



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

MARIANA DEL ROSSO DE MELO

EFEITOS DA AÇÃO CENTRAL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA INGESTÃO DE ÁGUA, NA EXCREÇÃO RENAL DE ÁGUA E ELETRÓLITOS E NA EXPRESSÃO DE FOS INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA DA ÁREA SEPTAL MEDIAL.

Araraquara

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

EFEITOS DA AÇÃO CENTRAL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA INGESTÃO DE ÁGUA, NA EXCREÇÃO RENAL DE ÁGUA E ELETRÓLITOS E NA EXPRESSÃO DE FOS INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA DA ÁREA SEPTAL MEDIAL.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Aluno: Mariana Del Rosso de Melo

Orientador: Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari

Araraquara

2011

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre ter me acompanhado nessa minha caminhada.

Aos meus pais e irmão pela dedicação, carinho e confiança que me ajudaram a ser o que sou.

Às pessoas que eu amo pelo companheirismo e lealdade.

À Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari pela ótima orientação dada durante a execução deste trabalho.

E a todas as pessoas do Laboratório de Fisiologia que também participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	6
2. LISTA DE FIGURAS.....	8
3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
4. INTRODUÇÃO.....	10
5. OBJETIVOS.....	15
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
6.1 Animais.....	16
6.2 Implante de Cânulas na Área Septal Medial (ASM).....	16
6.3 Drogas	17
6.4 Injeção de drogas na ASM.....	17
6.5 Medidas de ingestão de água.....	17
6.6 Medidas e determinações bioquímicas na urina.....	17
6.7 Gavagem.....	18
6.8 Histologia.....	18
6.9 Imunohistoquímica.....	18
6.10 Análise Estatística.....	20
7. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	21
7.1 Administração de H ₂ O ₂ (5 µmol/ 0,5l) na ASM e medida da ingestão de água induzida pela injeção de carbacol também na ASM.....	21
7.2 Administração de H ₂ O ₂ (5 µmol/ 0,5µl) na ASM e medida da excreção renal de água e eletrólitos induzida pela injeção de carbacol também na área septal medial.....	21

7.3 Expressão de <i>c-Fos</i> no núcleo supra-óptico do hipotálamo (NSO) após a injeção de carbacol sozinho ou combinado com H ₂ O ₂ na ASM.	22
8. RESULTADOS.....	24
8.1 Efeito da administração de H ₂ O ₂ (5 μmol/ 0,5μl) na ASM sobre a resposta dipsogênica induzida pela injeção de carbacol também na área septal medial.....	24
8.2 Efeitos da administração de H ₂ O ₂ (5 μmol/ 0,5μl) na ASM sobre a excreção renal de água e eletrólitos induzida pela injeção de carbacol também na ASM.....	25
8.2.1 Efeito da administração de H ₂ O ₂ na ASM sobre a antidiurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.....	25
8.2.2 Efeito da administração de H ₂ O ₂ na ASM sobre a natriurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.....	27
8.2.3 Efeito da administração de H ₂ O ₂ na ASM sobre a caliurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.....	28
8.3 Efeito na expressão da proteína <i>c-Fos</i> nos núcleos supra-óptico (NSO) após administração de carbacol sozinho ou combinado com H ₂ O ₂ na ASM.....	30
9. HISTOLOGIA.....	32
10. DISCUSSÃO.....	33
11. CONCLUSÃO.....	38
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. RESUMO

A área septal medial (ASM), situada no prosencéfalo, está envolvida na regulação cardiovascular e no controle do balanço hidroeletrólítico. Esta área é rica em receptores colinérgicos e a ativação dos mesmos induz ingestão de água, natriurese e antidiurese. A ASM também envia projeções aos núcleos paraventricular (NPV) supra-óptico (NSO), os quais contêm os neurônios que secretam vasopressina e ocitocina. Existem evidências experimentais demonstrando que as espécies reativas de oxigênio podem 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), injetado no ventrículo lateral (VL) reduz a ingestão de água e a resposta pressora induzida por ANG II e carbacol (agonista colinérgico) também injetados no VL. Por isso, o presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos da injeção de H_2O_2 na ASM sobre a ingestão de água, sobre a excreção renal de água e eletrólitos e sobre a expressão da proteína c-Fos no NSO produzidos pela injeção de carbacol também na ASM.

Para realizar este trabalho, foram utilizados ratos com cânulas de aço inoxidável implantadas na ASM. A ingestão de água e a excreção renal de água e eletrólitos foram estudadas em ratos que receberam injeções de H_2O_2 ($5 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{l}$) ou PBS (veículo, $0,5 \mu\text{l}$) na ASM e, após um minuto, injeção de carbacol ($4 \text{ nmol}/0,5 \mu\text{l}$) ou salina ($\text{NaCl } 0,15 \text{ M} / 0,5 \mu\text{l}$) também na ASM. A ingestão de água induzida pelo carbacol, através da estimulação colinérgica, foi menor nos ratos que receberam a injeção prévia de peróxido de hidrogênio ($8 \pm 2,0 \text{ ml} / 1 \text{ h}$, $p < 0,05$) comparado àqueles que receberam veículo, também na ASM ($16,6 \pm 1,9 \text{ ml} / 1 \text{ h}$, $p < 0,05$). Além disso, houve diferença significativa na ingestão de água dos ratos + salina, grupo controle, ($3,8 \pm 1,8 \text{ ml} / 1 \text{ h}$, $p < 0,05$).

A injeção de carbacol na ASM induziu antidiurese (veículo + carbacol: $7,9 \pm 0,5$, vs. veículo + salina: $11,8 \pm 0,6$ ml / 2 h, $p < 0,05$), natriurese (veículo + carbacol: 738 ± 107 , vs. veículo + salina: $82,7 \pm 9,0$ μ Eq / 2 h, $p < 0,05$) e caliurese (veículo + carbacol: 189 ± 12 , vs. veículo + salina: $74 \pm 8,2$ μ Eq / 2 h, $p < 0,05$). A antidiurese induzida pelo carbacol foi atenuada pelo tratamento prévio com H_2O_2 na ASM (H_2O_2 + carbacol: $9,5 \pm 1$ ml / 2 h, $p < 0,05$ comparada com veículo + carbacol). Injeção prévia de H_2O_2 reduziu a natriurese (H_2O_2 + carbacol: 511 ± 68 μ Eq / 2 h, $p < 0,05$ comparada com veículo + carbacol), e a caliurese (H_2O_2 + carbacol: 155 ± 11 μ Eq / 2 h, $p < 0,05$ comparada com veículo + carbacol).

Para analisar a expressão da proteína c-Fos no NSO, H_2O_2 ou veículo foi injetado na ASM 1 minuto antes da injeção de carbacol ou veículo na mesma área. Noventa minutos depois, os ratos foram perfundidos e seções do NSO foram submetidas à imunohistoquímica para c-Fos usando coloração DAB. A injeção de carbacol na ASM induziu a expressão da proteína c-Fos no NSO (veículo + carbacol: 151 ± 15 , vs. veículo + salina: $3,5 \pm 3,5$ células/seção). Entretanto, essa expressão foi reduzida pela injeção prévia de H_2O_2 na ASM (H_2O_2 + carbacol: 102 ± 8 células/seção, $p < 0,05$ comparada com veículo + carbacol).

Nossos resultados sugerem que o aumento na disponibilidade de H_2O_2 atenua o efeito dipsogênico, antidiurético, natriurético e caliurético induzido pela ativação colinérgica central.

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com H ₂ O ₂ (5 µmol/0,5 µl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina na ASM.....	24
Figura 2: Volume urinário cumulativo em ratos tratados com H ₂ O ₂ (5 µmol/0,5 µl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina na ASM.....	26
Figura 3: Excreção cumulativa de sódio em ratos tratados com H ₂ O ₂ (5 µmol/0,5 µl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina na ASM.....	27
Figura 4: Excreção cumulativa de potássio em ratos tratados com H ₂ O ₂ (5 µmol/0,5 µl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina na ASM.....	29
Figura 5: Contagem da proteína c-Fos no NSO em ratos tratados com H ₂ O ₂ (5 µmol/0,5 µl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina na ASM.....	30
Figura 6: Fotomicrografia mostrando a expressão da proteína c-Fos em neurônios do NSO em rato.....	31
Figura 7: Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção na ASM.....	32

3. LISTA DE ABREVIATURAS

AC	comissura anterior
ANG II	angiotensina II
APM	área preótica medial
AT1	receptores angiotensinérgicos tipo 1
ASM	área septal medial
AVP	vasopressina
DAB	diaminobenzidina
EROs	espécies reativas de oxigênio
HL	hipotálamo lateral
ICV	intracerebroventricular
OC	quiasma óptico
OT	ocitocina
PBS	salina tamponada fosfatada
PFA	paraformaldeído
NPV	núcleo paraventricular
SNC	sistema nervoso central
NSO	núcleo supra-ótico
VL	ventrículo lateral

4. 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 de volume e da osmolaridade 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 (Loewy, 1991; Dampney, 1994; McKinley e Johnson, 2004; Antunes-Rodrigues e cols., 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 hidroeletrólítico, pode-se destacar a área septal medial (ASM), que é um subnúcleo da área septal ou septum (Negro-Vilar e cols., 1967; Tanaka e cols., 1988; Donevan e Ferguson, 1988; Luiz e cols., 1991; Colombari e cols., 1994; Callera e cols., 1994; Haibara e cols., 1994; Paulin e cols., 2009). 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, são ricos

em receptores colinérgicos (Rouse e Levey, 1996), sejam eles muscarínicos (Disko e cols., 1999) ou nicotínicos (Thinschmidt e cols., 2005).

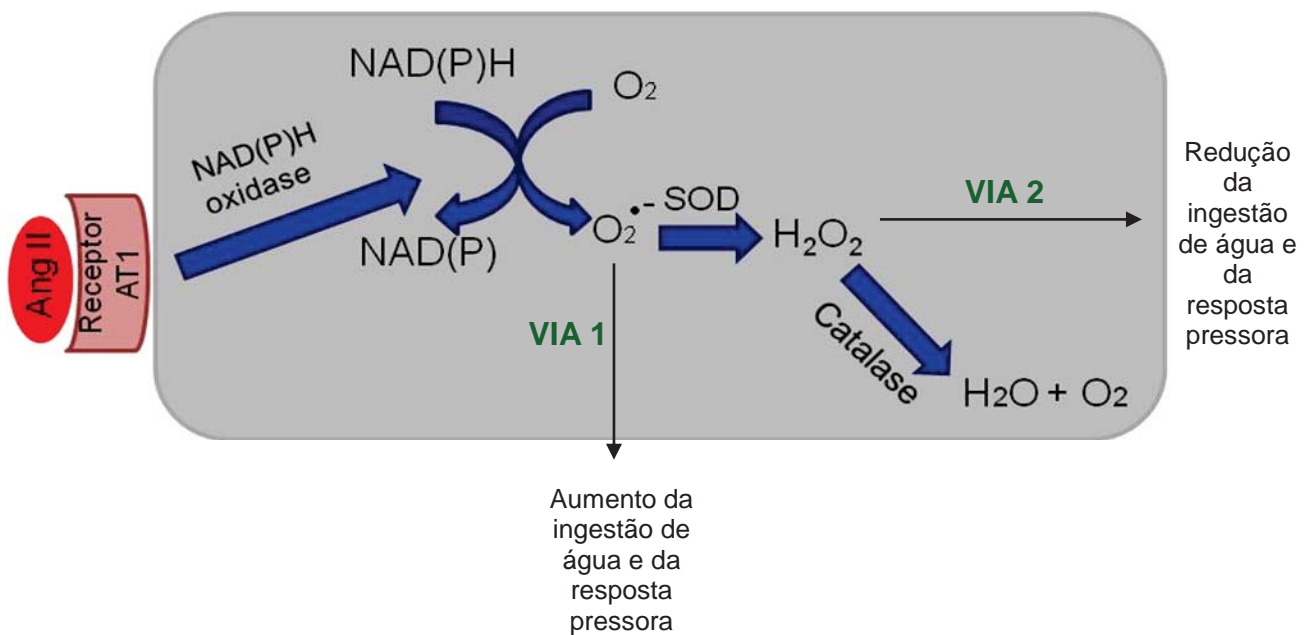
Dados neuroanatômicos demonstraram que a ASM envia projeções para a área préótica medial (APM) e hipotálamo lateral (HL) (Meibach e Siegel, 1977; Swanson e Cowan, 1979), que são regiões hipotalâmicas muito importantes para a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (Kucharczyk e Mogenson, 1975; Kucharczyk e cols., 1976; Haibara e cols., 1994). 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 e cols., 1985).

Interações funcionais de diferentes áreas do SNC, como o HL, área pré-óptica lateral com a ASM para o controle do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular foram descritos. Franci e cols. (Franci e cols., 1980) utilizando lesões eletrolíticas na ASM, 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 ou o bloqueio colinérgico da ASM reduz as respostas pressora, natriurética e dipsogênica induzida pela injeção intracerebroventricular (icv) do agonista colinérgico, carbacol (Luiz e cols., 1991; Barbosa e cols., 1995).

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) (Weinberg, 1990; Rhee e cols., 2003). 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 e cols., 2003). A despeito 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 (Kauker e cols., 1991)).

Trabalhos recentes demonstraram que, no SNC, 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 e cols., 2002; Zimmerman e Davisson, 2004). 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 e cols., 2002; Zimmerman e Davisson, 2004). 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). Nesse estudo, os autores realizaram a transfecção adenoviral para superexpressar a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Assim, quando superexpressada, há um aumento na produção de peróxido de hidrogênio. 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 e cols., 2006; Lauar e cols., 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).



Mais recentemente, demonstramos também que as respostas dipsogênica e natriurética do carbacol injetado no ventrículo lateral foram também reduzidas pelo H₂O₂, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio também podem alterar os efeitos fisiológicos induzidos pela estimulação colinérgica central (Pinguero e cols., 2008). De fato, uma interação entre H₂O₂ e receptores colinérgicos já foi descrito na literatura. Estudos realizados em glândulas parótidas de ratos demonstraram que o H₂O₂ pode atenuar a secreção de amilase induzida pelo carbacol por reduzir a mobilização de Ca²⁺ intracelular, que é essencial para o processo de exocitose da amilase (Mata et al., 2008). Estudos realizados em células de neuroblastoma humano que contém receptores muscarínicos, receptores acoplados à proteína G, mostraram que o tratamento prévio com peróxido de hidrogênio diminui a fosforilação da proteína tirosina, a qual no estado fosforilado, desencadeia uma cascata bioquímica de fosforilações, que culminam nos efeitos da ativação colinérgica (Jope et al., 1999). Esses dados sugerem que o H₂O₂ modula negativamente as ações do carbacol e da acetilcolina por reduzir os efeitos intracelulares decorrentes da ativação de receptores muscarínicos.

Tem sido vastamente estudado que os fatores de transcrição induzíveis regulam a síntese protéica em resposta a estimulação sináptica de neurônios (revisão em (Morgan e Curran, 1991)). De fato, a marcação imunohistoquímica para os produtos dos genes da família AP-1, particularmente c-Fos tem sido largamente utilizados para mapear regiões no SNC que são ativadas por estímulos fisiológicos (Oldfield e cols., 1994; Polson e cols., 1995; Andrade e cols., 2004; Penny e cols., 2005; Blanch e cols., 2009). Desta forma, uma vez que está demonstrada uma grande conexão anatômica entre a ASM e o hipotálamo, é interessante estudar se a estimulação colinérgica da ASM ativa os neurônios de determinados núcleos hipotalâmicos envolvidos no equilíbrio hidroeletrólítico e cardiovascular, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e o núcleo supra-óptico (NSO). Esses núcleos são secretores dos hormônios vasopressina e ocitocina (Swanson e Sawchenko, 1980; Swanson e Sawchenko, 1983), os quais tem função antidiurética / pressora (Swanson e Sawchenko, 1980) e natriurética (Huang e cols., 1995), respectivamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar uma correlação entre a atividade dessas regiões com as respostas dipsogênica, natriurética, caliurética e antidiurética induzida pelo carbacol na ASM, bem como verificar se o H₂O₂ também microinjetado na ASM modifica a expressão da proteína c-Fos no núcleo supra-óptico do hipotálamo.

5. OBJETIVOS

Verificar os efeitos de H_2O_2 na ASM sobre as respostas dipsogênica, natriurética, caliurética e antidiurética induzida pela injeção também na ASM de carbacol, e estudar o efeito na expressão da proteína c-Fos no núcleo supra-óptico do hipotálamo (NSO) após a injeção de carbacol sozinho ou combinado com H_2O_2 na ASM.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, pesando entre 280 a 320 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, câmpus de Araraquara. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética desta mesma faculdade (processo 07/2009). Os animais foram mantidos com água de torneira e ração granulada (Purina) *ad libitum* em gaiolas individuais.

6.2 Implante de cânulas na área septal medial (ASM)

Os animais foram anestesiados com quetamina (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 e Watson, 1986), a saber: AP = 0,7 mm rostral ao bregma; L= 0,0 mm do seio venoso; V = 3,6 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 administradas.

6.3 Drogas

As drogas utilizadas neste trabalho foram:

- carbacol (4 nmol/0,5 µl), Sigma, St. Louis, MO, USA
- peróxido de hidrogênio (5 µmol /0,5 µl) – (espécie reativa de oxigênio), Sigma, St. Louis, MO, USA.

O carbacol foi dissolvido em salina (NaCl 0,15 M) e o H₂O₂ foi dissolvido em PBS (salina tamponada fosfatada – veículo, pH = 7,4).

6.4 Injeção de drogas na ASM

As injeções na ASM foram feitas 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.

6.5 Medidas de ingestão de água

A quantidade ingerida de água 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 o período do teste de ingestão de água.

6.6 Medidas e determinações bioquímicas na urina

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⁺ (NOVA 1, Nova Biomedical). A excreção total de Na⁺ e K⁺ foi calculada como concentração de Na⁺ e K⁺ multiplicado pelo volume urinário.

6.7 Gavagem

Para a realização do experimento de excreção renal de água e eletrólitos, foram administradas duas gavagens, nas quais o volume de água de aproximadamente de 5% do peso corporal do animal foi administrado intragastricamente, com a utilização de uma sonda. Este procedimento foi realizado com o objetivo de aumentar a diurese, através do aumento do volume do líquido extracelular (LEC) e diminuição da osmolaridade do LEC.

6.8 Histologia

No final dos experimentos, sob anestesia profunda, 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 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 no microscópio óptico.

6.9 Imunohistoquímica

No grupo de animais que foi realizado o estudo de marcação imunohistoquímica do c-Fos, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, ip). A seguir, os animais foram perfundidos com salina tamponada (PBS 0,1 M, pH = 7,4) seguido de uma solução de paraformaldeído (Sigma, St. Louis, MO) a 4% (PFA 4%) em PBS 0,1 M. Os cérebros foram então removidos e estocados 24h em 20% de sacarose em PFA 4%. A seguir os cérebros foram transferidos para soluções de PBS 0,1 M (pH = 7,4), contendo sacarose 20%. Após o armazenamento à 4° C, por não mais que 1 semana, os cérebros foram

congelados e cortes coronais de 30 μm do hipotálamo foram seccionados em um criostato e coletados em placas de cultura com 24 pocinhos contendo PBS 0,1 M para serem processados ao procedimento de imunohistoquímica.

Um corte a cada 5 (cada 150 μm) da região hipotalâmica foi processada para análise imunohistoquímica para detecção de c-Fos. Os cortes hipotalâmicos foram pré-incubados por 10 minutos em 3% de peróxido de hidrogênio em PBS 0,1 M (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguido por lavagem com PBS 0,1 M (3 x 10 min). A seguir os cortes foram incubados por 15 minutos em solução bloqueadora composta de 10% de soro normal de cabra (NGS, Sigma, St. Louis, MO) e Triton-X 0,3% (Sigma) em PBS 0,1 M, seguido de lavagens em PBS (3 x 10 minutos). Os cortes foram então incubados em um anticorpo primário policlonal anti-c-Fos feito em coelho (1:20.000, Ab-5, Calbiochem, San Diego, USA) em PBS contendo 1% de NGS e Triton X-100 0,3% por 48 horas à 4°C. Após a incubação em anticorpo primário, as seções foram lavadas em PBS (3 x 10 minutos) antes de serem incubadas por uma hora em anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em cabra (1:500, em PBS contendo 1% NGS e Triton-X 0,3%; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) em temperatura ambiente. Após essa incubação os cortes foram lavados (PBS 0,1 M, 3 x 10 minutos) e novamente incubados em por mais uma hora em Strept-avidin HRP (1:500, em PBS 0,1 M contendo 1% NGS e Triton-X 0,3%; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) em temperatura ambiente. Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada para produzir a reação nuclear que promove a coloração castanha no núcleo. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratadas em álcool, limpas em xilol e cobertas com lamínulas. As células que expressaram imunorreatividade para a expressão nuclear de c-Fos foram contados a cada 150 μm em cortes representativos, em microscópio de luz (Nikon) com uma magnificação de 20x.

6.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados através de análise de variância de uma ou duas vias, de acordo com o indicado, associadas ao teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

7. EXPERIMENTOS REALIZADOS

7.1 Administração de H₂O₂ (5 µmol/ 0,5µl) na ASM e medida da ingestão de água induzida pela injeção de carbacol também na ASM

Foram injetados na área septal medial H₂O₂ (5 µmol/0,5 µl) ou PBS (salina tamponada fosfatada, 0,5 µl) combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina (NaCl 0,15 M / 0,5 µl).

Os animais foram submetidos a 4 experimentos:

- veículo ASM + salina ASM;
- veículo ASM + carbacol ASM;
- H₂O₂ ASM + salina ASM;
- 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 tratamento. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos. H₂O₂ ou PBS foi injetado 1 minuto 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.

7.2 Administração de H₂O₂ (5 µmol/ 0,5 µl) na ASM e medida da excreção renal de água e eletrólitos induzida pela injeção de carbacol também na ASM

Foram injetados na área septal medial H₂O₂ (5 µmol/0,5 µl) ou PBS (salina tamponada fosfatada, 0,5 µl) combinados com carbacol (4 nmol/0,5 µl) ou salina (NaCl 0,15 M / 0,5 µl)

Os animais foram divididos em 4 grupos, como no item 1.

Os animais foram privados de ração 14 horas antes da realização do experimento. Foram realizadas duas gavagens de água (com volume aproximadamente 5% do peso corporal do animal), sendo que a segunda foi feita 1 hora depois da primeira. 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 tratamento. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos. H₂O₂ ou PBS foi injetado 1 minuto antes de carbacol ou salina. Imediatamente após a injeção de carbacol ou salina os animais receberam a segunda gavagem e, depois, foram colocados em gaiolas metabólicas, e a urina foi coletada por gravidade em tubos graduados em 0,1 ml. As medidas foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 minutos. 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.

7.3 Expressão de c-Fos no núcleo supraóptico do hipotálamo (NSO) após a injeção de carbacol sozinho ou combinado com H₂O₂ na ASM.

Um novo grupo de ratos Holtzman foi utilizado (n=4 / tratamento), e o procedimento de implante de cânula na ASM foi idêntico ao citado na metodologia geral. O grupo de animais foi submetido a 4 diferentes tratamentos:

- veículo ASM + salina ASM;
- veículo ASM + carbacol ASM;
- H₂O₂ ASM + salina ASM;
- H₂O₂ ASM + carbacol ASM.

Após 90 minutos das injeções cerebrais, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, ip). A seguir, os animais foram perfundidos com salina tamponada (PBS 0,1 M, pH = 7.4) seguido de uma solução de paraformaldeído (Sigma, St. Louis, MO) a 4% (PFA 4%) em PBS 0,1 M. Foi feito o processamento imunohistoquímico para a marcação da proteína c-Fos (marcadora de ativação neuronal). As células que expressaram imunorreatividade para c-Fos foram contados a cada 150 μ m em cortes representativos, em microscópio de luz (Nikon) com uma magnificação de 20x.

8. RESULTADOS

8.1 Efeito da administração de H_2O_2 ($5 \mu\text{mol}/0,5\mu\text{l}$) na ASM sobre a resposta dipsogênica induzida pela injeção de carbacol também na ASM

Na figura 1 verifica-se que a ingestão de água induzida pelo carbacol, através da estimulação colinérgica, foi menor nos ratos que receberam a injeção prévia de peróxido de hidrogênio ($8 \pm 2,0 \text{ ml} / 1 \text{ h}$) comparado àqueles que receberam veículo, também na ASM ($16,6 \pm 1,9 \text{ ml} / 1 \text{ h}$). Além disso, houve diferença significativa na ingestão de água dos ratos tratados com H_2O_2 + carbacol ou veículo + carbacol comparados àqueles tratados com veículo + salina.

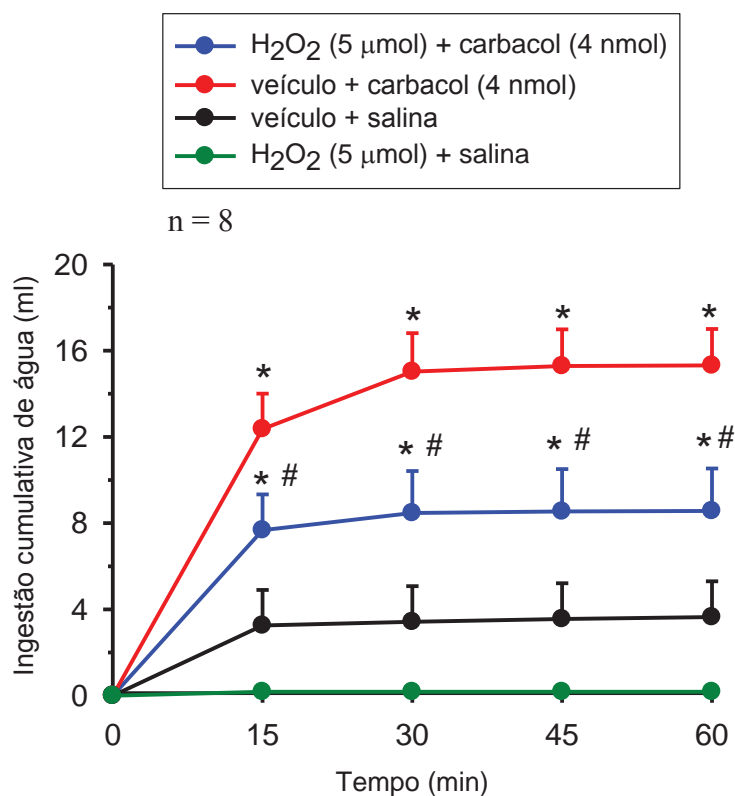


Figura 1: Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com H_2O_2 ($5 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{l}$) ou veículo combinados com carbacol ou salina. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. *diferente de veículo + salina; # diferente de veículo + carbacol. n = número de animais.

8.2 Efeitos da administração de H_2O_2 (5 μ mol/ 0,5 μ l) na ASM sobre a excreção renal de água e eletrólitos induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

8.2.1) Efeito da administração de H_2O_2 na ASM sobre a antidiurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

O carbacol na ASM produz antidiurese, como pode ser observado na figura 2. O tratamento prévio com H_2O_2 (5 μ mol/0,5 μ l) atenuou a antidiurese induzida pelo carbacol (4 nmol/0,5 μ l) na ASM (H_2O_2 + carbacol: $9,5 \pm 1,0$ vs., veículo + carbacol: $7,9 \pm 0,5$ ml / 120 min, $p < 0,05$). Além disso, verificou-se que o tratamento com H_2O_2 + salina aumentou a diurese basal (H_2O_2 + salina: $14,2 \pm 0,8$ vs., veículo + salina: $11,8 \pm 0,6$ ml / 120 min, $p < 0,05$). Houve diferença significativa no volume urinário excretado dos ratos tratados com H_2O_2 + carbacol ou PBS + carbacol comparados àqueles tratados com veículo + salina, figura 2.

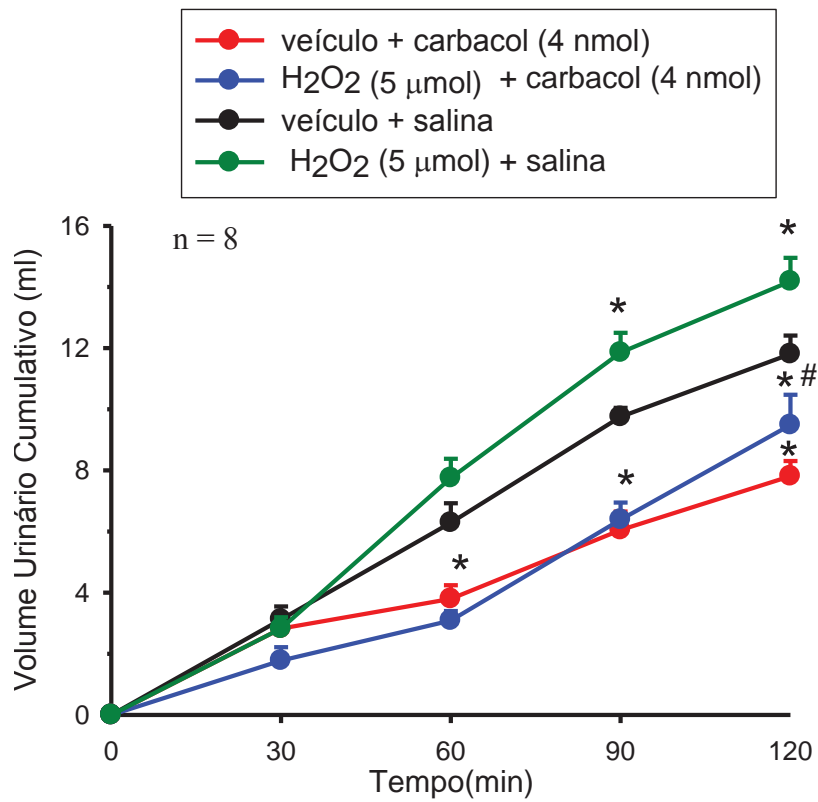


Figura 2: Volume urinário cumulativo em ratos tratados com H₂O₂ (5 μmol/0,5 μl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 μl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; p<0,05. *diferente de veículo + salina; # diferente de veículo + carbacol. n = número de animais.

8.2.2) Efeito da administração de H_2O_2 na ASM sobre a natriurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

Foi observado que o carbacol na ASM produz natriurese, como pode ser observado na figura 3. A natriurese induzida pelo carbacol (4 nmol/0,5 μ l) injetado da ASM foi menor nos ratos que receberam a injeção prévia de H_2O_2 comparado àqueles que receberam injeção prévia de veículo, também na ASM (H_2O_2 + carbacol: 511 ± 68 , vs. veículo + carbacol: 738 ± 108 μ Eq / 120 min). Além disso, houve diferença significativa na excreção cumulativa de sódio dos ratos tratados com H_2O_2 + carbacol ou veículo + carbacol comparados àqueles tratados com veículo + salina, figura 3.

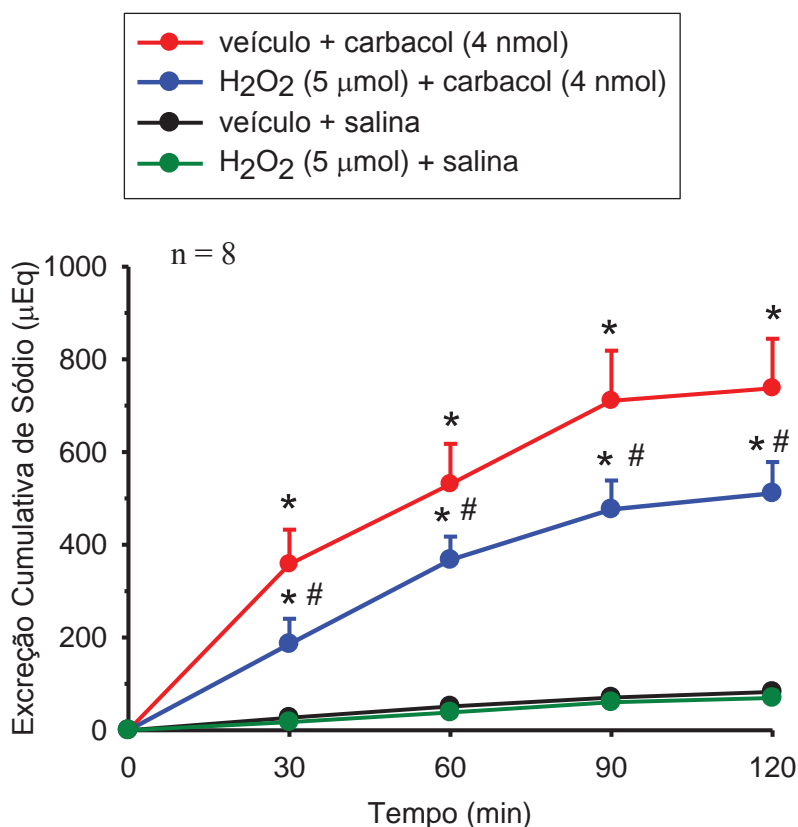


Figura 3: Excreção cumulativa de sódio em ratos tratados com H_2O_2 (5 μ mol/0,5 μ l) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 μ l) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; P

< 0,05. *diferente de veículo + salina; # diferente de veículo + carbacol. n = número de animais.

8.2.3) Efeito da administração de H₂O₂ na ASM sobre a caliurese induzida pela injeção de carbacol também na ASM.

Observou-se que o carbacol na ASM produz caliurese, como pode ser observado na figura 4. A caliurese induzida pelo carbacol (4 nmol/0,5 µl) injetado da ASM foi menor nos ratos que receberam a injeção prévia de H₂O₂ comparado àqueles que receberam injeção prévia de veículo, também na ASM (H₂O₂ + carbacol: 155,4 ± 12,4, vs. veículo + carbacol: 188,1 ± 12,4 µEq / 120 min). Além disso, houve diferença significativa na excreção cumulativa de potássio dos ratos tratados com H₂O₂ + carbacol ou veículo + carbacol comparados àqueles tratados com PBS + salina, figura 4.

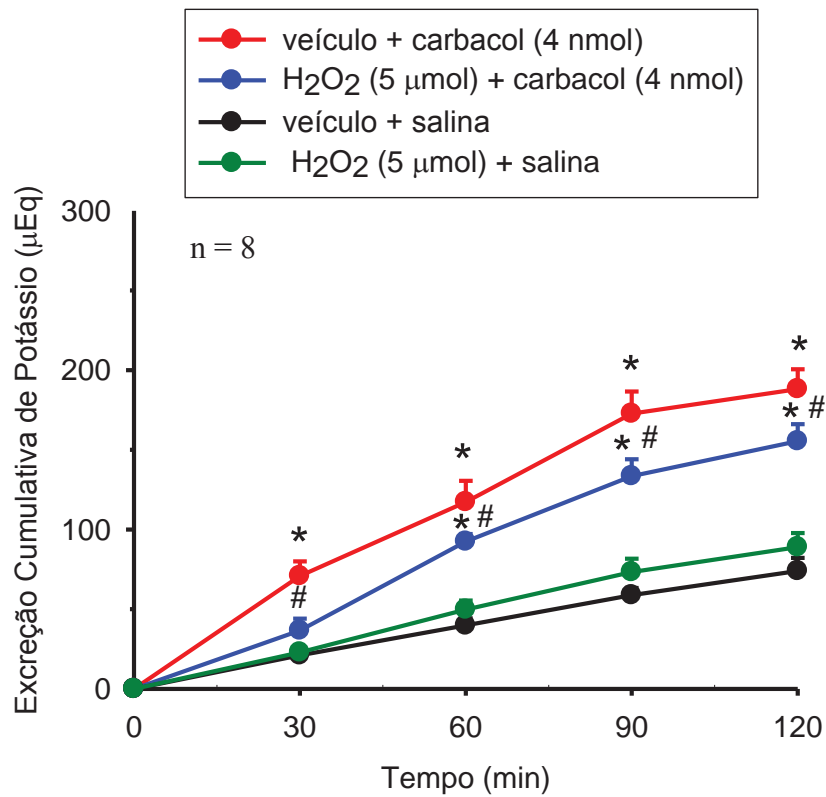


Figura 4: Excreção cumulativa de potássio em ratos tratados com H₂O₂ (5 μmol/0,5 μl) ou veículo combinados com carbacol (4 nmol/0,5 μl) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls; P < 0,05. *diferente de PBS+ salina; # diferente de PBS + carbacol. n = número de animais.

8.3 Efeito na expressão da proteína c-Fos no núcleo supra-óptico (NSO) após administração de carbacol sozinho ou combinado com H_2O_2 na ASM.

Verificou-se que o carbacol, quando injetado na área septal medial, induziu a expressão da proteína c-Fos ($150,5 \pm 13,46$ corpos celulares) no NSO, sugerindo que houve a ativação neuronal dessa região. Entretanto, o tratamento prévio com H_2O_2 ($5 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{l}$) diminuiu a expressão dessa proteína ($102,3 \pm 8,05$ corpos celulares), sugerindo menor ativação neuronal e possivelmente diminuição na secreção de vasopressina. Além disso, houve diferença significativa no número de corpos celulares marcados dos ratos tratados com H_2O_2 + carbacol ou veículo + carbacol comparados àqueles tratados com veículo + salina, figura 5.

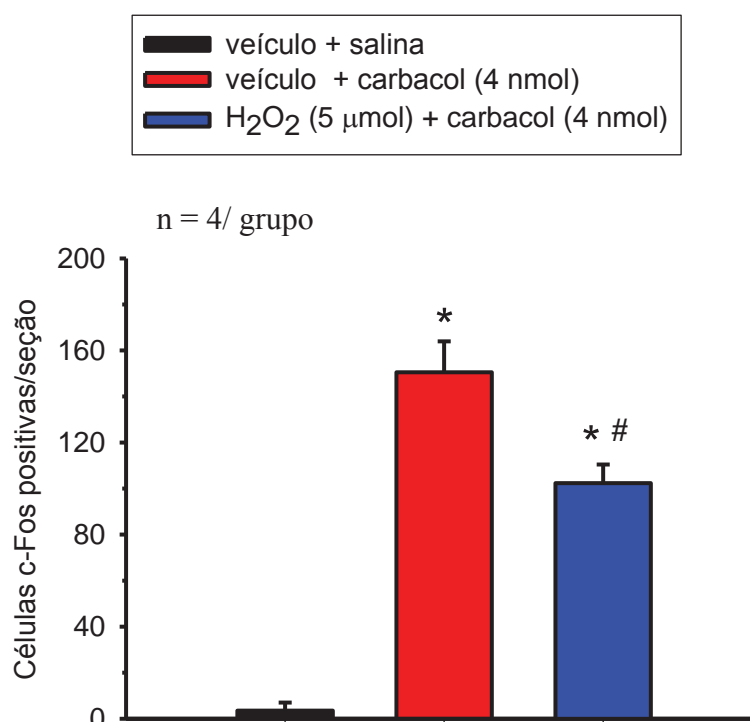


Figura 5: Contagem da proteína c-Fos no NSO em ratos tratados com H_2O_2 ($5 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{l}$) ou veículo combinados com carbacol ($4 \text{ nmol}/0,5 \mu\text{l}$) ou salina na ASM. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. ANOVA de uma via associado ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. *diferente de PBS+ salina. # diferente de PBS + ASM. $n = 4/\text{grupo}$.

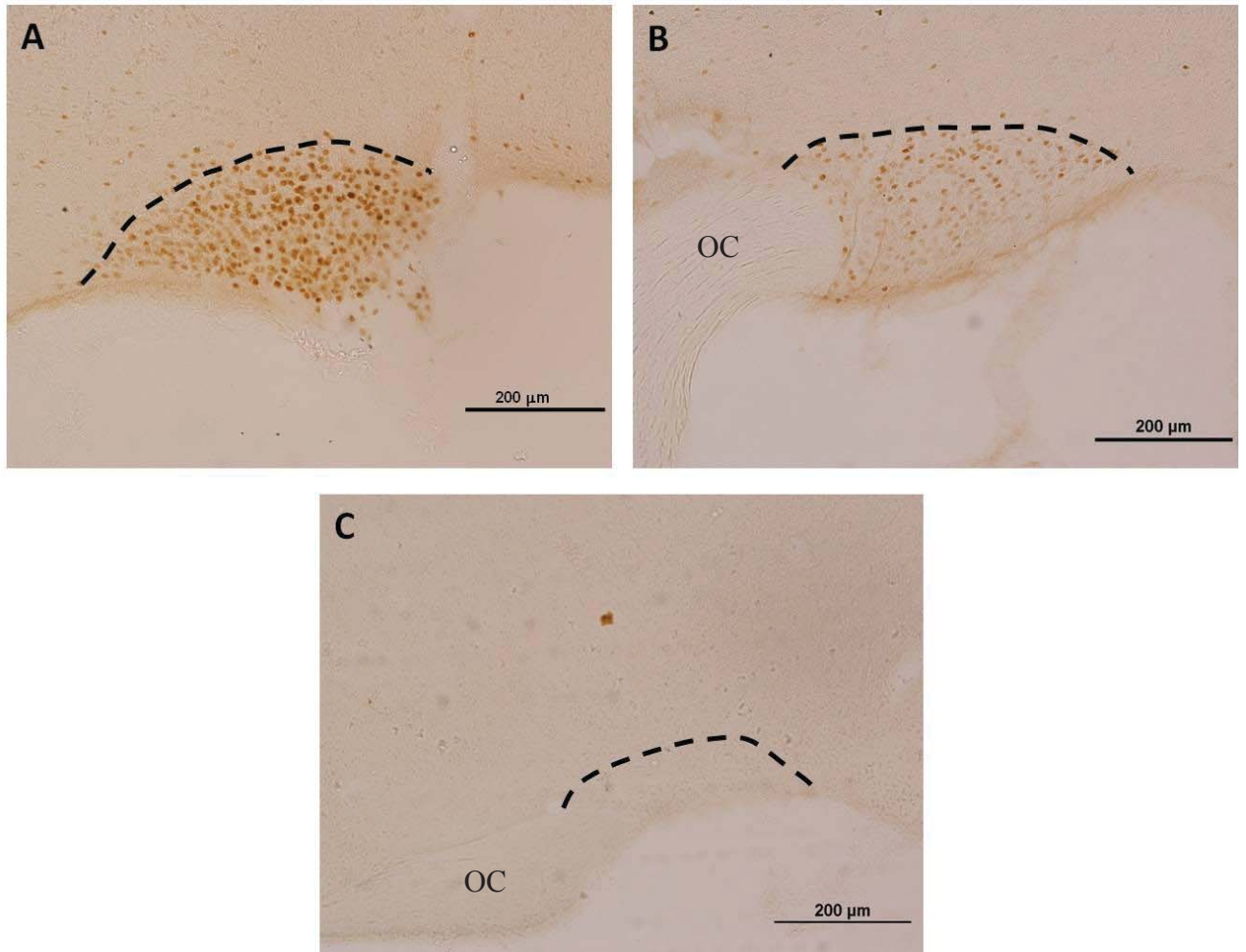


Figura 6: Fotomicrografia mostrando a expressão da proteína c-Fos (pontos escuros) em neurônios do NSO em rato: **A)** veículo + carbacol na ASM; **B)** H₂O₂ + carbacol na ASM e **C)** veículo + salina na ASM. **oc:** quiasma óptico.

9. HISTOLOGIA

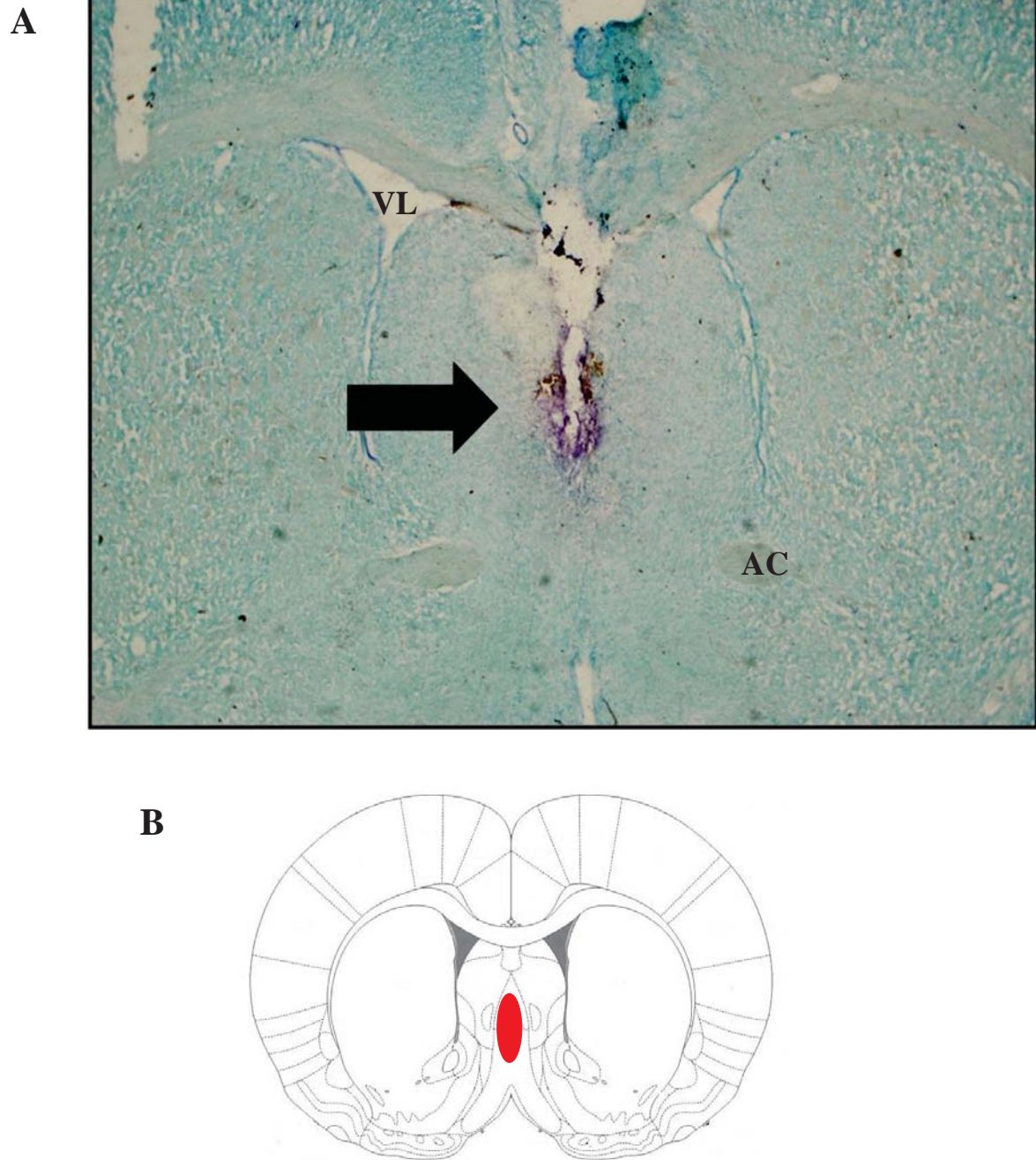


Figura 7: **A)** Fotomicrografia representativa do grupo mostrando o sítio de injeção na ASM (seta); **B)** Esquema de um corte coronal do prosencéfalo mostrando em vermelho o local onde foram feitas as injeções na ASM. **ac:** comissura anterior; **VL:** ventrículo lateral.

10. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que o tratamento prévio com peróxido de hidrogênio é capaz de atenuar o efeito dipsogênico, antidiurético, natriurético e caliurético produzido pelo carbacol, que é um agonista colinérgico do tipo muscarínico, na área septal medial. Além disso, os resultados mostram que o tratamento com H₂O₂ sozinho é capaz de provocar aumento da diurese basal, sugerindo que o H₂O₂ pode diminuir a secreção de vasopressina basal.

Recentemente, estudos do nosso laboratório demonstraram também que a resposta dipsogênica e natriurética do carbacol injetado no ventrículo lateral foram também reduzidas pelo H₂O₂ (Pinguero *et al.*, 2008). Nossos resultados vão ao encontro dos resultados anteriores e expandem o conhecimento, na medida em que efeitos semelhantes do H₂O₂ reduzindo uma série de respostas fisiológicas da estimulação colinérgica foram também encontradas em uma área específica do encéfalo, a ASM.

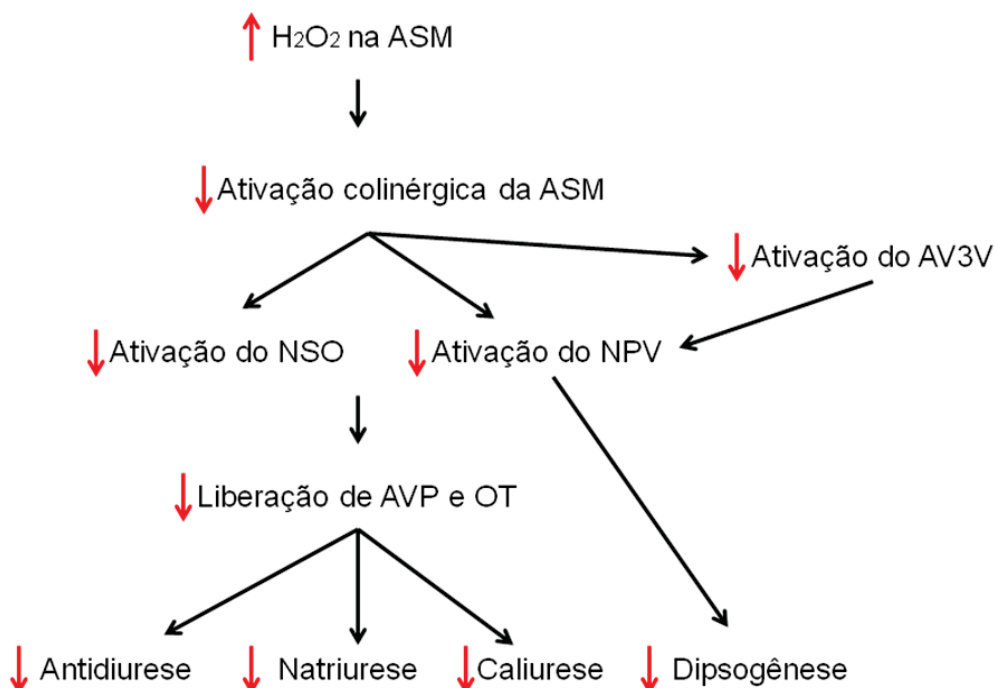
Estudos demonstraram que a ASM envia projeções para o NPV e NSO, (Oldfield *et al.*, 1985). Esses núcleos são secretores dos hormônios AVP e OT (Swanson & Sawchenko, 1980; Swanson & Sawchenko, 1983), os quais têm função antidiurética / pressora (Swanson & Sawchenko, 1980) e natriurética (Huang *et al.*, 1995), respectivamente. O NPV 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 antidiurese induzida pela estimulação colinérgica central, incluindo a ASM, é atribuída à secreção de AVP (Tanaka *et al.*, 1988). Por outro lado a natriurese induzida pela estimulação colinérgica central é atribuída ao efeito direto da OT produzindo natriurese, bem como pela ação da OT em estimular a secreção de peptídeo

natriurético atrial (ANP), produzido pelos miócitos cardíacos (Colombari *et al.*, 1994; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

Os resultados deste presente trabalho mostraram que a ativação colinérgica da área septal medial promove a expressão da proteína c-Fos no NSO, mostrando que houve ativação dos neurônios dessa região, e possivelmente secreção de AVP e OT, os quais podem ter sido responsáveis por pelo menos parte da antidiurese (AVP) e pela natriurese (OT/ANP) induzidas pela ativação colinérgica da ASM. Entretanto, essa expressão foi atenuada nos animais que receberam tratamento prévio com H₂O₂, sugerindo menor ativação neuronal dessa área e, portanto, menor liberação de AVP e de OT/ANP. Uma menor secreção de AVP pode explicar a atenuação da antidiurese em ratos pré-tratados com H₂O₂, e mesmo o aparecimento de uma maior diurese em ratos tratados apenas com H₂O₂. É possível que o sistema colinérgico da ASM seja importante para inibir a redução da secreção de AVP que ocorre durante a queda da osmolaridade plasmática, fazendo parte de um mecanismo contra-regulador da secreção de AVP nesta situação. Com o tratamento apenas com H₂O₂ na ASM, podemos sugerir que há uma inibição por meio desta ERO do sistema contra-regulador exercido pelas vias colinérgicas da ASM, resultando numa potencialização da diurese frente a uma redução da osmolaridade plasmática. Essa hipótese terá que ser confirmada em futuros estudos. De maneira semelhante, a resposta natriurética induzida pela estimulação colinérgica da ASM pode ser decorrente da redução da secreção de OT, a qual, como citado anteriormente, induz natriurese e induz secreção de ANP, o qual é um potente agente natriurético.

A estimulação colinérgica central, incluindo da ASM induz ingestão de água (Colombari *et al.*, 1992b; Colombari *et al.*, 1992a; Luiz *et al.*, 1991; Menani *et al.*, 1990). Neste projeto demonstramos que o tratamento prévio com peróxido de hidrogênio reduz a

resposta dipsogênica, sugerindo que as vias de sede ativadas pelo carbacol na ASM são inibidas pelo aumento de EROs na mesma área.



Os dados observados no presente estudo não se opõem aos resultados mostrados previamente por Zimmerman e cols. (Zimmerman *et al.*, 2002; Zimmerman & Davisson, 2004), mas abrem espaço para questionamentos acerca da interpretação que os autores dão aos seus resultados. Um aumento na atividade SOD leva a um aumento na produção de peróxido de hidrogênio uma vez que a enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (McCord & Fridovich, 1969). Logo, animais que apresentam células transfectadas por adenovírus que carregam o gene para a SOD passam a superexpressar esta enzima e a apresentar uma alta taxa de formação de peróxido de hidrogênio a partir do superóxido. Nestes termos, se não há uma superexpressão conjunta de catalase, é relativamente difícil dissociar a especificidade desta técnica para o superóxido

eximindo o peróxido de hidrogênio formado de qualquer participação no fenômeno demonstrado pelos autores.

O mecanismo pelo qual o H_2O_2 interfere na estimulação colinérgica pelo carbacol ainda não é completamente conhecido. Estudos realizados em glândulas parótidas de ratos demonstraram que o H_2O_2 pode atenuar a secreção de amilase induzida pelo carbacol por reduzir a mobilização de Ca^{2+} intracelular, que é essencial para o processo de exocitose da amilase. Estudos realizados em células de neuroblastoma humano que contém receptores muscarínicos, receptores acoplados à proteína G, mostraram que o tratamento prévio com peróxido de hidrogênio diminui a fosforilação da proteína tirosina, a qual no estado fosforilado, desencadeia uma cascata bioquímica de fosforilações, que culminam nos efeitos da ativação colinérgica (Jope et al., 1999). 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 de 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 do carbacol (Avshalumov *et al.*, 2005; Zoccarato *et al.*, 1995; Bao *et al.*, 2005; Zoccarato *et al.*, 1990). Assim, novos estudos deverão ser realizados para elucidar o mecanismo pelo qual o peróxido de hidrogênio interfere na estimulação colinérgica. Seria interessante estudar os efeitos da atropina (antagonista colinérgico muscarínico) na diurese basal, a fim de comparar com o perfil de resposta do tratamento H_2O_2 + salina, uma vez que foi demonstrado que este tratamento aumenta a diurese basal, o que sugere que o peróxido de hidrogênio pode diminuir a secreção basal de vasopressina. Este

estudo pode indicar se a ação do peróxido de hidrogênio é na mesma via da ativação colinérgica da área septal medial.

11. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o aumento na disponibilidade de H_2O_2 pode ser importante para a redução do efeito dipsogênico, antidiurético, natriurético e caliurético induzido pela ativação colinérgica central.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade CAF, Barbosa SP, De Luca J, & Menani JV (2004). Activation of [alpha]2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neuroscience* **129**, 25-34.
2. Antunes-Rodrigues J, Castro M, Elias LLK, Valença MM, & McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* **84**, 169-208.
3. Avshalumov MV, Chen BT, Koós T, Tepper JM, & Rice ME (2005). Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* **25**, 4222-4231.
4. Bao L, Avshalumov MV, & Rice ME (2005). Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion. *J Neurosci* **25**, 10029-10040.
5. Barbosa SP, Gobbi JIFd, Zilioli L, Arruda Camargo LAd, Saad WA, Renzi A, Luca LAd, & Menani JV (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 Research Bulletin* **37**, 463-466.
6. Blanch GT, Freiria-Oliveira A, Menani JV, Colombari E, Murphy D, & Colombari DSA. Lesions of the commissural nucleus of tractus solitarii increase osmotic-induced activation of

paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei. Abstracts Physiological Society Meeting . 2009. Ref Type: Abstract

7. Callera JC, Saad WA, Camargo LA, Renzi A, De Luca Jr LA, & Menani JV (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* **167**, 153-155.

8. Colombari DSA, Haibara AS, Camargo LAA, Saad WA, Renzi A, De Luca Jr LA, & Menani JV (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* **33**, 249-254.

9. Colombari DSA, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, Colombari E, & Menani JV (1992a). AV3V lesion impair responses induced by cholinergic activation of SFO in rats. *Am J Physiol* **263**, R1277-R1283.

10. Colombari E, Colombari DS, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, Raizada MK, Sumners C, Murphy D, & Paton JF (2010). Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt. *Hypertension* **56**, 956-963.

11. Colombari E, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, & Menani JV (1992b). AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. *Brain Res* **572**, 172-175.

12. Dampney RAL (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* **74**, 323-364.

13. Disko U, Gazyakan E, Heimrich B, & Jackisch R (1999). 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* **114**, 1-8.

14. Donevan SD & Ferguson AV (1988). Subfornical organ and cardiovascular influences on identified septal neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **254**, R544-R551.

15. Franci CR, Silva-Netto CR, Saad WA, Camargo LA, & Antunes-Rodrigues J (1980). Interactions between the lateral hypothalamic area (LHA) and the medial septal area (MSA) in the control of sodium and potassium excretion. *Physiol Behav* **25**, 801-806.

16. Freund T & Antal M (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* **504**, 603-610.

17. Giglioti C, Cardoso LM, Menani JV, Colombari E, & Colombari DSA. Central injections of hydrogen peroxide inhibit angiotensin II-induced water intake. *Soc.Neurosci.Abstract* . 2006.

Ref Type: Abstract

18. Gutman MB, Jones DL, & Ciriello J (1988). Effect of paraventricular nucleus lesions on drinking and pressor responses to ANG II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **255**, R882-R887.

19. Haibara AS, Saad WA, Menani JV, Camargo LA, & Renzi A (1994). Role of lateral hypothalamus on fluid, electrolyte, and cardiovascular responses to activation of the MSA. *Am J Physiol* **266**, R496-R502.
20. Huang W, Lee SL, & Sjoquist M (1995). Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol* **268**, R634-R640.
21. Irani K (2000). 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. *Circ Res* **87**, 179-183.
22. Jensen LL, Harding JW, & Wright JW (1992). Role of paraventricular nucleus in control of blood pressure and drinking in rats. *Am J Physiol* **262**, F1068-F1075.
23. Jiang B, Liu JH, Bao YM, & An L (2003). Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biol Int* **27**, 1026-1031.
24. Jones J & Yakel J (1997). Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus. *J Physiol* **504**, 603-610.
25. Jope R, Song L, Grimes C.A, Zhang L (1999). Oxidative stress oppositely modulates protein tyrosine phosphorylation stimulated by muscarinic G protein – coupled and epidermal growth factor receptors. *J Neuroscience*, **55**, 329-340

26. Kauker ML, Zhang PL, Zeigler DW, & Patel KP (1991). Blunting of the renal response to volume expansion by a bradykinin receptor antagonist: influence of denervation. *J Pharmacol Exp Therap* **258**, 866-870.
27. Kucharczyk J, Assaf SY, & Mogenson GJ (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* **108**, 327-337.
28. Kucharczyk J & Mogenson GJ (1975). Separate lateral hypothalamic pathways for extracellular and intracellular thirst. *Am J Physiol* **228**, 295-301.
29. Lauer MR, Colombari DS, De Paula PM, Colombari E, Cardoso LM, De Luca LAJ, & Menani JV (2010). Inhibition of central angiotensin II-induced pressor responses by hydrogen peroxide. *Neuroscience* **171**, 524-530.
30. Loewy AD (1991). Forebrain nuclei involved in autonomic control. In *Progr. Brain Res.*, ed. Holstege G, pp. 253-268. Elsevier.
31. Luiz AC, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, & Menani JV (1991). Pressor, dipsogenic, natriuretic and kaliuretic responses to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area. *Neurosci Lett* **123**, 195-198.
32. Mata A, Marques D, Martinez-Burgos MA, Silveira J, Marques J, Mesquita MF, Pariente JA, Salido GM, & Singh J (2008). Effect of hydrogen peroxide on secretory response,

calcium mobilisation and caspase-3 activity in the isolated rat parotid gland. *Mol Cell Biochem* **319**, 23-31.

33. McCord JM & Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055.

34. McKinley MJ & Johnson AK (2004). The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. *News Physiol Sci* **19**, 1-6.

35. Meibach RC & Siegel A (1977). Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res* **119**, 20.

36. Menani JV, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, & Colombari E (1990). The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosci Lett* **113**, 339-344.

37. Morgan JJ & Curran T (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* **14**, 421-451.

38. Negro-Vilar A, Gentil CG, & Covian MR (1967). Alterations in sodium chloride and water intake after septal lesions in rats. *Physiol Behav* **2**, 167-170.

39. Oldfield BJ, Badoer E, Hards DK, & McKinley MJ (1994). Fos Production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II. *Neuroscience* **60**, 255-262.

40. Oldfield BJ, Hou-Yo A, & Silverman AJ (1985). 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* **231**, 222-233.

41. Paulin RF, Menani JV, Colombari E, De Paula PM, & Colombari DS (2009). Role of the medial septal area on pilocarpine-induced salivary secretion and water intake. *Brain Res*.

42. Paxinos G & Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Inc, San Diego.

43. Penny ML, Bruno SB, Cornelius J, Higgs KAN, & Cunningham JT (2005). The effects of osmotic stimulation and water availability on c-Fos and FosB staining in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Exp Neurol* **194**, 191-202.

44. Pinguero E, ., & . Efeitos da injeção central de peróxido de hidrogênio sobre a sede e apetite ao sódio e sobre a excreção urinária. 2008.

Ref Type: Thesis/Dissertation

45. Polson JW, Potts PD, Li YW, & Dampney RAL (1995). Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla after sustained hypertension in conscious rabbits. *Neuroscience* **67**, 107-123.

46. Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, & Kang SW (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* **14**, S211-S215.

47. Rouse ST & Levey AI (1996). Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents. *J Comp Neurol* **375**, 406-416.
48. Saad WA, Camargo LA, Silva-Netto CR, Gentil CG, Antunes-Rodrigues J, & Covian MR (1976). Natriuresis, kaliuresis and diuresis in the rat following microinjections of carbachol into the septal area. *Pharmacol Biochem Behav* **3**, 985-992.
49. Swanson LW & Cowan WM (1979). The connections of the septal area in the rat. *J Comp Neurol* **186**, 621-656.
50. Swanson LW & Sawchenko PE (1980). Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* **31**, 410-417.
51. Swanson LW & Sawchenko PE (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* **6**, 269-324.
52. Tanaka J, Saito H, & Seto K (1988). Involvement of septum in the regulation of paraventricular vasopressin neurons by the subfornical organ in the rat. *Neurosci Lett* **92**, 187-191.
53. Thinschmidt JS, Frazier CJ, King MA, Meyer EM, & Papke RL (2005). Medial septal/diagonal band cells express multiple functional nicotinic receptor subtypes that are correlated with firing frequency. *Neurosci Lett* **389**, 163-168.

54. Toney GM, Chen QH, Cato MJ, & Stocker SD (2003). Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* **177**, 43-55.
55. Urzedo-Rodrigues LS, Depieri T, Cherobino AJ, Lopes OU, Menani JV, & Colombari DS (2011). Hypothalamic disconnection caudal to paraventricular nucleus affects cardiovascular and drinking responses to central angiotensin II and carbachol. *Brain Res* **1388**, 100-108.
56. Weinberg ED (1990). Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev* **22**, 531-579.
57. Zimmerman MC & Davisson RL (2004). Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **84**, 125-149.
58. Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, & Davisson RL (2002). Superoxide Mediates the Actions of Angiotensin II in the Central Nervous System. *Circ Res* **91**, 1038-1045.
59. Zoccarato F, Cavallini L, Deana R, & Alexandre A (1990). 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* **282**, 244-247.
60. Zoccarato F, Valente M, & Alexandre A (1995). Hydrogen peroxide induces a long-lasting inhibition of the Ca(2+)-dependent glutamate release in cerebrocortical synaptosomes without interfering with cytosolic Ca²⁺. *J Neurochem* **64**, 2552-2558.