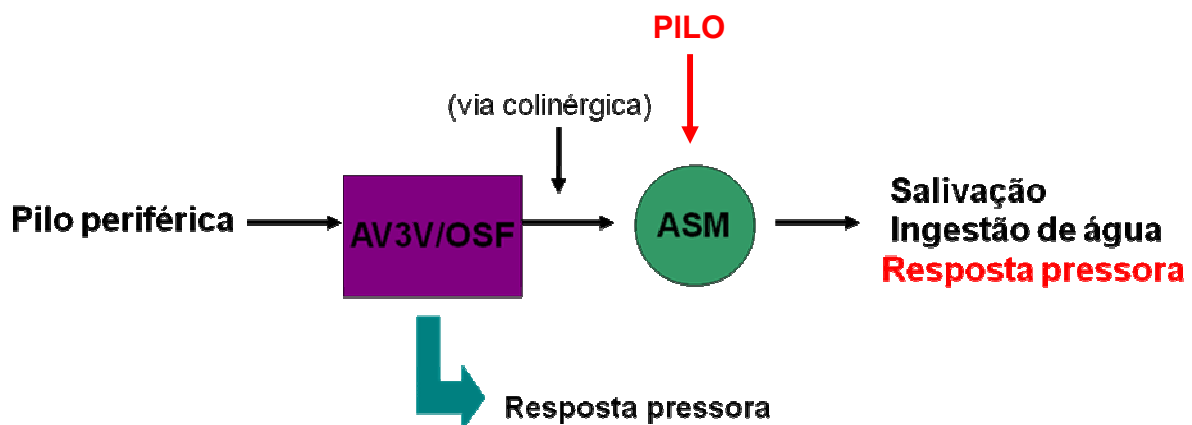
pilocarpina periférica ou na ASM promoveu bradicardia, mesmo não sendo significante, e isso pode ser possivelmente de origem reflexa. Independente da resposta na frequência cardíaca após a pilocarpina ser taquicardia ou bradicardia, a lesão da ASM não as modificou. Nos ratos que foi injetado acetilcolina iv, embora fosse de se esperar uma bradicardia após a acetilcolina iv, é possível que essa resposta tenha sido rapidamente suplantada por uma taquicardia reflexa. Talvez para observarmos uma bradicardia após a acetilcolina iv seria necessário aumentar a dose. De qualquer modo, a resposta hipotensora da acetilcolina foi observada, e não foi alterada pela administração de metil-atropina na ASM.

Além da ASM (presente estudo) participar da salivação e ingestão de água induzidas pela pilocarpina ip e da região AV3V (Takakura et al., 2005) participar da resposta pressora induzida pela pilocarpina ip, um recente estudo demonstrou que a injeção ip de pilocarpina na dose de 12  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal (equivalente a 3 mg/kg de peso corporal) promove uma grande ativação de diversas outras áreas prosencefálicas, como o OSF, NPV, NSO e OVLT (Inenaga et al., 2008), uma vez que ocorre um aumento da expressão da proteína c-fos nessas áreas. Essas áreas são ou podem ser (visto que nem todas foram estudadas) importantes para a resposta dipsogênica, pressora e sialogoga induzidas pela pilocarpina ip. Entretanto, esses autores utilizaram uma dose de pilocarpina três vezes maior do que a usada neste estudo, e isto pode ter promovido uma ativação mais intensa dessas áreas centrais após a injeção de pilocarpina ip. Além disso, esse estudo confirma mais uma vez que áreas cerebrais são ativadas após a pilocarpina ip, mostrando a grande dependência do SNC para as respostas da pilocarpina ip.

Assim, podemos sugerir através dos nossos resultados (ver esquema abaixo) que a pilocarpina periférica não atua diretamente na ASM, mas poderia estar atuando primeiramente em áreas prosencefálicas como a região AV3V, já que essa área é livre de barreira hematoencefálica e também muito importante para a resposta pressora e salivação induzida pela pilocarpina periférica. Desta forma, a pilocarpina periférica poderia atuar na região AV3V e assim, ativando uma via colinérgica que iria liberar acetilcolina na ASM e então, promover salivação e ingestão de água. A pilocarpina injetada perifericamente poderia atuar tanto na região AV3V quanto no OSF para promover resposta pressora (pilocarpina injetada no OSF promove uma despolarização da



membrana dos neurônios do OSF; Inenaga et al., 2008). Essa via neural ativada pela pilocarpina periférica é independente da ASM, já que os nossos resultados demonstraram claramente que nem a lesão aguda e crônica da ASM, nem o bloqueio colinérgico da ASM não promove alteração da resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica. A pilocarpina injetada na ASM poderia ativar a mesma via neural ativada pela pilocarpina periférica para promover salivação e ingestão de água. No entanto, a pilocarpina injetada na ASM estaria ativando uma via neural independente da via neural ativada pela pilocarpina periférica para promover resposta pressora, já que a resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica independe da ASM.



## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados mostram que a pilocarpina periférica ou na ASM induz salivação, ingestão de água e resposta pressora. A resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica é decorrente provavelmente de um aumento na atividade simpática. A ASM e seus receptores colinérgicos muscarínicos participam do controle da secreção salivar e ingestão de água, mas não da resposta pressora induzida pela pilocarpina periférica, sugerindo um controle diferencial da ASM nas respostas induzidas pela administração periférica de pilocarpina.

## **8. REFERÊNCIAS**

1. Babic, T., S. Roder, e J. Ciriello, 2004, Direct projections from the caudal ventrolateral medullary depressor sites to the subfornical organ: *Brain Res.*, v. 1003, p. 113-121.
2. Barbosa, S. P., J. I. F. De Gobbi, L. Zilioli, L. A. Camargo, W. A. Saad, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 1995, Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats: *Brain Res.Bull.*, v. 37, no. 5, p. 463-466.
3. Bender, R., M. Plaschke, T. Naumann, P. Wahle, e P. Frotscher, 1999, Development of cholinergic and GABAergic neurons in the rat medial septum: different expression of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase mRNA: *J.Comp.Neurol.*, v. 372, p. 304-314.
4. Blass, E. M., e D. G. Hanson, 1970a, Primary hyperdipsia in the rat following septal lesions: *J.Comp.Physiol.Psychol.*, v. 70, p. 200-205.
5. Blass, E. M., A. I. Nussbaum, e D. G. Hanson, 1974, Septal hyperdipsia: Specific enhancement of drinking to angiotensin in rats: *J.Comp.Physiol.Psychol.*, v. 87, p. 422-439.
6. Calaresu, F. R., J. Ciriello, e G. J. Mogenson, 1976, Identification of pathways mediating cardiovascular responses elicited by stimulation of the septum in the rat: *J.Physiol.*, v. 260, p. 515-530.
7. Callera, J. C., W. A. Saad, L. A. Camargo, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 1994, Role of the adrenergic pathways of the lateral hypothalamus on water intake and pressor response induced by cholinergic activation of the medial septal area in rats: *Neurosci.Lett.*, v. 167, p. 153-155.

8. Colombari, D. S. A., A. S. Haibara, L. A. A. Camargo, W. A. Saad, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 1994, Role of medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats: *Brain Res.Bull.*, v. 33, p. 249-254.
9. Colombari, D. S. A., W. A. Saad, L. A. A. Camargo, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, E. Colombari, e J. V. Menani, 1992a, AV3V lesion impair responses induced by cholinergic activation of SFO in rats: *Am.J.Physiol.*, v. 263, p. R1277-R1283.
10. Colombari, E., W. A. Saad, L. A. A. Camargo, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 1992b, AV3V lesion supresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats: *Brain Res.*, v. 572, p. 172-175.
11. Dampney, R. A. L., 1994, Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system: *Physiological Reviews*, v. 74, no. 2, p. 323-364.
12. Disko, U., A. Haaf, E. Gazyakan, B. Heimrich, R. Jackisch, Postnatal development of muscarinic autoreceptors in the brain: lateral and medial septal nuclei and diagonal band of Broca: *Developmental Brain Res.* v. 114, p. 1-8.
13. Donevan, S. D., e A. V. Ferguson, 1988, Subfornical organ and cardiovascular influences on identified septal neurons: *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 254, no. 3, p. R544-R551.
14. Feigl,EO. Reflex parasympathetic coronary vasodilation elicited from cardiac receptors. *Circulation Research* 37, 175-182. 1975.
15. Ferguson, A. V., C. W. Bourque, e L. P. Renaud, 1985, Subfornical organ and supraoptic nucleus connections with septal neurons in rats: *AJP - Legacy*, v. 249, p. 214-218.
16. Ferguson, M., 1993, Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction: *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.*, v. 75, p. 186-191.

17. Fitts, D. A., e J. B. Simpson, 1986, Drinking and natriuresis during volume expansion and intracranial angiotensin or carbachol: *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 251, no. 2, p. R381-R387.
18. Franci, C. R., C. R. Silva-Netto, W. A. Saad, L. A. Camargo, e J. Antunes-Rodrigues, 1980, Interactions between the lateral hypothalamic area (LHA) and the medial septal area (MSA) in the control of sodium and potassium excretion: *Physiol.Behav.*, v. 25, p. 801-806.
19. Freedman,SB, E A Harley, S Patel. Direct measurement of muscarinic agents in the central nervous system of the mice using ex vivo binding. *European J.Pharmacol.* 174, 256-270. 1989.
20. Fregly, M. J., 1980, Attenuation of pilocarpine-induced drinking by chronic treatment with strogens: *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, v. 164, p. 178-183.
21. Fregly, M. J., D. L. Kelleher, e J. E. Greenleaf, 1981, Antidipsogenic effect of clonidine on angiotensin II-, hypertonic saline-, pilocarpine- and dehydration-induced water intakes: *Brain Res.Bull.*, v. 7, p. 661-664.
22. Freund, T., e M. Antal, 1988, GABA-containing neurons in the septumcontrol inhibitory interneurons in the hippocampus.: *Nature*, v. 336, p. 170-173.
23. Ghelardine, C., P. Malmberg-Aiello, A. Giotti, N. Malcangio, e A. Bartolini, 1990, Investigation into atropine-induced antinoception: *Br.J.Pharmacol.*, v. 101, p. 49-54.
24. Haibara, A. S., W. A. Saad, J. V. Menani, L. A. A. Camargo, e A. Renzi, 1994, Role of lateral hypothalamus on fluid, electrolyte, and cardiovascular responses to cholinergic activation of the MSA: *Am.J.Physiol.*, v. 266, p. R496-R502.
25. Hoffman, W. E., M. I. Phillips, P. G. Schmid, J. Falcon, e J. F. Weet, 1977, Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation: *Neuropharmacology*, v. 16, p. 463-472.

26. Hübschle, T., M. L. Mathai, M. J. McKinley, e B. J. Oldfield, 2001, Multisynaptic neuronal pathways from the submandibular and sublingual glands to the lamina terminalis in the rat: a model for the role of the lamina terminalis in the control of osmo-and thermoregulatory behaviour: *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*, v. 28, p. 558-569.
27. Hübschle, T., M. J. McKinley, e B. J. Oldfield, 1998, Efferent connections of the lamina terminalis, the preoptic area and the insular cortex to submandibular and sublingual gland of the rat traced with pseudorabies virus: *Brain Res.*, v. 806, p. 219-231.
28. Imai, Y., K. Abe, S. Sasaki, N. Minami, M. Munakata, S. Yumita, T. Nobunaga, H. Sekino, e K. Yoshinaga, 1989, Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats: *Hypertension*, v. 13, no. 6, p. 549-557.
29. Inenaga, K., N. Wakasugi-Sato, K. Ono, M. Hirase, e E. Honda, 2008, Intraperitoneal injection of piloarpine activates neurons in the circumventricular organs and hypothalamus in rats: *Brain Res.*, v. 1200, p. 51-57.
30. Jansen, A. S. P., G. J. Ter Horst, T. C. Mettenleiter, e A. D. Loewy, 1992, CNS cell groups projecting to the submandibular parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study: *Brain Res.*, v. 572, p. 253-260.
31. Johnson, A. K., e A. D. Loewy, 1990, Circumventricular organs and their role in visceral functions, in AD Loewy and KM Spyer eds., *Central regulation of autonomic functions*: New York, Oxford University Press, p. 247-267.
32. Jones, S., e J. Yakel, 1997, Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus: *J.Physiol.*, v. 504, p. 603-610.
33. Kucharczyk, J., S. Y. Assaf, e G. J. Mogenson, 1976, Differential effects of brain lesions on thirst induced by the administration of angiotensin-II to the preoptic

- region, subfornical organ and anterior third ventricle: *Brain Res.*, v. 108, p. 327-337.
34. Kucharczyk, J., e G. J. Mogenson, 1975, Separate lateral hypothalamic pathways for extracellular and intracellular thirst: *AJP - Legacy*, v. 228, no. 1, p. 295-301.
  35. Loewy, A. D., 1991, Forebrain nuclei involved in autonomic control, in G Holstege ed., *Progr. Brain Res.*: Elsevier, p. 253-268.
  36. Lopes de Almeida, R., L. A. De Luca Jr, D. S. A. Colombari, J. V. Menani, e A. Renzi, 2006, Damage of the medial preoptic area impairs peripheral pilocarpine-induced salivary secretion: *Brain Res.*, v. 1085, p. 144-148.
  37. Luiz, A. C., W. A. Saad, L. A. A. Camargo, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 1991, Pressor, dipsogenic, natriuretic and kaliuretic responses to central carbacol in rats with lesion of the medial septal area: *Neurosci.Lett.*, v. 123, p. 195-198.
  38. McKinley, M. J., e A. K. Johnson, 2004, The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake: *News Physiol.Sci.*, v. 19, no. 1, p. 1-6.
  39. Meibach, R. C., e A. Siegel, 1977b, Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods: *Brain Res.*, v. 119, p. 1-20.
  40. Meibach, R. C., e A. Siegel, 1977a, Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods: *Brain Res.*, v. 119, no. 1, p. 20.
  41. Menani, J. V., W. A. Saad, L. A. A. Camargo, A. Renzi, L. A. De Luca Jr, e E. Colombari, 1990, The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbacol: *Neurosci.Lett.*, v. 113, p. 339-344.

42. Moreira, T. S., A. C. T. Takakura, E. Colombari, L. A. De Luca Jr, A. Renzi, J. V. Menani. Hemodynamic effects elicited by central injection of pilocarpine in rats. *Faseb J.* 16[4], A112 (part 1). 2002a.
43. Moreira, T. S., A. C. T. Takakura, E. Colombari, L. A. De Luca Jr, A. Renzi, e J. V. Menani, 2003a, Central moxonidine on salivary gland blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine: *Brain Res.*, v. 987, p. 155-163.
44. Moreira, T. S., A. C. T. Takakura, E. Colombari, A. Renzi, e J. V. Menani, 2003b, Central moxonidine on salivary gland blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine: *Brain Res.*, v. 987, p. 155-163.
45. Moreira, T. S., A. C. T. Takakura, L. A. De Luca Jr, A. Renzi, e J. V. Menani, 2001, Moxonidine reduces pilocarpine-induced salivation in rats: *Auton. Neurosc.: Basic and Clinical*, v. 91, p. 32-36.
46. Moreira, T. S., A. C. T. Takakura, L. A. De Luca Jr, A. Renzi, e J. V. Menani, 2002b, Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline: *Arch. Oral Biol.*, v. 47, p. 429-434.
47. Negro-Vilar, A., C. G. Gentil, e M. R. Covian, 1967, Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in rats: *Physiol. Behav.*, v. 2, p. 167-170.
48. Oldfield, B. J., A. Hou-Yo, e A. J. Silverman, 1985, A combined electron microscopic HRP and immunohistochemical study of the limbic projections to the rat hypothalamic nuclei containing vasopressin and oxytocin neurons: *J. Comp. Neurol.*, v. 231, p. 222-233.
49. Paxinos, G., e C. Watson, 1986, Paxinos, G., and C. Watson The rat brain in stereotaxic coordinates: San Diego, Academic Press, Inc.
50. Pertwee, R. G., e T. M. Ross, 1991, Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-



- tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice: *Neuropharmacology*, v. 30, p. 67-71.
51. Renzi, A., E. Colombari, T. R. Mattos Filho, J. E. N. Silveira, W. A. Saad, L. A. Camargo, L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 1993, Involvement fo the central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats: *J.Dental Res.*, v. 72, p. 1481-1484.
  52. Renzi, A., L. A. De Luca Jr, e J. V. Menani, 2002, Lesions of the lateral hypothalamus impair pilocarpine-induced salivation in rats: *Brain Res.Bull.*, v. 58, no. 5, p. 455-459.
  53. Rocha, M. J. A., C. R. Franci, e J. Antunes-Rodrigues, 1985, Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MSA) in the natriuretic and kaliuretic responses to intravenous hypertonic saline (NaCl): *Physiol.Behav.*, v. 34, p. 23-28.
  54. Rouse, S. T., e A. I. Levey, 1996, Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholinereceptors immunoreactivity in septohippocampal neuronsand other identified hippocampal afferents.: *J.Comp.Neurol.*, v. 375, p. 406-416.
  55. Saad, W. A., L. A. Camargo, C. R. Silva-Netto, C. G. Gentil, J. Antunes-Rodrigues, e M. R. Covian, 1976, Natriuresis, kaliuresis and diuresis in the rat following microinjections of carbachol into the septal area: *Pharmacol.Biochem.Behav.*, v. 3, p. 985-992.
  56. Sato, N., K. Ono, E. Honda, K. Haga, M. Yokota, e K. Inenaga, 2006, Pilocarpine-induced salivation and thirst in conscious rats: *J.Dental Res.*, v. 85, no. 1, p. 64-68.
  59. Simpson, J. B., e A. Routtenberg, 1973, Subfornical organ: site of drinking elicitations by angiotensin: *Science*, v. 181, p. 1172-1175.

57. Srividya, R., H. N. Mallick, V. M. Kumar. Changes in brain temperature and thermoregulation produced by destruction of medial septal neurons in rats. *Brain Res. Bull.* 66, 143-148. 2005a.
58. Srividya, R., H. N. Mallick, e V. M. Kumar, 2005b, The changes in thermal preference, sleep-wakefulness, body temperature and locomotor activity in the rats with medial septal lesion: *Behavioural Brain Res.*, v. 164, no. 2, p. 147-155.
59. Swanson, L. W., e W. M. Cowan, 1979, The connections of the septal area in the rat: *J. Comp. Neurol.*, v. 186, p. 621-656.
60. Takakura, A. C. T., T. S. Moreira, L. A. De Luca Jr, A. Renzi, e J. V. Menani, 2003a, Central  $\alpha 2$  adrenergic receptors and cholinergic-induced salivation in rats: *Brain Res. Bull.*, v. 59, no. 5, p. 383-386.
61. Takakura, A. C. T., T. S. Moreira, S. C. Laitano, L. A. De Luca, Jr., A. Renzi, e J. V. Menani, 2003b, Central Muscarinic Receptors Signal Pilocarpine-induced Salivation: *J. Dental Res.*, v. 82, no. 12, p. 993-997.
62. Takakura, A. C. T., T. S. Moreira, Jr. L. A. De Luca, A. Renzi, J. V. Menani, e E. Colombari, 2005, Effects of AV3V lesion on pilocarpine-induced pressor response and salivary gland vasodilation: *Brain Res.*, v. 1055, no. 1-2, p. 111-121.
63. Tanaka, J., H. Saito, e K. Seto, 1988, Involvement of septum in the regulation of paraventricular vasopressin neurons by the subfornical organ in the rat: *Neurosci. Lett.*, v. 92, p. 187-191.
64. Tavares, R. F., K. B. P. Fernandes, G. P. Pajolla, I. A. C. Nascimento, F. M. A. Corrêa. Neural connections between prosencephalic structures involved in vasopressin release. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25[3-4], 663-672. 2005.  
Ref Type: Abstract
65. Thinschmidt, J. S., C. J. Frazier, M. A. King, E. M. Meyer, e R. L. Papke, 2005, Medial septal/diagonal band cells express multiple functional nicotinic receptor

- subtypes that are correlated with firing frequency: *Neurosci.Lett.*, v. 389, no. 3, p. 163-168.
66. Whyte, D. G., e A. K. Johnson, 2002, Lesions of periventricular tissue surrounding the anteroventral third ventricle (AV3V) attenuate salivation and thermal tolerance in response to a heat stress: *Brain Res.*, v. 951, no. 1, p. 146-149.
  67. Whyte, D. G., e A. K. Johnson, 2005, Thermoregulatory role of periventricular tissue surrounding the anteroventral third ventricle (AV3V) during acute heat stress in the rat: *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*, v. 32, no. 5-6, p. 457-461.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)