



UNESP - Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Departamento de Fisiologia e Patologia



MILENA CASSOLATTI DE BARROS

**Efeitos da injeção de 3 amino 1,2,4 triazole (ATZ),
inibidor da catalase, na área septal medial na ingestão
de água e na excreção renal de água e eletrólitos
induzidos pela estimulação colinérgica também da área
septal medial**

Araraquara, 2011



UNESP - Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Departamento de Fisiologia e Patologia



**Efeitos da injeção de 3 amino 1,2,4 triazole (ATZ),
inibidor da catalase, na área septal medial na ingestão
de água e na excreção renal de água e eletrólitos
induzidos pela estimulação colinérgica também da área
septal medial**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

MILENA CASSOLATTI DE BARROS

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Colombari

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora S. A. Colombari

Araraquara, 2011

Aos meus pais, Fátima e João Lázaro, pois somente com o esforço, amor e apoio dedicados a mim, pude chegar aonde me encontro.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente e aos meus familiares por me apoiarem incondicionalmente.

Ao Prof. Dr. Eduardo Colombari e à Prof^a. Dr^a. Débora S. A. Colombari pela atenção e orientação na elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia pelo auxílio nas atividades durante todo o período de realização do trabalho. Em especial, à Mariana Del Rosso de Melo, pois graças a sua paciência, inteligência e amizade pude aprender e executar as tarefas com sucesso.

Aos amigos pelo convívio desses anos, pelas noites e dias de estudos, pelas ajudas e idéias sempre muito bem vindas.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| Resumo..... | 06 |
| Lista de Figuras..... | 07 |
| Lista de Abreviaturas e siglas..... | 08 |
| 1. Introdução..... | 09 |
| 2. Objetivos..... | 13 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 13 |
| 3.1 Animais..... | 13 |
| 3.2 Implante de cânulas..... | 13 |
| 3.3 Drogas utilizadas..... | 14 |
| 3.4 Medidas da ingestão de água..... | 15 |
| 3.5 Medidas da excreção de sódio e potássio..... | 15 |
| 3.6 Microinjeção de drogas..... | 15 |
| 3.7 Histologia..... | 15 |
| 3.8 Análise Estatística..... | 16 |
| 4. Protocolos Experimentais..... | 16 |
| 4.1 Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a resposta dipsogênica induzida por carbacol na ASM..... | 16 |
| 4.2 Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a excreção renal de Na ⁺ e K ⁺ e volume urinário em ratos tratados ou não com carbacol..... | 17 |
| 4.3 Efeito da administração de ATZ I.P associado à H ₂ O ₂ na ASM sobre a resposta dipsogênica induzida por carbacol na ASM..... | 18 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5. | Resultados..... | 19 |
| 5.1 | Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a resposta dipsogênica induzida por carbacol na ASM..... | 19 |
| 5.2 | Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a excreção renal de Na ⁺ e K ⁺ e volume urinário em ratos tratados ou não com Carbacol..... | 20 |
| 5.2.1 | Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a anti- diurese induzida por carbacol na ASM..... | 20 |
| 5.2.2 | Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a natriurese induzida por carbacol na ASM..... | 22 |
| 5.2.3 | Efeito da administração de ATZ na ASM sobre a caliurese induzida por carbacol na ASM..... | 23 |
| 5.3 | Efeito da administração de ATZ I.P associado à H ₂ O ₂ na ASM sobre a resposta dipsogênica induzida por carbacol na ASM..... | 24 |
| 6. | Histologia..... | 26 |
| 7. | Discussão..... | 27 |
| 8. | Conclusão..... | 30 |
| 9. | Referências Bibliográficas..... | 31 |

RESUMO

A área septal medial (ASM), situada no prosencéfalo, está envolvida na regulação cardiovascular e no controle do balanço hidroeletrolítico. Esta área é rica em receptores colinérgicos e a ativação dos mesmos induz ingestão de água, natriurese e anti-diurese. Existem evidências experimentais de que as espécies reativas de oxigênio possam participar do controle de respostas fisiológicas. Resultados recentes de nosso laboratório demonstraram que uma espécie reativa de oxigênio, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), injetada na ASM reduz a ingestão de água induzida por carbacol (agonista colinérgico) também injetado na ASM. No presente projeto propomos estudar os efeitos do aumento da produção endógena de H_2O_2 na ASM nos efeitos dipsogênico, natriurético e anti-diurético do carbacol injetado na ASM. O inibidor da catalase, 3 amino 1,2,4 triazole (ATZ) será injetado na ASM para aumentar os níveis endógenos de H_2O_2 .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com ATZ (10 nmol/ 0,5 µL) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/ 0,5 µL) ou salina.....20
- Figura 2.** Volume urinário cumulativo em ratos tratados com ATZ (10 nmol/0,5 µL) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µL) ou salina na ASM.....21
- Figura 3.** Excreção cumulativa de sódio em ratos tratados com ATZ (10 nmol/0,5 µL) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µL) ou salina na ASM.....22
- Figura 4.** Excreção cumulativa de potássio em ratos tratados com ATZ (10 nmol/0,5 µL) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µL) ou salina na ASM.....24
- Figura 5.** Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com ATZ (300 mg/kg/mL) ou salina I.P combinados com PBS ou H₂O₂ (1 µmol/0,5 µL) e carbacol (4 nmol/0,5 µL) ou salina na ASM.....26
- Figura 6.** Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção na ASM.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| ANG II | Angiotensina II |
| ANP | Peptídeo natriurético atrial |
| AP | Anteroposterior |
| APM | Área preótica medial |
| ASM | Área septal medial |
| ATZ | 3-amino 1,2,4 triazole |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HL | Hipotálamo lateral |
| I.P | Intraperitoneal |
| K⁺ | Potássio |
| L | Lateral |
| Na⁺ | Sódio |
| PVN | Núcleo paraventricular do hipotálamo |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SON | Núcleo supra-óptico |
| V | Vertical |

1. Introdução

A manutenção da composição e do volume do compartimento extracelular dentro de uma faixa de variação restrita é fundamental para que haja uma pressão sanguínea adequada para perfeita irrigação tecidual. O volume e a composição do compartimento extracelular são determinados, em grande parte, pelo balanço entre a ingestão e a excreção de água e eletrólitos, em especial o sódio que representa o principal fator osmótico deste compartimento. As variações da osmolaridade, ou seja, quantidade de partículas dissolvidas em um solvente, e do volume dos líquidos corporais constituem um dos sinais que permitem que a excreção urinária de sódio e água varie apropriadamente de acordo com as flutuações da sua ingestão. Devido a sua capacidade única de excretar seletivamente água e sódio, os rins constituem elementos vitais para a manutenção da volemia e da osmolaridade dos líquidos corporais.

O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental na regulação cardiovascular e no controle da ingestão de água e excreção de eletrólitos e água (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Dampney, 1994; Loewy, 1991; McKinley and Johnson, 2004). 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 de excreção de água e eletrólitos. Com relação às áreas mais anteriores do cérebro envolvidas com regulação cardiovascular e com o controle do equilíbrio hidroeletrolítico, podemos destacar a área septal medial (ASM), que é um subnúcleo da área septal ou septum (Callera et al., 1994; Colombari et al., 1994; Covian, 1966; Donevan and Ferguson, 1988; Haibara et al., 1994; Luiz et al., 1991; Negro-

Vilar et al., 1967;Saad et al., 1976). A ASM é constituída primariamente de células colinérgicas e gabaérgicas (Freund and Antal, 1988). Os neurônios colinérgicos bem como os não-colinérgicos presentes na ASM, são ricos em receptores colinérgicos (Rouse and Levey, 1996), sejam eles muscarínicos (Disko et al., 1999) ou nicotínicos (Thinschmidt et al., 2005).

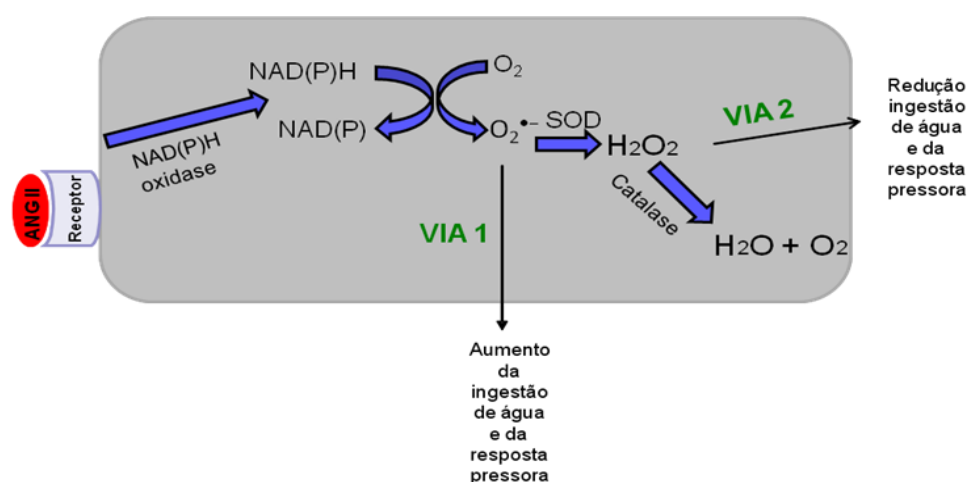
A estimulação colinérgica da ASM promove intensa resposta dipsogênica, ou seja, induz ingestão de água (Colombari et al., 1992b;Luiz et al., 1991). Ademais, têm sido demonstrado que a injeção de carbacol, agonista colinérgico muscarínico, em diversas áreas prosencefálicas, inclusive na ASM, aumenta a excreção renal de Na^+ e K^+ , além de produzir anti-diurese (Antunes-Rodrigues et al., 2004;Colombari et al., 1992b;Saad et al., 1976). Dados neuroanatômicos demonstraram que a ASM envia projeções para a área preótica medial (APM) e hipotálamo lateral (HL) (Meibach & Siegel, 1977;Swanson & Cowan, 1979), que são regiões hipotalâmicas muito importantes para a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (Kucharczyk & Mogenson, 1975;Kucharczyk et al., 1976;Haibara et al., 1994). A ASM também envia projeções ao núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN) e supra-óptico (SON), que contém os neurônios que secretam vasopressina e ocitocina (Oldfield et al., 1985). Portanto, um possível mecanismo responsável pela natriurese e anti-diurese decorrente da estimulação colinérgica central envolveria a liberação de peptídeo natriurético atrial (ANP), estimulado pela ocitocina, e vasopressina, substâncias natriurética e anti-diurética, respectivamente (Antunes-Rodrigues et al., 2004;McCann et al., 2003). Desta forma, a ASM parece ser uma área do SNC que desempenha um papel

fundamental na regulação da resposta dipsogênica e sobre os efeitos renais induzidos pela estimulação colinérgica central.

As espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas por suas propriedades microbicidas, compreendem espécies químicas endogenamente produzidas pelo organismo como os radicais livres ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rhee et al., 2003; Weinberg, 1990). A alta capacidade oxidante destas espécies atribui-lhes propriedades destrutivas para as células, sendo frequentemente associadas à morte celular e ao processo de apoptose (Irani, 2000; Jiang et al., 2003). Apesar de seu potencial citotóxico quando em altas concentrações, várias linhas de pesquisa têm demonstrado experimentalmente que tais espécies, quando em baixas concentrações, podem participar na sinalização intra e intercelular, agindo conjuntamente com mediadores químicos clássicos como a angiotensina II (ANG II), noradrenalina e glutamato [revisão em (Zimmerman and Davisson, 2004)].

No SNC, foi descrito que as ações dipsogênicas e cardiovasculares da ANG II, em camundongos, são dependentes do aumento da produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por neurônios dos órgãos circunventriculares (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). No mecanismo proposto, a ativação de receptores angiotensinérgicos, do subtipo AT_1 , pela ANG II, desencadela uma cascata bioquímica intracelular que leva à ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (Zimmerman and Davisson, 2004; Zimmerman et al., 2002). Uma vez ativada esta enzima catalisa a transferência de dois elétrons da molécula de $NADPH_2^+$ para duas moléculas de oxigênio formando, dessa maneira, dois radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A ativação dos radicais superóxido ativaria mecanismos intracelulares, e desta forma,

haveria a ativação das vias neurais de sede e de aumento de pressão arterial pela ANG II (VIA 1 do esquema abaixo). Entretanto, dados recentes do nosso laboratório demonstraram que resposta dipsogênica e pressora induzida pela injeção de ANG II no ventrículo lateral foi fortemente reduzida pelo tratamento prévio com H_2O_2 (Giglioti et al., 2006; Lauer et al., 2010), sugerindo que o H_2O_2 desta via poderia na verdade interferir com mecanismos celulares que inibiriam as ações da ANG II (VIA 2 do esquema abaixo).



Embora o resultado da injeção de H_2O_2 exógeno, na ASM, seja um indicativo que esta ERO esteja envolvida na regulação da resposta dipsogênica induzida pelo carbacol na ASM, não se sabia os efeitos do aumento dos níveis endógenos locais de H_2O_2 na ASM sobre as respostas dipsogênicas e renais (natriurese e anti-diurese) induzidas pela estimulação colinérgica, com carbacol, na ASM.

Através da atividade da catalase, o H_2O_2 é transformado em O_2 e H_2O . O 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) é um composto orgânico heterocíclico que

consiste de um 1,2,4-triazol substituído com um grupo amino, ele é um inibidor da atividade da catalase, aumentando, assim, o H₂O₂ endógeno (Cardoso et al., 2009; Lauar et al., 2010; Pastor et al., 2004).

2. Objetivos

Estudar os efeitos do aumento de H₂O₂ endógeno, através da injeção do ATZ – 3 amino 1,2,4 triazole (inibidor da catalase) na ASM, sobre a ingestão de água e sobre a excreção renal induzidas pela injeção de carbacol também na ASM, área rica em receptores colinérgicos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, pesando entre 280 - 320 g fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, campus de Araraquara. Os animais foram mantidos com água de torneira e ração granulada *ad libitum* em gaiolas individuais. Os procedimentos apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - processo 08/2010) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

3.2. Implante de cânulas na área septal medial (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 perióstio 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 0,6 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 baseada nos parâmetros estereotáxicos do Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986), a saber: AP = 0,8 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, intramuscularmente) e uma dose de antiinflamatório (cetoprofeno 1%, 0,1 ml/rato, subcutaneamente) foram injetadas ao final da cirurgia.

3.3. Drogas utilizadas

- Carbacol (4 nmol/0,5 µL) - agonista colinérgico
- 3 amino 1,2,4 triazole (ATZ) - inibidor da catalase - doses:
10 nmol/0,5 µL e 300 mg/kg/mL
- H₂O₂ (1 µmol/0,5 µL)
- Salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL)
- PBS (salina tamponada – veículo)

Carbacol e ATZ foram dissolvidos em salina isotônica (NaCl 0,15 M).

3.4. Medidas de ingestão de água

A quantidade ingerida de água nos protocolos experimentais foi quantificada através de buretas de vidro graduadas em 0,1 ml e adaptadas com um bico de metal. Os animais não tiveram acesso à ração durante os experimentos.

3.5. Medidas da excreção de sódio e potássio

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada por gravidade em tubos graduados em 0,1 mL. As amostras de urina foram analisadas em um analisador de Na^+/K^+ . A excreção total de Na^+ e K^+ foi calculada como concentração de Na^+ e K^+ multiplicado pelo volume urinário.

3.6. Microinjeção de drogas na ASM

As injeções na ASM foram realizadas com seringa de microlitro Hamilton (10 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 em todos os protocolos experimentais.

3.7. Histologia

Ao final dos experimentos, sob anestesia profunda (tiopental sódico, 80 mg/kg, ip), o coração dos animais foi exposto cirurgicamente, realizando-se uma perfusão com solução de formalina a 10%. A seguir, os cérebros foram retirados e mergulhados no mesmo agente fixador por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R) os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 50 μm , corados pela

técnica de Nissl para posterior análise, em microscópio óptico, do sítio de injeção.

3.8. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados por análise de variância de duas vias para medidas repetidas (ANOVA), associadas ao Student-Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4. Protocolos experimentais

4.1. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5 μ L) na área septal medial sobre a resposta dipsogênica induzida pela injeção de carbacol também na área septal medial.

Foram injetados na área septal medial ATZ (10 nmol/0,5 μ L), carbacol (4 nmol/0,5 μ L) ou salina (NaCl 0,15 M, 0,5 μ L)

Os animais foram submetidos a 4 experimentos:

- salina ASM + salina ASM
- salina ASM + carbacol ASM
- ATZ ASM + salina ASM;
- ATZ ASM + carbacol ASM.

Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade dos animais recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro dentre estes tratamentos. A seqüência dos tratamentos

nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos. ATZ ou salina foi injetado 15 minutos antes de carbacol ou salina. Imediatamente após a injeção de carbacol 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.

4.2. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5µL) na ASM sobre a excreção renal de Na⁺ e K⁺ e volume urinário em ratos tratados ou não com carbacol injetado na ASM.

Para a análise da excreção renal, após 14 h de privação de alimento com água disponível, os animais foram submetidos à sobrecarga hídrica (aproximadamente 10 mL) administrada intragastricamente. Após 45 minutos ATZ (10 nmol/0,5 µL) ou salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) foi injetada na ASM. Após uma hora da primeira sobrecarga hídrica, foi administrada outra sobrecarga hídrica (aproximadamente 10 mL). Este procedimento diminui a osmolaridade plasmática e aumenta a diurese. Simultaneamente com a segunda gavagem, foi injetado carbacol (4 nmol/0,5 µL) ou salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) na ASM. A urina excretada após as injeções centrais foi coletada a cada 30 min, por um período de 120 min. Durante todo o procedimento experimental os animais não tiveram acesso à ração.

Um grupo de animais foi submetido a 4 experimentos com um intervalo de pelo menos 3 dias entre dois experimentos. Além da sobrecarga intragástrica

de água os animais foram submetidos aos mesmos tratamentos do protocolo anterior.

Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade dos animais recebeu um dos tratamentos descritos no protocolo anterior e a outra metade recebeu outro dentre aqueles tratamentos. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.

4.3. Efeito da administração de ATZ (300 mg/kg/mL) intraperitonealmente, associado à H₂O₂ (1 µmol/0,5 µL) na área septal medial sobre a resposta dipsogênica induzida pela injeção de carbacol também na área septal medial.

Este protocolo foi realizado a fim de avaliar se a injeção de ATZ periférico associada a um aumento de peróxido de hidrogênio na ASM seria capaz de reduzir a ação dipsogênica induzida por carbacol.

Foram injetados, intraperitonealmente, salina (NaCl 0,15 M, 300 mg/kg/mL) ou ATZ (300 mg/kg/mL). E na área septal medial H₂O₂ (1 µmol/0,5 µL), carbacol (4 nmol/0,5 µL), salina (NaCl 0,15 M, 0,5 µL) ou PBS (salina tamponada – veículo).

Os animais foram submetidos a 4 experimentos:

- salina I.P + PBS ASM + salina ASM
- salina I.P + PBS ASM + carbacol ASM
- ATZ I.P + PBS ASM + carbacol ASM;
- ATZ I.P + H₂O₂ ASM + carbacol ASM.

Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade dos animais recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro dentre estes tratamentos. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos. ATZ ou salina foram injetados 9 minutos antes de PBS ou H₂O₂, e 10 minutos antes de salina ou carbacol. Imediatamente após a injeção de carbacol 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.

5. Resultados

5.1. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5 µL) na área septal medial sobre a resposta dipsogênica induzida pela injeção de carbacol também na área septal medial.

Na figura 1 verifica-se que há resposta dipsogênica induzida pelo carbacol, através da estimulação colinérgica na ASM, a qual não foi modificada pela injeção prévia de ATZ, também na ASM (ATZ + carbacol: $10,7 \pm 4,5$ vs., salina + carbacol: $9,5 \pm 5,3$ mL/1 h). Houve diferença significativa na ingestão de água dos ratos tratados com ATZ + carbacol ou salina + carbacol comparados àqueles tratados com salina + salina (grupo controle).

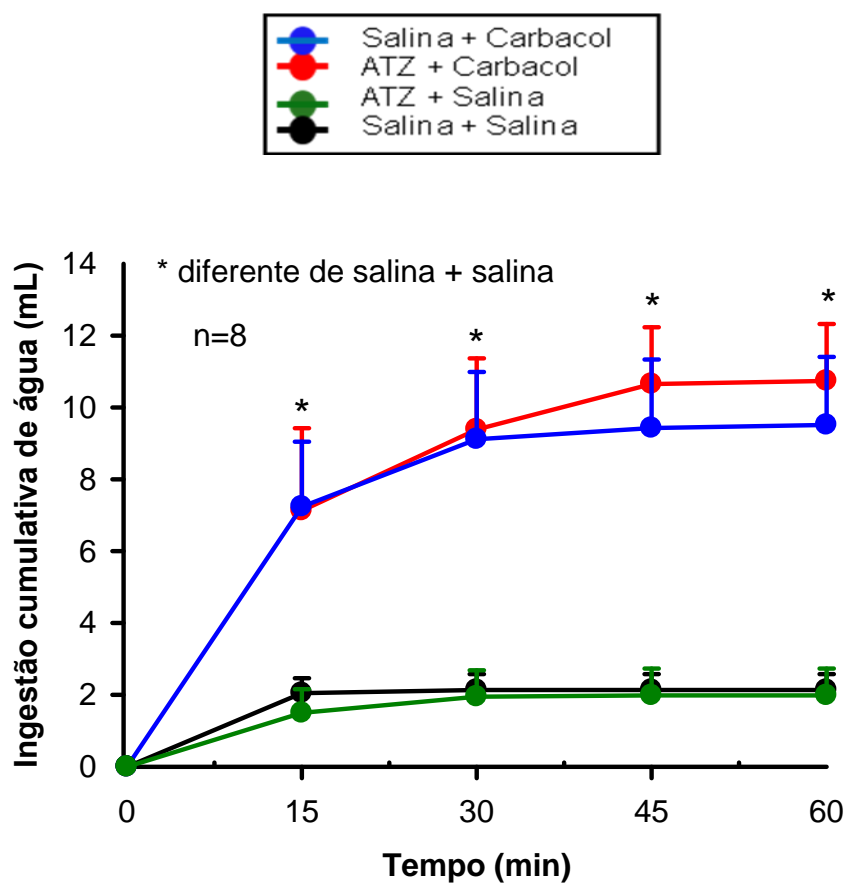


Figura 1

Figura 1: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com ATZ (10 nmol/ 0,5 μ L) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/ 0,5 μ L) ou salina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. *diferente de salina + salina.

n = número de animais.

5.2. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5 μ L) na ASM sobre a excreção renal de Na^+ e K^+ e volume urinário em ratos tratados ou não com carbacol injetado na ASM.

5.2.1. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5 μ L) na ASM sobre a anti-diurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

Na Figura 2 verifica-se que a injeção de carbacol na ASM produz anti-diurese. O tratamento prévio com ATZ reverteu a anti-diurese induzida pelo carbacol na ASM (ATZ + carbacol: $10,5 \pm 2,1$ vs., salina + carbacol: $7,3 \pm 1,6$ mL/120 min, $p < 0,05$). Além disso, houve diferença significativa no volume urinário excretado dos ratos tratados com ATZ + carbacol ou salina + carbacol comparados àqueles tratados com salina + salina (grupo controle).

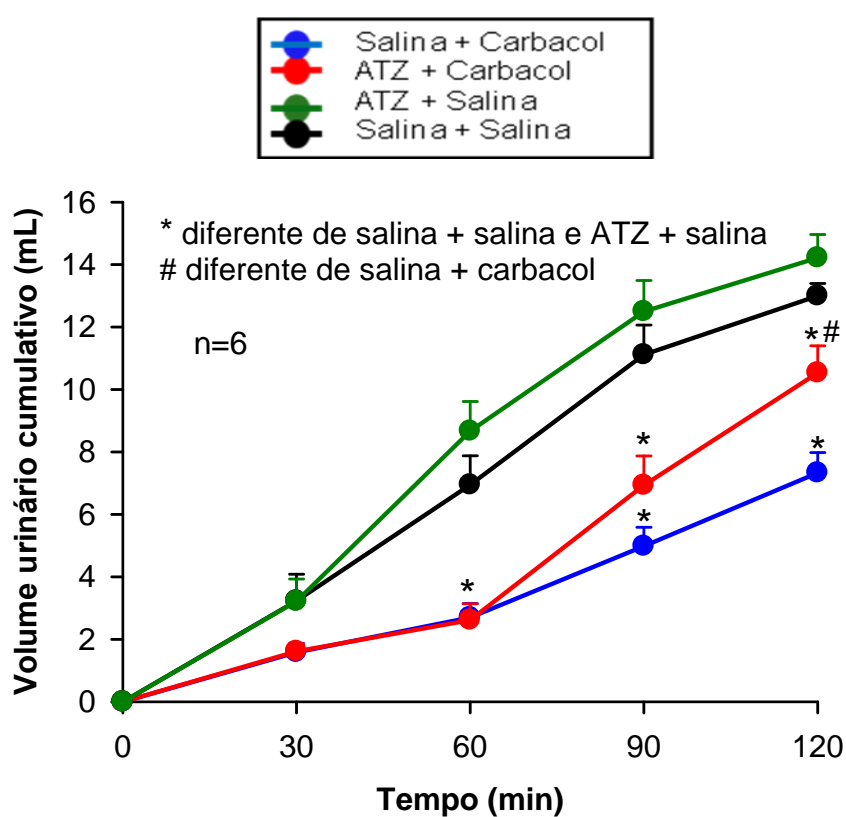


Figura 2

Figura 2: Volume urinário cumulativo em ratos tratados com ATZ (10 nmol/0,5 μ L) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/0,5 μ L) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. *diferente de salina+ salina e ATZ+ salina; # diferente de salina + carbacol. n = número de animais.

5.2.2. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5 μ L) na ASM sobre a natriurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

Na Figura 3 verifica-se que a injeção de carbacol na ASM produz natriurese. A natriurese induzida pelo carbacol não foi revertida pela injeção prévia de ATZ, também na ASM (salina + carbacol: $419,4 \pm 183,8$ vs. ATZ + carbacol: $525,5 \pm 187 \mu\text{Eq}/120 \text{ min}$). Houve diferença significativa na excreção cumulativa de sódio dos ratos tratados com ATZ + carbacol ou salina + carbacol comparados àqueles tratados com salina + salina (grupo controle).

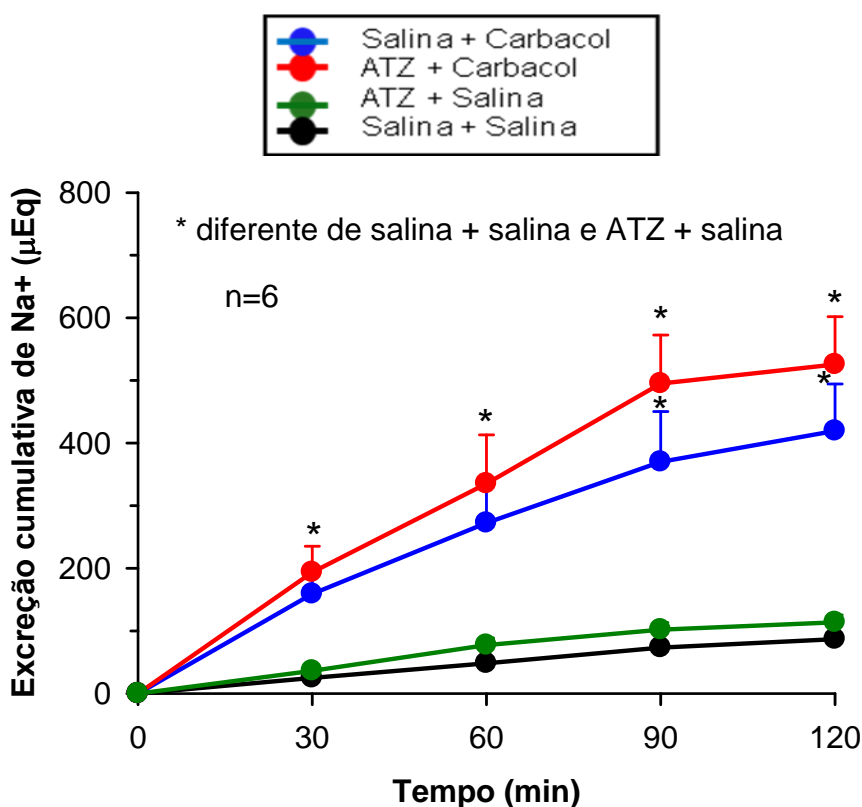


Figura 3

Figura 3: Excreção cumulativa de sódio em ratos tratados com ATZ (10 nmol/0,5 μ L) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/0,5 μ L) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. *diferente de salina+ salina e ATZ+ salina. n = número de animais.

5.2.3. Efeito da administração de ATZ (10 nmol/ 0,5 µL) na ASM sobre a caliurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

Na figura 4 observa-se que a injeção de carbacol na ASM produz caliurese. A caliurese induzida pelo carbacol não foi revertida pela injeção prévia de ATZ, também na ASM (salina + carbacol: $134 \pm 30,3$ vs. ATZ + carbacol: $151,9 \pm 34,3$ µEq/120 min). Houve diferença significativa na excreção cumulativa de potássio dos ratos tratados com ATZ + carbacol ou salina + carbacol comparados àqueles tratados com salina + salina (grupo controle).

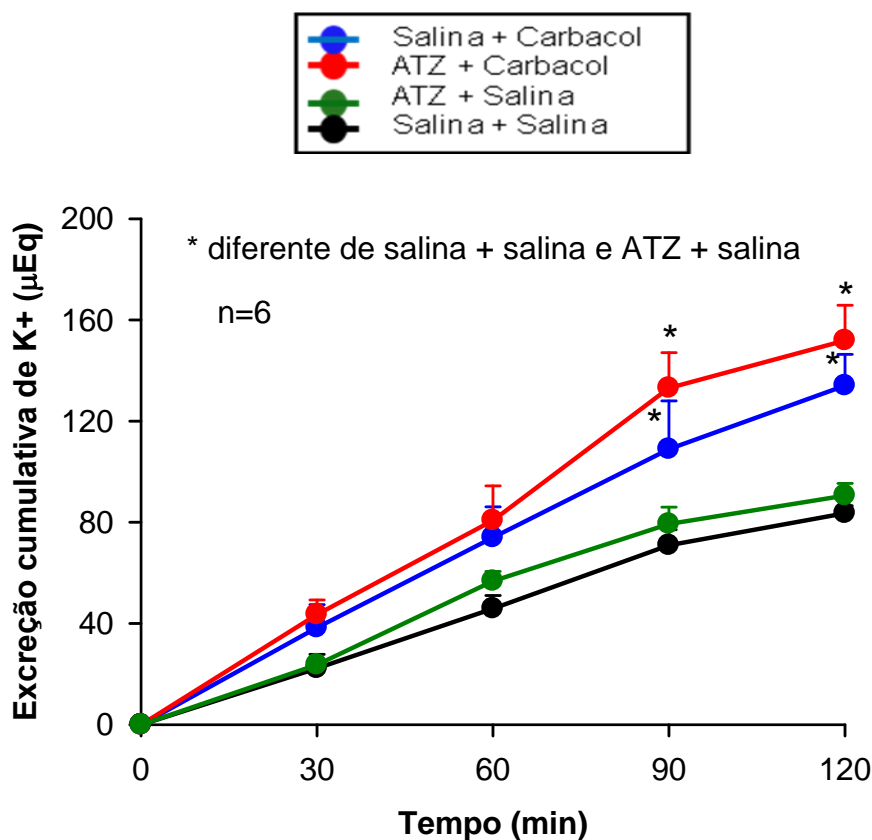


Figura 4

Figura 4: Excreção cumulativa de potássio em ratos tratados com ATZ (10 nmol/0,5 µL) ou salina combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µL) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. *diferente de salina+ salina e ATZ+ salina. n = número de animais.

5.3. Efeito da administração de ATZ (300 mg/kg/mL) intraperitonealmente, associado à H_2O_2 (1 µmol/0,5 µL) na área septal medial sobre a resposta dipsogênica induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

Na figura 5 verifica-se que há resposta dipsogênica induzida pelo carbacol, através da estimulação colinérgica na ASM. Esta resposta foi reduzida pela injeção prévia de ATZ (I.P) associada à H_2O_2 na ASM (ATZ +

H₂O₂ + carbacol: $8,9 \pm 4,5$ vs., salina + PBS + carbacol: $14,3 \pm 3,5$ mL/1 h). A injeção apenas de ATZ periférico não modificou a resposta dipsogênica induzida pelo carbacol (ATZ + PBS + carbacol: $17,8 \pm 4,2$ vs., salina + PBS + carbacol: $14,3 \pm 3,5$ mL/1 h). Houve diferença significativa na ingestão de água dos ratos tratados com ATZ + H₂O₂ + carbacol, salina + PBS + carbacol ou ATZ + PBS + carbacol comparados àqueles tratados com salina+ PBS + salina (grupo controle).

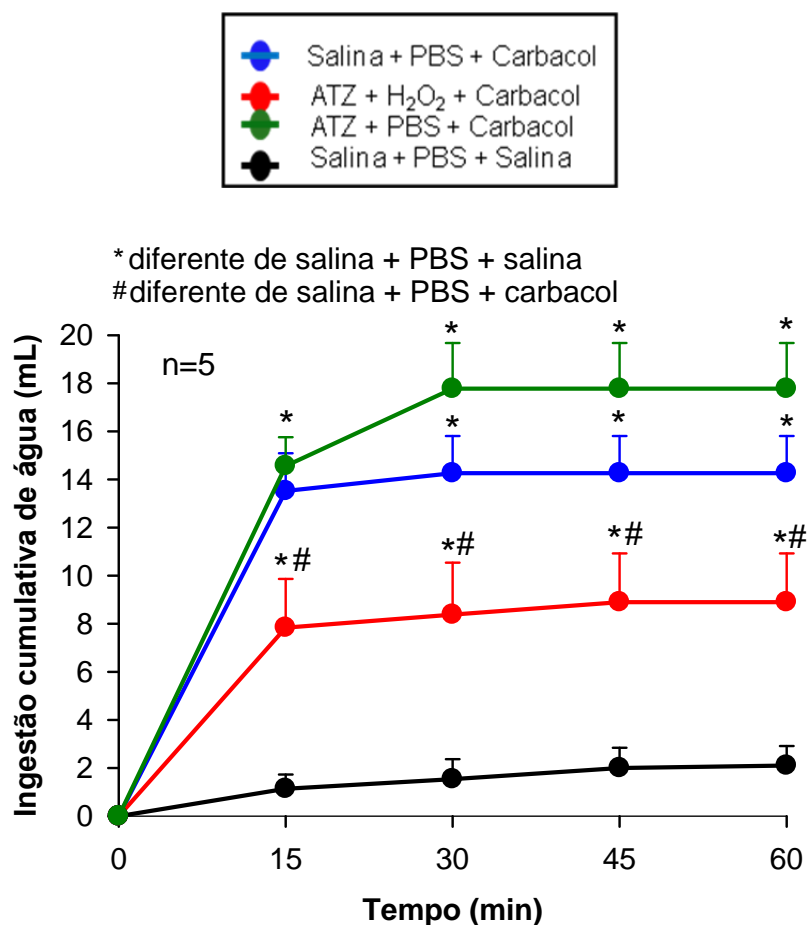


Figura 5

Figura 5: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com ATZ (300 mg/kg/mL) ou salina I.P combinados com PBS ou H₂O₂ (1 μmol/0,5 μL) e carbacol (4 nmol/0,5 μL) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; P < 0,05. *diferente de salina + PBS + salina; # diferente de salina + PBS + carbacol. n = número de animais.

6. Histologia

A Figura 6 é uma fotomicrografia mostrando o local típico das injeções na ASM em um rato que representa os ratos utilizados em nosso estudo.

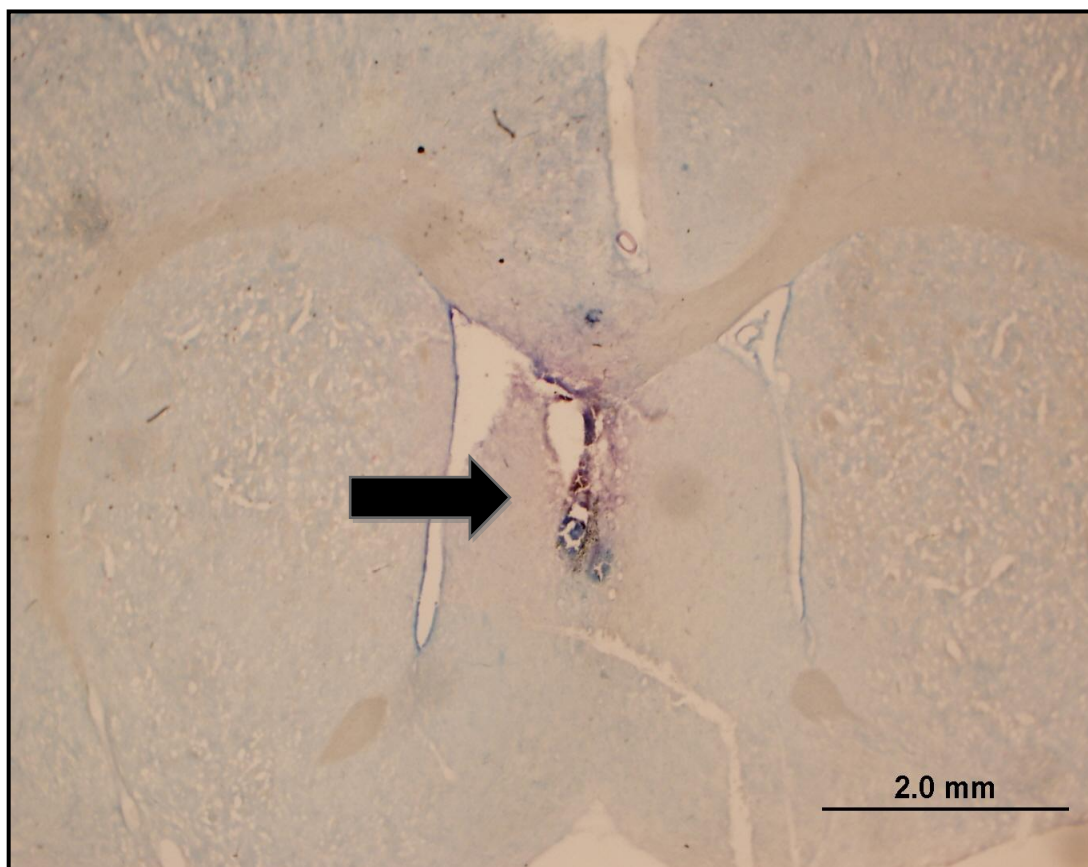


Figura 6: Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção na ASM (seta).

7. Discussão

A estimulação colinérgica central, incluindo da ASM, induz resposta dipsogênica, natriurese, caliurese e anti-diurese (Colombari et al., 1992a; Colombari et al., 1992b; Menani et al., 1990; Saad et al., 1976). Os resultados mostram que apenas a resposta anti-diurética induzida pelo carbacol na ASM foi reduzida pelo tratamento prévio com ATZ na ASM.

Recentemente, estudos do nosso laboratório ainda não publicados demonstraram que a resposta dipsogênica e natriurética do carbacol injetado no ventrículo lateral foram reduzidas pela administração direta de H_2O_2

(Pinguero et al., 2008). Nos dados obtidos no presente projeto as respostas dipsogênica, natriurética e caliurética do carbacol não foram atenuadas pelo ATZ. Provavelmente a concentração endógena de peróxido de hidrogênio que é produzido pelo ATZ através do bloqueio da catalase não seja suficiente para que os efeitos dipsogênico, natriurético e caliurético do carbacol sejam atenuados.

É possível que na dose utilizada na ASM, o ATZ não consiga gerar peróxido de hidrogênio suficiente para reduzir as respostas dipsogênica, natriurética e caliurética. De fato, quando combinamos uma dose pequena de H_2O_2 (1 μ mol, vs. doses de 5 μ mol utilizadas por Lauar et al, 2010) com uma dose de ATZ administrado periféricamente, observamos o efeito aditivo de peróxido central e inibição da catalase, e desta forma, uma redução na ingestão de água foi observada.

Os resultados obtidos sobre a anti-diurese produzida pelo carbacol na ASM vão ao encontro de dados recentes, ainda não publicados, do nosso laboratório que demonstram que o tratamento prévio com H_2O_2 na ASM reverte a anti-diurese induzida pelo carbacol, também na ASM. Como citado na introdução, a ASM envia projeções para PVN e SON, (Oldfield et al., 1985). Esses núcleos são secretores dos hormônios vasopressina e ocitocina (Swanson & Sawchenko, 1980; Swanson & Sawchenko, 1983), os quais têm função antidiurética/pressora (Swanson & Sawchenko, 1980) e natriurética (Huang et al., 1995), respectivamente. O PVN também é um importante núcleo que está envolvido com a ativação do sistema nervoso simpático e na regulação da ingestão de água (Urzedo-Rodrigues et al., 2011; Toney et al., 2003; Gutman et al., 1988; Colombari et al., 2010). Parte da resposta pressora e

a anti-diurese induzida pela estimulação colinérgica central, incluindo a ASM, é atribuída a secreção de vasopressina (Tanaka et al., 1988). Por outro lado a natriurese induzida pela estimulação colinérgica central é atribuída ao efeito direto da ocitocina produzindo natriurese, bem como pela ação da ocitocina em estimular a secreção de peptídeo natriurético atrial (ANP), produzido pelos miócitos cardíacos (Colombari et al., 1994; Antunes-Rodrigues et al., 2004). Portanto, é conhecido que ocorre aumento da secreção de vasopressina pela ativação colinérgica central, resultando em anti-diurese (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Hoffman et al., 1977). Sendo assim, nossa hipótese é de que o aumento dos níveis de H_2O_2 na ASM iniba ou reduza a secreção de vasopressina induzida pelo carbacol, bloqueando a anti-diurese. Uma vez que não foi necessário ter o efeito aditivo de injeção central de peróxido e inibição da catalase, é possível que o mecanismo colinérgico para a resposta anti-diurética do carbacol na ASM seja mais sensível às EROs do que a resposta dipsogênica.

Com relação ao carbacol ou a estímulos colinérgicos, estudos realizados em glândulas parótidas de ratos demonstraram que o H_2O_2 pode atenuar a secreção de amilase induzida pelo carbacol por interferir na $[Ca^{2+}]_i$ (Mata et al., 2008), sugerindo uma ação inibitória do H_2O_2 na resposta do carbacol. Outros estudos feitos em átrios isolados de ratos sugerem que o H_2O_2 pode alterar o acoplamento do carbacol com o receptor muscarínico, e desta forma, alterar a resposta ao carbacol (Peters et al., 2001). Por outro lado, tem sido também demonstrado em aortas isoladas de ratos e camundongos que as ações vasodilatadoras da acetilcolina são dependentes de formação endotelial de H_2O_2 (Capettini et al., 2008; Rabelo et al., 2003). Podemos verificar também

que, para o sistema colinérgico, há estudos mostrando que o H_2O_2 pode modular positivamente ou negativamente as respostas induzidas pelo carbacol ou acetilcolina. Esses dados sugerem que o H_2O_2 modula negativamente as ações do carbacol e da acetilcolina, seja por interferir diretamente no receptor muscarínico ou por reduzir os efeitos intracelulares decorrentes da ativação de receptores muscarínicos. Outro mecanismo proposto é que o H_2O_2 possa reduzir a excitabilidade neuronal como consequência da inibição do glutamato ou pelo aumento da liberação de GABA ou pela ativação de canais de K_{ATP} , ou seja, o H_2O_2 atuaria de forma indireta nas respostas colinérgicas (Avshalumov et al., 2005; Bao et al., 2005; Zoccarato et al., 1990; Zoccarato et al., 1995).

8. Conclusão

Concluindo, os resultados mostram que as injeções de ATZ na ASM revertem a anti-diurese induzida pela injeção de carbacol na ASM, sugerindo que o H_2O_2 endógeno inibe os mecanismos anti-diuréticos ativados pela estimulação colinérgica da ASM. Os dados apresentados também indicam um possível papel das EROS, geradas endogenamente na ASM, na regulação da ingestão de água induzida por estímulo colinérgico da ASM.

9. Referências bibliográficas

ANTUNES-RODRIGUES, J., CASTRO, M., ELIAS, L. L. K., VALENÇA, M. M., MCCANN, S. M. **Neuroendocrine control of body fluid metabolism.** *Physiological Reviews*, v. 84, p. 169-208, 2004.

AVSHALUMOV, M. V., CHEN, B. T., KOÓS, T., TEPPER, J. M., RICE, M. E. **Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels.** *Journal of Neuroscience*, v. 25, no. 17, p. 4222-4231, 2005.

BAO, L., Avshalumov, M. V., RICE, M. E. **Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion.** *Journal of Neuroscience*, v. 25, no. 43, p. 10029-10040, 2005

CALLERA, J. C., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L.A, MENANI, J. V. **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, 1994.

CAPETTINI, L. S. A., CORTES, S.F., GOMES, M. A., SILVA, G. A. B., PESQUERO, J. L., LOPES, M. J., TEIXEIRA, M. M., LEMOS V. S. **Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-**

dependent relaxing factor. AJP - Heart and Circulatory Physiology, v. 295, no. 6, p. H2503-H2511, 2008.

CARDOSO, L. M., COLOMBARI, D. S., MENANI, J. V., TONEY, G. M., CHIANCA JR, D. A., COLOMBARI, E. **Cardiovascular responses to hydrogen peroxide into the nucleus tractus solitarius.** Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol, v. 297, no. 2, p. R462-R469, 2009.

COLOMBARI, D. S. A., HAIBARA, A.S., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. **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, 1994.

COLOMBARI, D. S. A., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A., COLOMBARI, E., MENANI, J. V. Menani. **AV3V lesion impair responses induced by cholinergic activation of SFO in rats.** Am.J.Physiol., v. 263, p. R1277-R1283, 1992a.

COLOMBARI, E., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. **AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats.** Brain Res., v. 572, p. 172-175, 1992b.

COLOMBARI E, COLOMBARI DS, LI H, SHI P, DONG Y, JIANG N, RAIZADA MK, SUMNERS C, MURPHY D, PATON JF. **Macrophage Migration Inhibitory**

Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt. Hypertension, v. 56, p. 956-963, 2010.

COVIAN, M. R. **Fisiologia del area septal.** Acta Physiologica Latinoamericana, v. 16, p.119-152, 1966.

DAMPNEY, R. A. L. **Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system.** Physiological Reviews, v. 74, no. 2, p. 323-364, 1994.

DISKO, U., GAZYAKAN, E., HEIMRICH, B., JACKISCH, R. **Postnatal development of muscarinic autoreceptors in the rat brain: lateral and medial septal nuclei and the diagonal band of Broca.** Brain Res.Dev.Brain Res., v. 114, no. 1, p. 1-8, 1999.

DONEVAN, S. D., FERGUSON, A. V. **Subfornical organ and cardiovascular influences on identified septal neurons.** AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 254, no. 3, p. R544-R551, 1988.

FREUND, T., ANTAL M. **GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus.** Nature, v. 504, p. 603-610, 1988.

GIGLIOTI, C., CARDOSO, L. M., MENANI, J. V., COLOMBARI, E., COLOMBARI, D. S. A. **Central injections of hydrogen peroxide inhibit angiotensin II-induced water intake.** Soc.Nerosci.Abstract . 2006.

Ref Type: Abstract

GUTMAN MB, JONES DL, CIRIELLO J. **Effect of paraventricular nucleus lesions on drinking and pressor responses to ANG II.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v. 255, R882-R887, 1988.

HAIBARA, A. S., SAAD, W. A., MENANI, J. V., CAMARGO, L. A., RENZI, A. **Role of lateral hypothalamus on fluid, electrolyte, and cardiovascular responses to activation of the MSA.** AJP - Legacy, v. 266, no. 2 Pt 2, p. R496-R502, 1994.

HOFFMAN, W. E., PHILLIPS, M. I., SCHMID, P. G., FALCON J., WEET, J. F. **Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation.** Neuropharmacology, v. 16, p. 463-472, 1977.

HUANG W, LEE SL, SJOQUIST M. **Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl.** Am J Physiol, v. 268, R634-R640, 1995.

IRANI, K. **Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and**

endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. Circulation Research, v. 87, p. 179-183, 2000.

JIANG, B., LIU, J. H., BAO, Y. M., AN, L. **Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin.** Cell Biol.Int., v. 27, p. 1026-1031, 2003.

KUCHARCZYK J , MOGENSEN GJ. **Separate lateral hypothalamic pathways for extracellular and intracellular thirst.** Am J Physiol, v. 228, p. 295-301, 1975.

KUCHARCZYK J, ASSAF SY, MOGENSEN GJ. **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, 1976.

LAUAR, M. R., COLOMBARI, D. S., DE PAULA, P. M., COLOMBARI, E., CARDOSO, L. M., DE LUCA L. A. J., MENANI, J. V. **Inhibition of central angiotensin II-induced pressor responses by hydrogen peroxide.** Neuroscience, v. 171, p. 524-530, 2010.

LOEWY, A. D. **Forebrain nuclei involved in autonomic control,** in G Holstege ed., **Progr. Brain Res.** Elsevier, p. 253-268, 1991.

LUIZ, A. C., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. **Pressor, dipsogenic, natriuretic and kaliuretic responses to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area.** *Neurosci.Lett.*, v. 123, p. 195-198, 1991.

MATA, A., MARQUES, D., MARTINEZ-BURGOS, M. A., SILVEIRA, J., MARQUES, J., MESQUITA, M. F., PARIENTE, J. A., SALIDO, G. M., SINGH, J. **Effect of hydrogen peroxide on secretory response, calcium mobilisation and caspase-3 activity in the isolated rat parotid gland.** *Mol.Cell Biochem.*, v. 319, no. 1-2, p. 23-31, 2008.

MCCANN, S. M., GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J. **Neuroendocrine control of body fluid homeostasis.** *Brazilian J.Med.Biol.Res.*, v. 36, p. 165-181, 2003.

MCKINLEY, M. J., JOHNSON, A. K. **The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake.** *News Physiol.Sci.*, v. 19, no. 1, p. 1-6, 2004.

MEIBACH RC, SIEGEL A. **Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods.** *Brain Res.*, v. 119, p. 20, 1977.

MENANI, J. V., SAAD, W. A., CAMARGO, L. A. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A., COLOMBARI, E. **The anteroventral third ventricle (AV3V) region is**

essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosci.Lett.*, v. 113, p. 339-344, 1990.

NEGRO-VILAR, A., GENTIL, C. G., COVIAN, M. R. **Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in rats.** *Physiol.Behav.*, v. 2, p. 167-170, 1967.

OLDFIELD BJ, HOU-YO A, SILVERMAN AJ. **A combined electron microscopic HRP and immunohistochemical study of the limbic projections to the rat hypothalamic nuclei containing vasopressing and oxytocin neurons.** *J Comp Neurol.*, v. 231, p. 222-233, 1985.

PASTOR, R., SANCHIS-SEGURA, C., ARAGON, C. M. G. **Brain catalase activity inhibition as well as opioid receptor antagonism increases ethanol-induced HPA axis activation: Alcoholism.** *Clinical and Experimental Research*, v. 28, no. 12, p. 1898-1906, 2004.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates San Diego, Academic Press, Inc, 1986.**

PETERS, S. L., SAND, C., BATINIK, H. D., PFAFFENDORF, M., VAN ZWIETEN, P. A. **Reactive oxygen species potentiate the negative inotropic effect of cardiac M2-muscarinic receptor stimulation.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, v. 364, no. 2, p. 166-171, 2001.

PINGUEIRO, E. **Efeitos da injeção central de peróxido de hidrogênio sobre a sede e apetite ao sódio e sobre a excreção urinária.** Resumos anais da FESBE, 2008.

RABELO, L. A., CORTES, S. F., VAREZ-LEITE, J. I., LEMOS, V. S. **Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂.** Br.J Pharmacol., v. 138, no. 7, p. 1215-1220, 2003.

RHEE, S. G., CHANG, T. S., BAE, Y. S., LEE, S. R., KANG, S. W. **Cellular regulation by hydrogen peroxide.** J.Am.Soc.Nephrol., v. 14, p. S211-S215, 2003.

ROUSE, S. T., LEVEY, A. I. **Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents.** The Journal of Comparative Neurology, v. 375, no. 3, p. 406-416, 1996.

SAAD, W. A., CAMARGO, L. A., SILVA-NETTO, C. R., GENTIL, C. G., ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M. R. **Natriuresis, kaliuresis and diuresis in the rat following microinjections of carbachol into the septal area.** Pharmacol.Biochem.Behav., v. 3, p. 985-992, 1976.

SWANSON LW, COWAN WM. **The connections of the septal area in the rat.** J Comp Neurol., vol. 186, p. 621-656, 1979.

SWANSON LW, SAWCHENKO PE. **Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms.** Neuroendocrinology, vol. 31, p. 410-417, 1980.

SWANSON LW, SAWCHENKO PE. **Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei.** Annu Rev Neurosci, vol. 6, p. 269-324, 1983.

TANAKA J, SAITO H, SETO K. **Involvement of septum in the regulation of paraventricular vasopressin neurons by the subfornical organ in the rat.** Neurosci Lett, vol. 92, p. 187-191, 1988.

THINSCHMIDT, J. S., FRAZIER, C. J., KING, M. A., MEYER, E. M., PAPKE, R. L. **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, 2005.

TONEY GM, CHEN QH, CATO MJ, STOCKER SD. **Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity.** Acta Physiol Scand, vol. 177, p. 43-55, 2003.

URZEDO-RODRIGUES, L. S., DEPIERI, T., CHEROBINO, A. J., LOPES, O. U., MENANI, J. V., COLOMBARI, D. S. **Hypothalamic disconnection caudal to paraventricular nucleus affects cardiovascular and drinking responses**

to central angiotensin II and carbachol. Brain Res., v. 1388, p. 100-108, 2011.

WEINBERG, E. D. **Cellular iron metabolism in health and disease.** Drug Metab.Rev., v. 22, p. 531-579, 1990.

ZIMMERMAN, M. C., DAVISSON, R. L. **Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function.** Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 84, no. 2-3, p. 125-149, 2004.

ZIMMERMAN, M. C., LAZARTIGUES, E., LANG, J. A., SINNAYAH, P., AHMAD, I. M., SPITZ, D. R., DAVISSON, R. L. **Superoxide Mediates the Actions of Angiotensin II in the Central Nervous System.** Circulation Research, v. 91, no. 11, p. 1038-1045, 2002.

ZOCCARATO, F., CAVALLINI, L., DEANA, R., ALEXANDRE, A. **The action of the glutathione transferase substrate, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene on synaptosomal glutathione content and the release of hydrogen peroxide.** Arch.Biochem.Biophys., v. 282, no. 2, p. 244-247, 1990.

ZOCCARATO, F., VALENTE, M., ALEXANDRE, A. **Hydrogen peroxide induces a long-lasting inhibition of the Ca(2+)-dependent glutamate release in cerebrocortical synaptosomes without interfering with cytosolic Ca2+.** J Neurochem., v. 64, no. 6, p. 2552-2558, 1995.