

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

“Subtipos de receptores colinérgicos centrais envolvidos na salivação,
ingestão de água e resposta pressora induzidas pela
pilocarpina injetada perifericamente”

Thais Leoni Borella

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

São Carlos
2008

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

B731sr

Borella, Thais Leoni.

Subtipos de receptores colinérgicos centrais envolvidos na salivação, ingestão de água e resposta pressora induzidas pela pilocarpina injetada perifericamente / Thais Leoni Borella. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
67 f.

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

1. Pilocarpina. 2. Salivação. 3. Ingestão de água. 4. Pressão arterial – regulação. I. Título.

CDD: 619.93 (20ª)

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

Defesa de Dissertação de Thais Leoni Borella

Prof. Dr. José Vanderlei Menani.....

Prof. Dr. João Carlos Callera.....

Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade.....

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

“Subtipos de receptores colinérgicos centrais envolvidos na salivação, ingestão de água e resposta pressora induzidas pela pilocarpina injetada periféricamente”

Thais Leoni Borella

Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

Apoio financeiro: FAPESP e CNPq
Bolsa de Mestrado: FAPESP

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. José Vanderlei Menani, pela paciência, carinho e confiança depositado em mim e por minha eterna admiração pelo seu sábio conhecimento científico e pela oportunidade de estar ingressando a uma pós-graduação e pela sua orientação.
- À todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pela dedicação às disciplinas ministradas, em especial aos professores do departamento, Laurival, Débora, Patrícia, Renzi e José Eduardo.
- Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela amizade e por todo o conhecimento adquirido com cada um em especial.
- A todos os funcionários do laboratório de fisiologia, Silas P. Barbosa, Reginaldo C. Queiroz, Sílvia Fógliã e Silvana A. D. Malavolta e Ana Victor por terem me auxiliado na realização dessa dissertação.
- A todos que contribuíram meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Agradeço a Deus por mais uma conquista em minha vida.
- A meus pais, principalmente a minha querida mãezinha, que sempre me ensinaram a batalhar por um futuro melhor e próspero. Pelos conselhos e apoio nos momentos em que mais precisei deles. Muito obrigada por vocês sempre estarem compartilhando de minhas conquistas e alegrias.
- Aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram. Obrigada pela nossa amizade.

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS	21
1- Animais	21
2- Implante de cânula cerebral	21
3- Injeção central	22
4- Drogas utilizadas.....	22
5- Coleta da saliva.....	23
6- Medida da ingestão de água	24
7- Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	24
8- Determinação da expressão de c-fos	24
9- Histologia para localização das injeções no VL	26
10- Análise estatística.....	26
PROCOLOS EXPERIMENTAIS EXECUTADOS.....	27
1- Efeitos da injeção icv dos antagonistas colinérgicos muscarínicos sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip.....	27
2- Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos na ingestão de água induzida pela pilocarpina ip.....	27
3- Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos sobre a resposta pressora produzida pela pilocarpina iv.....	28
4- Efeitos da injeção icv de 4-DAMP sobre a expressão da proteína c-fos produzida pela injeção de pilocarpina ip.	28
RESULTADOS	30
1. Efeitos da injeção icv dos antagonistas colinérgicos muscarínicos sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip.....	30
2. Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos na ingestão de água induzida pela pilocarpina ip.....	33
3. Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos na resposta pressora induzida pela pilocarpina iv.	38
4- Alterações da expressão da proteína c-fos em algumas áreas prosencefálicas produzida pela injeção de pilocarpina ip.	45
DISCUSSÃO	50
REFERÊNCIAS	60

ABREVIATURAS

ASL = área septal lateral

ASM = área septal medial

FC = frequência cardíaca

iv = endovenosa

ip = intraperitoneal

metoc = metocramina

MnPO = núcleo pré-óptico mediano

OVLT = órgão vasculoso da lâmina terminal

PAM = pressão arterial média

pirenz = pirenzepina

PVNm = núcleo paraventricular magnocelular

PVNp = núcleo paraventricular parvocelular

SON = núcleo supra-óptico do hipotálamo

SFO = órgão subfornicial

trop = tropicamide

VL = ventrículo lateral

RESUMO

O estudo de substâncias sialagogas tem interesse clínico pela utilidade que elas têm em pacientes com reduzida secreção salivar. Entre essas substâncias destacam-se os agonistas colinérgicos e entre esses, um dos mais importantes é a pilocarpina. Embora uma ação direta da pilocarpina em receptores colinérgicos muscarínicos das glândulas salivares estimulando a secreção salivar seja um mecanismo bastante aceitável e que parece adequado, estudos mais recentes de nosso laboratório têm demonstrado que grande parte da salivação induzida pela injeção mesmo periférica de pilocarpina parece depender da ativação de receptores muscarínicos cerebrais. Embora um dos efeitos mais conhecidos da pilocarpina seja a intensa salivação, injetada perifericamente em doses baixas ela também produz efeitos cardiovasculares e induz ingestão de água. Apesar dos agonistas muscarínicos injetados perifericamente usualmente reduzirem a resistência periférica e a pressão arterial, a injeção intraperitoneal (ip) de pilocarpina induz uma inesperada resposta pressora de longa duração, que está associada a um aumento da resistência vascular mesentérica, vasodilatação nas glândulas salivares, mas sem mudanças na resistência vascular da musculatura esquelética ou na frequência cardíaca. Essa resposta pressora da pilocarpina injetada ip também é atribuída a uma ação central.

A proposta do presente estudo foi investigar os subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos centrais envolvidos na salivação, ingestão de água e

nas respostas pressoras induzidas pela injeção ip ou intravenosa (iv) de pilocarpina em ratos. Adicionalmente, as áreas cerebrais ativadas pela pilocarpina injetada ip, assim como os subtipos de receptores muscarínicos centrais envolvidos na ativação das áreas cerebrais foram investigados utilizando-se a expressão da proteína c-fos. Para tal estudo foram utilizados ratos Holtzman (250 - 350 gramas) com cânulas de aço inoxidável implantadas no ventrículo lateral (VL) nos quais foram investigados os efeitos da injeção prévia no VL de pirenzepina (antagonista muscarínico M₁), metoctramina (antagonista muscarínico M₂ e M₄), 4-DAMP (antagonista muscarínico M₁ e M₃) e tropicamide (antagonista muscarínico M₄) sobre a salivação, ingestão de água e respostas pressoras induzidas pela injeção ip ou iv de pilocarpina (4 μmol/kg de peso corporal). A salivação foi determinada em ratos anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal) utilizando-se bolas de algodão previamente pesadas colocadas na cavidade oral durante 7 minutos. A pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas em ratos não anestesiados submetidos a canulação prévia da artéria femoral. A expressão de c-fos nas áreas centrais foi investigada após a injeção ip de pilocarpina sozinha ou combinada com o pré-tratamento com o antagonista 4-DAMP que se mostrou mais eficiente em bloquear os efeitos da pilocarpina na salivação, ingestão de água e respostas cardiovasculares. A salivação induzida pela pilocarpina ip variou de 476 ± 54 a 718 ± 61 mg/7 min e foi reduzida apenas pelo pré-tratamento icv com 4-DAMP (25, 50, 100 e 250 nmol) com variações de 425,13 ± 89,73; 376,76 ± 28,01; 261,00 ± 38,28 e 230,85 ± 68,61 mg/7 min, respectivamente. A resposta dipsogênica induzida pela injeção ip pilocarpina que variou de 3,2 ± 0,74 a 5,93 ± 1,34 ml/60 min foi reduzida pela injeção icv

de 0,1 e 1,0 nmol de pirenzepina ($0,77 \pm 0,30$ and $1,05 \pm 0,54$ ml/60 min, respectivamente), 50 nmol de metoctramina ($0,89 \pm 0,30$ ml/60 min) ou 5 e 10 nmol de 4-DAMP ($1,43 \pm 0,57$ e $2,19 \pm 0,66$ ml/60 min, respectivamente). A resposta pressora induzida pela pilocarpina iv teve uma variação de 40 ± 5 a 53 ± 4 mmHg e foi reduzida pelo pré-tratamento de 100 nmol de pirenzepina ($9,00 \pm 7,00$ mmHg) ou 25 e 50 nmol de 4-DAMP ($14,00 \pm 7,00$ e $3,00 \pm 6,00$ mmHg, respectivamente) injetados no VL.

Após a injeção ip de pilocarpina ocorreu aumento da expressão da proteína fos no núcleo supra-óptico, mas não em outras áreas prosencefálicas como área septal lateral (ASL), área septal medial (ASM), núcleo paraventricular (PVN), núcleo subfornicial (SFO), órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano (MnPO). O aumento da expressão de c-fos no núcleo supra-óptico produzida pela injeção ip de pilocarpina foi de $12,8 \pm 2,4$ células c-fos positivas/ 10^{-2} mm² e este aumento foi reduzido pelo prévio tratamento com 25 nmol de 4-DAMP ($3,26 \pm 1,62$ células c-fos positivas/ 10^{-2} mm²).

Os resultados sugerem que ocorre o envolvimento de receptores muscarínicos centrais M₃ na salivação induzida pela pilocarpina. Os receptores muscarínicos centrais M₁ e M₂ estariam envolvidos na ingestão de água e os receptores centrais M₁ estariam envolvidos na resposta pressora. O envolvimento dos receptores muscarínicos M₃ nas respostas dipsogênica e pressora não é claro devido ao 4-DAMP ser um antagonista para receptores M₁ e M₃. Sugere-se também que as respostas apresentadas pela injeção de pilocarpina periférica (4 µmol/kg de peso corporal) seriam decorrência da ativação do núcleo supra-óptico (SON).

ABSTRACT

The study of sialagog drugs has a relevant clinical interest for its use in patients with reduced salivatory secretion. Cholinergic agonists are a type of sialagog drug and pilocarpine is the most important cholinergic agonist drug. It is known that pilocarpine-direct action in salivatory glands muscarinic cholinergic receptors stimulate salivatory secretion. However, recent studies from our laboratory have shown that salivation induced by periferic pilocarpine seems to be dependent from central muscarinic activation. The pilocarpine-intense salivation is the well known main effect of this drug but side effects as cardiovascular alterations and dipsogenesis are observed. Periferic injection of muscarinic agonists usually decreases periferic resistance and arterial pressure but pilocarpine-intraperitoneal (ip) injection induces an inesperate long-term pressor response associated with enhancement in mesenteric vascular resistance and salivatory glands vasodilatation, without changes in esqueletic musculature vascular resistance or heart rate. The ip pilocarpine-pressor response is atributed to an central action of this sialagog drug.

The aim of the present study was to investigate central muscarinic cholinergic receptors subtype involved in salivation, water intake and pressor response induced by ip or intravenous (iv) pilocarpine injection. In addition, the central activation induced by ip injection of pilocarpine and muscarinic receptors subtype antagonist were investigated by Fos-immunoreactivity (Fos-ir). Adult male Holtzman rats (250-300 g) with stainless steel cannulas implanted in the lateral ventricle (LV) were used. Intracerebroventricular (icv) injection of pirenzepine (M₁

subtype muscarinic receptor), methoctramine (M_2/M_4 subtype muscarinic receptor), 4-DAMP (M_1/M_3 subtype muscarinic receptor) or tropicamide (M_4 subtype muscarinic receptor) was performed to investigate its effect on salivation, water intake and pressor response-induced pilocarpine ip injection ($4 \mu\text{mol/kg}$ of body weight (bw)). The salivation was determined in ketamine- (100 mg/kg bw) anesthetized rats using previous weighted cotton balls into oral cavity for 7 minutes. Arterial pressure and heart rate were recorded in non-anesthetized rats submitted to previous femoral artery cannulation. Fos-ir was investigated after ip injection of only pilocarpine or pilocarpine combined with pre-treatment of 4-DAMP, M_1/M_3 subtype muscarinic antagonist which was more efficient to block salivatory, dipsogenic and cardiovascular responses induced by ip pilocarpine. Salivatory response due to ip pilocarpine varied between 476 ± 54 to $718 \pm 61 \text{ mg/7 min}$ and was reduced by icv injection of 25, 50, 100 and 250 nmol 4-DAMP, respectively: 425.13 ± 89.73 , 376.76 ± 28.01 , 261.00 ± 38.28 , $230.85 \pm 68.61 \text{ mg/7 min}$. Icv injection of 0.1 and 1.0 nmol pirenzepine (0.77 ± 0.30 and $1.05 \pm 0.54 \text{ ml/60 min}$, respectively), 50 nmol methoctramine ($0.89 \pm 0.30 \text{ ml/60 min}$) or 5 and 10 nmol 4-DAMP (1.43 ± 0.57 and $2.19 \pm 0.66 \text{ ml/60 min}$, respectively) reduced dipsogenic effect-induced ip pilocarpine, which ranged between 3.20 ± 0.70 to $5.90 \pm 1.30 \text{ ml/60 min}$. The pressor response-induced by ip pilocarpine varied between 40 ± 5 to $53 \pm 4 \text{ mmHg}$ and was decreased by icv injection of 100 nmol pirenzepine ($9.00 \pm 7.00 \text{ mmHg}$) or 25 and 50 nmol 4-DAMP (14.00 ± 7.00 and $3.00 \pm 6.00 \text{ mmHg}$, respectively). Pilocarpine increased Fos-ir only in the supra-optic nuclei (SON), but not in other encephalic areas such as septal or medial lateral areas, paraventricular nuclei, subfornical nuclei, organum vasculosum of lamina terminalis, median pre-optic nuclei had not alter its activation. The enhancement on

Fos-ir in the SON induced by pilocarpine (12.8 ± 2.4 positive cell nuclei/ 10^{-2} mm²) was reduced by pre-treatment with 25 nmol 4-DAMP (3.26 ± 1.62 positive cell nuclei/ 10^{-2} mm²).

Taken all together, M₃ subtype central muscarinic receptor plays a role in salivation, M₁ and M₂ subtype central are involved in dipsogenic and M₁ subtype central is involved in pressor response induced by pilocarpine. The role of central muscarinic receptor M₃ subtype on dipsogenic and pressor response is not clear due to the fact 4-DAMP is not a specific antagonist, that binds M₁ and M₃ subtype muscarinic receptors. In addition, these results suggest that responses evoked by periferic injection of 4 µmol/kg bw of pilocarpine could occur due to its activation through SON.

INTRODUÇÃO

Apesar da provável secreção espontânea pelas glândulas salivares (Garret e Anderson, 1991), a secreção salivar é reconhecidamente controlada pelo sistema nervoso autônomo por meio da ativação de receptores autonômicos das glândulas, sejam eles colinérgicos muscarínicos ou adrenérgicos alfa ou beta, (Norberg e cols., 1965; Elverdin e cols., 1984; Moreno e cols., 1986; Baun, 1987; Emmelin, 1987; Garret, 1987; Jensen e cols., 1991; Izumi e cols., 1994; Izumi e cols., 1995). A ativação simpática causa vasoconstrição nas glândulas, secreção pelas células acinares e contração das células mioepiteliais, resultando em pequeno volume de secreção, mas rico em proteínas (Garret, 1987; Bradley, 1991), enquanto a ativação da inervação parassimpática para as glândulas salivares causa vasodilatação, secreção aquosa em grande quantidade pelas células acinares e contração das células mioepiteliais resultando em grande volume de saliva, porém com baixa concentração de proteínas (Garret, 1987; Bradley, 1991; Izumi e cols., 1994).

Substâncias que podem estimular a secreção salivar apresentam interesse clínico pela utilidade em pacientes com reduzida secreção salivar. Essas substâncias geralmente são agonistas colinérgicos que podem atuar ativando diretamente os mecanismos colinérgicos das glândulas salivares e entre elas uma das mais importantes é a pilocarpina (Ferguson, 1993). Embora uma ação direta da pilocarpina em receptores das glândulas salivares, estimulando a secreção salivar seja um mecanismo bastante aceitável e que parece adequado, estudos mais recentes de nosso laboratório têm demonstrado que grande parte da

salivação induzida pela injeção mesmo periférica de pilocarpina parece depender de mecanismos cerebrais. As evidências para a participação de mecanismos centrais na salivação induzida pela pilocarpina são: 1) a injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina também produz salivação (Renzi e cols., 1993, Cecanho e cols., 1999); 2) a salivação, induzida pela injeção icv ou intraperitoneal (ip) de pilocarpina é inibida pela lesão de estruturas centrais como a região anteroventral do terceiro ventrículo (região AV3V), área septal (AS) ou hipotálamo lateral (HL) (Renzi e cols., 1993; Renzi, 1994; Renzi e cols., 2002); 3) a injeção icv do antagonista muscarínico atropina metilada em doses que produzem efeitos exclusivamente centrais quase aboliu a salivação induzida pela pilocarpina injetada ip (Takakura e cols., 2003). Além disso, a injeção periférica do bloqueador ganglionar hexametônio ou de antagonistas adrenérgicos reduz a salivação produzida pela injeção icv de pilocarpina, sugerindo, também, a participação do sistema simpático nos efeitos da pilocarpina na secreção salivar (Cecanho e cols., 1999). A salivação induzida pela pilocarpina ip também foi reduzida pela injeção icv, mas não periférica do agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos moxonidina, (Moreira e cols., 2001). Todos esses resultados são consistentes com a habilidade da pilocarpina cruzar a barreira hemato-encefálica (Freedman e cols., 1989).

Embora um dos efeitos mais conhecidos da pilocarpina seja a intensa salivação, em doses baixas ela também produz efeitos cardiovasculares e comportamentais como ingestão de água. Com relação aos efeitos cardiovasculares, é bem conhecido que o tratamento com agonistas colinérgicos muscarínicos periféricamente usualmente reduz a resistência periférica e a pressão arterial (Feigl, 1975). Porém, a injeção ip de pilocarpina induz uma

inesperada resposta pressora de longa duração que está associada a um aumento da resistência vascular mesentérica, vasodilatação nas glândulas salivares, mas sem mudanças na resistência vascular da musculatura esquelética ou na frequência cardíaca (Moreira e cols., 2003; Takakura e cols., 2005). A pilocarpina injetada icv ou intravenosa (iv) similar à injeção ip também induz resposta pressora e aumenta a resistência vascular mesentérica, com a diferença que a injeção iv produz uma resposta hipotensora transitória com duração de menos de 1 minuto (Moreira e cols, 2002; Takakura e cols, 2004). Por outro lado, em ratos com lesão da região AV3V, a injeção ip de pilocarpina ao invés de aumentar a pressão arterial produz hipotensão (Takakura e cols, 2005), o que levanta a possibilidade da pilocarpina atuar centralmente também para produzir respostas cardiovasculares. A ativação de receptores colinérgicos muscarínicos centrais e periféricos produzem efeitos opostos sobre o sistema cardiovascular. A ativação de receptores muscarínicos localizados no sistema cardiovascular produz vasodilatação e hipotensão, enquanto a ativação de receptores muscarínicos centrais podem causar vasoconstrição e respostas pressoras devido à ativação simpática e liberação de vasopressina, (Hoffman e cols, 1977; Imai e cols, 1989). Além da ação periférica, pilocarpina injetada ip poderia atravessar a barreira hemato-encefálica (Freedman e cols, 1989) e agindo em receptores muscarínicos centrais pode induzir respostas pressoras. A lesão da região AV3V provavelmente prejudica o mecanismo pressor ativado pela pilocarpina, deixando intacto somente o mecanismo periférico responsável pela hipotensão produzida pela pilocarpina ip em ratos com lesão da região AV3V. Essa conclusão foi comprovada utilizando o tratamento com o antagonista colinérgico muscarínico metil brometo de atropina que tem dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica quando injetado

intravenosamente (iv) em ratos com lesão fictícia ou lesão AV3V (Ghelardini e cols, 1990; Pertwee e col, 1991). O metil brometo de atropina injetado iv bloqueando os receptores muscarínicos periféricos aboliu a hipotensão produzida pela pilocarpina ip em ratos com lesão AV3V, enquanto que a resposta pressora à pilocarpina nos ratos com lesão fictícia que depende da ativação de receptores muscarínicos centrais não foi afetada, sugerindo que a pilocarpina injetada ip pode ativar diferentes mecanismos cardiovasculares (Takakura e cols., 2005). Embora a pilocarpina ip possa ativar simultaneamente tanto mecanismos centrais como periféricos, os mecanismos pressores centrais são predominantes nos ratos. A vasodilatação das glândulas salivares produzida pela injeção ip de pilocarpina, porém parece não depender da região AV3V. Embora ainda não se possa descartar a participação de mecanismos centrais na vasodilatação das glândulas salivares produzida pela pilocarpina ip, é possível que essa vasodilatação dependa de uma ação da pilocarpina diretamente nas glândulas salivares, (Takakura e cols., 2005).

De acordo com estudos anteriores, a importância de mecanismos centrais para a salivação induzida pela pilocarpina ip está bem definida (Renzi e cols., 1993; Sanchez e Meier, 1993; Renzi e cols., 2002). Por outro lado, a salivação depende da ativação de mecanismos secretórios e também do aumento de fluxo sanguíneo para as glândulas salivares (Anderson e cols., 1998). Portanto redução na salivação pode ocorrer se um dos mecanismos citados for afetado. A ativação de receptores α_2 centrais pela injeção icv de moxonidina abole a vasodilatação e reduz a salivação induzida pela pilocarpina (Moreira e cols., 2001; Moreira e cols., 2003). Embora a pilocarpina possa induzir vasodilatação das glândulas salivares em ratos com lesão da região AV3V, o fluxo sanguíneo das glândulas salivares foi

reduzido nos ratos com lesão AV3V tratados com pilocarpina ip, provavelmente em consequência da intensa redução da pressão arterial que a pilocarpina produziu nesses animais (Takakura e cols., 2005). Portanto, parece que as alterações hemodinâmicas produzidas pela lesão AV3V podem contribuir para a redução da salivação induzida pela pilocarpina em ratos com lesão AV3V. Entretanto, ainda não se pode concluir se a redução do fluxo sanguíneo é o único mecanismo responsável pela intensa redução da salivação induzida pela pilocarpina em ratos com lesão AV3V.

Os receptores colinérgicos são divididos em receptores nicotínicos e muscarínicos. Para os receptores muscarínicos são reconhecidos pelo menos cinco genes que codificam esses receptores (Brann e cols., 1993), que são subdivididos em M_1 a M_5 , dos quais quatro (M_1 a M_4) se expressam no cérebro do rato produzindo proteínas distintas (Messer e cols., 1989; Tice e cols., 1996; Zubieta e Frey, 1993). esses receptores podem ser pré ou pós- sinápticos e pertencem à família de receptores acoplados a proteína G, mas dependendo do subtipo de receptor ocorre a ativação de diferentes segundos mensageiros, ou seja, ativando receptores M_1 ocorre um aumento do inositoltrifosfato (IP3) e do diacilglicerol (DAG) e aumento da condutância ao potássio, os recetores M_2 assim como os receptores M_4 , quando ativados, ocorre um aumento na inibição do AMP cíclico, diminuição da condutância ao cálcio e aumento da condutância ao potássio, os receptores M_3 aumentam a estimulação ao IP3 e a concentração de cálcio intracelular (Goyal, 1989). A pilocarpina tem diferentes afinidades pelos diferentes subtipos de receptores muscarínicos, mas dependendo da dose pode estimular qualquer um deles (Mayorga e cols., 1998).

Sabe-se que os receptores M_2 cardíacos estão envolvidos com a bradicardia e os receptores M_3 do endotélio vascular participam da vasodilatação produzida pela estimulação colinérgica periférica. A salivação induzida pelo administração dos agonistas colinérgicos SNI-2011 e McN-A-343 é atribuída a uma ativação dos receptores M_3 das glândulas salivares, (Iwabuchi e cols., 1994). Já foi também sugerido que a salivação induzida pela pilocarpina seria dependente da ativação simpática para as glândulas salivares devido sua ação em receptores M_1 do gânglio superior cervical (Nakamura e Masuhara, 1989).

A ingestão de água pela estimulação colinérgica muscarínica central é um efeito bem conhecido cujos mecanismos são razoavelmente bem estabelecidos (Grossman, 1960; Fisher e Coury, 1962; Levitt e Fisher, 1966; Giardina e Fisher, 1971; Menani e cols., 1990; Rowland e cols., 2003). Por outro lado os mecanismos envolvidos na ingestão de água induzida pela administração periférica de agonistas muscarínicos ainda não são totalmente claros. Uma hipótese aceita é que a ingestão de água que ocorre após a administração periférica de agonistas muscarínicos seria uma decorrência da ativação do sistema renina-angiotensina que é produzida pela hipotensão causada pela vasodilatação induzida pela ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos periféricos (Rowland e cols., 2003; Gay, 1976; Fregly e cols., 1982). Essa hipótese poderia se aplicar no caso de agonistas muscarínicos que produzam hipotensão, mas certamente não se aplicaria no caso da pilocarpina que ao invés de hipotensão induz aumento da pressão arterial. No caso da pilocarpina é bastante provável que a ingestão de água seja devida a uma estimulação direta de receptores colinérgicos muscarínicos centrais, assim como sugerido para a resposta pressora e salivação. É bem conhecido que a administração da agonistas colinérgicos muscarínicos

como carbacol e betanecol centralmente induz intensa ingestão de água que é completamente bloqueada pelo tratamento prévio com o antagonista muscarínico inespecífico atropina (Grossman, 1960; Fisher e Coury, 1962; Levitt e Fisher, 1966; Giardina e Fisher, 1971; Rowland e cols., 2003). Além disso, a ingestão de água induzida pela injeção icv de carbacol ou de betanecol foi parcialmente reduzida pela injeção também icv prévia do antagonista de receptores muscarínicos M_1 pirenzepina ou do antagonista de receptores M_1/M_3 4-DAMP (Massi e cols., 1989; Polidori e cols., 1990; Rowland e cols., 2003). A administração icv combinada de pirenzepina + 4-DAMP aboliu a ingestão de água induzida pelo betanecol icv, sugerindo que a ingestão de água induzida por betanecol dependeria da ativação de receptores M_1 e/ou M_3 , (Rowland e cols., 2003). A injeção icv de betanecol também induziu o aumento da expressão da proteína fos no órgão subfornical, nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, núcleo preóptico mediano e amígdala (Rowland e cols., 2003). Embora a combinação de injeções icv de pirenzepina + 4-DAMP tenha abolido a ingestão de água induzida pelo betanecol icv, a expressão de c-fos foi apenas parcialmente reduzida pela combinação de pirenzepina + 4-DAMP, o que sugere que outros subtipos de receptores muscarínicos possam também estarem envolvidos no aumento de c-fos produzido pelo tratamento com betanecol. A expressão de c-fos remanescente após a combinação de injeções de pirenzepina + 4-DAMP provavelmente se deve à atividade neural relacionada com outras respostas produzidas pela estimulação colinérgica que não seja sede, (Rowland e cols., 2003). A resposta pressora produzida pela injeção intracisternal de acetilcolina em cães é mediada pela ativação de receptores M_1 (Pelat e cols., 1999). A resposta pressora produzida pela injeção icv de carbacol foi reduzida

pelo bloqueio dos receptores M_1 do núcleo central da amígdala (Aslan e cols., 1997).

Portanto o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da administração icv de diferentes antagonistas de receptores muscarínicos (M_1 - pirenzepina; M_2 e M_4 - metoctramina tetrahydrochloride; M_1 e M_3 - 4-DAMP methiodide; M_4 - tropicamide) sobre a salivação, ingestão de água e a resposta pressora induzidas pela administração periférica de pilocarpina em ratos. Adicionalmente utilizando-se a detecção por imunohistoquímica da expressão da proteína c-fos foram também investigadas as áreas centrais que são ativadas pela pilocarpina injetada ip e a possível mudança na ativação dessas áreas pelo pré-tratamento com o antagonista que se mostrou mais eficiente em bloquear os efeitos da pilocarpina na salivação, ingestão de água e respostas cardiovasculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, adultos, com peso variando entre 250 e 350 gramas, procedentes do biotério do Câmpus de Araraquara UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com acesso livre à água e ração Guabi (Paulínia, SP), foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C) e com iluminação das 7:30 às 20:00 h. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética na experimentação animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, processo nº 03/2006.

2- Implante de cânula cerebral

Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nesses pontos foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para o VL, cânulas de 10 x 0,5 mm d.i. foram orientadas de acordo com as seguintes coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,5 mm lateral à linha mediana e 4,0 mm abaixo da dura-máter.

As cânulas foram fixadas à superfície do crânio por meio de acrílico autopolimerizável preso a dois parafusos atarraxados no crânio. Uma dose

profilática de antibiótico (penicilina 50.000 UI) foi injetada intramuscularmente antes do início da cirurgia.

3- Injeção central

As injeções no VL foram feitas com uma seringa Hamilton (10 µl) conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE 10), a uma cânula injetora de aço inoxidável com 0,3 mm de diâmetro e 12 mm de comprimento. As drogas injetadas no VL foram dissolvidas em solução salina fisiológica, com exceção do 4-DAMP, nas doses acima de 100 nmol/1 µl, que foi dissolvido em DMSO. O volume injetado no VL foi de 1 µl.

4- Drogas utilizadas

As drogas que foram injetadas são:

- Pilocarpina (Sigma, USA) - agonista colinérgico muscarínico, na dose de 4 µmol/kg de peso corporal foi injetada ip ou iv;
- Pirenzepina (Sigma, USA) - antagonista colinérgico muscarínico M₁, nas doses de 0,05 a 500 nmol/1 µl foi injetada icv;
- Metoctramina tetrahidrocloreto (RBI, USA) - antagonista colinérgico muscarínico M₂/M₄, nas doses de 10 a 500 nmol/1 µl foi injetada icv;
- 4-DAMP metiodide (RBI, USA) - antagonista colinérgico muscarínico M₁/M₃, nas doses de 2,5 a 250 nmol/1 µl foi injetado icv;
- Tropicamida (RBI, USA) - antagonista colinérgico muscarínico M₄, na dose de 500 nmol/1 µl foi injetada icv.

Os antagonistas foram injetados icv sempre 15 minutos antes da pilocarpina ou salina perifericamente. Para cada dose dos antagonistas que foram estudadas

foi utilizado um grupo de animais, sendo que, no primeiro experimento, metade dos animais recebeu injeção de salina + pilocarpina e a outra metade a combinação do antagonista + pilocarpina. No experimento seguinte, nos mesmos animais, o protocolo foi invertido. No final todos os animais do grupo receberam os dois tratamentos. A opção de se realizar apenas dois experimentos em cada animal deve-se à intensa taquifilaxia que ocorre com injeções periféricas de pilocarpina na salivação e na ingestão de água.

Os estudos foram realizados utilizando-se grupos de 10 animais, mas como o aproveitamento de cada animal estudado dependia da histologia final demonstrando que injeção cerebral estava no local correto, eventualmente houve necessidade de se repetir os mesmos protocolos mais de uma vez em outros animais até que se conseguisse um número de animais adequados para análise (6 a 8 animais por tratamento).

5- Coleta da saliva

Em ratos anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal), foram injetados icv os antagonistas muscarínicos específicos ou veículo e 15 minutos após foi injetada pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal) ip. Dez minutos após a injeção de pilocarpina, toda a saliva existente na cavidade oral foi removida com auxílio de algodão e logo em seguida 4 pequenas bolas de algodão previamente pesadas foram colocadas na cavidade oral: 2 sob a língua e 2 bilateralmente entre os dentes e a mucosa oral. Após 7 minutos, as bolas de algodão foram removidas e pesadas novamente. Para a pesagem foi utilizada uma balança Mettler-Toledo (modelo AG 204) com precisão de pesagem de 0,0001 g. A salivação foi calculada pela diferença de peso das bolas de algodão e expressa em mg/7min.

6- Medida da ingestão de água

A ingestão de água foi medida a cada 15 min durante uma hora iniciando-se imediatamente após a injeção ip de pilocarpina (4 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal). Para a medida da ingestão de água foram utilizados buretas de vidro de 25 ml com divisão de 0,1 ml adaptadas com bico metálico para ingestão de água. Os antagonistas muscarínicos específicos foram injetados icv 15 minutos antes da pilocarpina ip.

7- Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados submetidos à canulação prévia (um dia antes do registro) da artéria femoral. Para a canulação os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal). A canulação consistiu na introdução de um tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50), pela artéria femoral até alcançar a aorta abdominal. Conduzido subcutaneamente, o tubo PE 50 foi exteriorizado pelo dorso do animal. No dia seguinte, o tubo PE 50 foi conectado com um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) acoplado a um amplificador (ETH 200) e a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab). A veia femoral também foi canulada com tubo de PE 10 conectado com PE 50 e exteriorizada pelo dorso do animal para injeções iv.

8- Determinação da expressão de c-fos

Duas horas após a injeção ip de pilocarpina (4 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) ou salina, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg de peso

corporal) e em seguida perfundidos sob gravidade, com salina em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) por um período de 5 min antes da perfusão com paraformaldeído (PFA) 4% que foi de 10 min. O cérebro foi removido e mantido numa solução de PFA 4% por 4 a 6 h em temperatura ambiente. A seguir, o cérebro foi transferido para uma solução de sacarose 20% (diluída em tampão fosfato) no qual foi mantido por 12 h na geladeira. Após a execução de todas estas etapas, os cérebros foram cortados transversalmente (50 µm de espessura) em criostato.

Os cortes obtidos foram lavados uma vez com salina tamponada 0,1 M, durando 5 min a lavagem. Foram transportados para uma solução contendo o soro bloqueador (Vector Laboratories), salina tamponada 0,1 M e o anticorpo c-fos (Santa Cruz Biotechnology, 1:4.000 em soro de cabra 4% e Triton X-100 0,02%), ficando sob agitação por um período de 22 horas na temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes com salina tamponada 0,1 M. Em seguida, foram transportados para outra solução contendo soro bloqueador salina tamponada 0,1 M e o anticorpo secundário anti-coelho biotinilado (1:400, Vector Laboratories). Ficando sob agitação branda por 1 h na temperatura ambiente.

Foram feitas novas lavagens dos cortes (três vezes) com salina tamponada 0,1 M. Após as lavagens, os cortes foram transferidos para a solução ABC (Vectastain Elite – ABC Kit, Vector Laboratories) ficando sob agitação suave por 1 h na temperatura ambiente. Após 1 h, os cortes foram novamente lavados em salina tamponada (três vezes). Os cortes foram colocados na solução de diaminobenzidina (DAB – 0,2 mg/ml em PBS 0,1 M)+ peróxido de hidrogênio a 0,012% por um período de 10 min e então lavados duas vezes em salina tamponada 0,1 M para parar a reação de cor.

Os cortes foram montados em lâminas e deixados para secar 12 h. Foram, então, desidratados e cobertos com lamínulas.

9- Histologia para localização das injeções no VL

Após os experimentos, os animais foram perfundidos com formalina 10% através do ventrículo cardíaco esquerdo, sob anestesia profunda com tiopental de sódio (60 mg/kg de peso corporal).

Os cérebros foram retirados, fixados em formalina 10%, cortados em micrótomo de congelamento, em cortes de 50 μ m de espessura, corados pelo método de Giemsa e analisados ao microscópio para localização da injeção cerebral.

Apenas os animais com injeção no ventrículo lateral foram considerados válidos para análise.

10- Análise estatística

Os resultados foram tabelados e representados em gráficos como média \pm erro padrão da média. Teste de Student-Newman-Keuls precedido de análise de variância (ANOVA) foi usado para comparações entre as médias. Os resultados de salivação, respostas cardiovasculares e expressão de c-fos foram analisados utilizando one-way ANOVA e para análise dos resultados de ingestão de água foi utilizada two-way ANOVA usando-se tempos e tratamentos como fatores. O índice de significância fixado foi $p < 0,05$.

PROCOLOS EXPERIMENTAIS EXECUTADOS

1- Efeitos da injeção icv dos antagonistas colinérgicos muscarínicos sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip.

A salivação foi induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal), aplicada 15 minutos após a injeção icv de 4-DAMP (10, 25, 50, 100 e 250 nmol/1 μ l), pirenzepina (500 nmol/1 μ l), metoctramina (500 nmol/1 μ l) e tropicamide (500 nmol/1 μ l) ou veículo (controle). A coleta da saliva iniciada 10 minutos após a injeção de pilocarpina foi realizada durante 7 minutos.

2- Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos na ingestão de água induzida pela pilocarpina ip.

A ingestão de água foi induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 μ mol/Kg de peso corporal), aplicada 15 minutos após a injeção icv de pirenzepina (0,05; 0,1 e 1 nmol/1 μ l), metoctramina (10, 25, 50 nmol/1 μ l), 4-DAMP (2,5; 5 e 10 nmol/1 μ l), tropicamide (500 nmol/1 μ l) ou veículo (controle). A ingestão de água foi medida a cada 15 min durante uma hora imediatamente após a injeção de pilocarpina.

3- Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos sobre a resposta pressora produzida pela pilocarpina iv.

Passados 3 a 5 dias após o último experimento em que se estudou a ingestão de água, os mesmos animais foram submetidos à cirurgia para implante de cânula na artéria femoral. No dia seguinte foram conectados ao sistema de registro de pressão arterial e frequência cardíaca. Após um período controle de registro (20 min), os animais receberam injeção icv de pirenzepina (25, 50 e 100 nmol/1 μ l), metoctramina (25 e 50 nmol/1 μ l), 4-DAMP (10, 25 e 100 nmol/1 μ l), tropicamide (500 nmol/1 μ l) ou veículo e em seguida (15 minutos após) receberam pilocarpina (4 μ mol/Kg de peso corporal) injetada iv. Um dia após o primeiro teste na pressão arterial e frequência cardíaca, os animais foram submetidos a um segundo teste onde receberam novamente injeções de antagonistas ou veículo + pilocarpina de forma contrabalanceada, ou seja, se no primeiro teste o tratamento foi antagonista + pilocarpina, no segundo teste o mesmo rato recebeu veículo + pilocarpina. Os testes foram planejados de forma que no primeiro teste metade dos ratos recebessem veículo + pilocarpina e a outra metade antagonista + pilocarpina.

4- Efeitos da injeção icv de 4-DAMP sobre a expressão da proteína c-fos produzida pela injeção de pilocarpina ip.

A expressão de c-fos após a injeção ip de pilocarpina (4 μ mol/Kg de peso corporal) ou salina foi investigada nas áreas prosencefálicas que já se sabe

participam do controle da ingestão de água, salivação ou resposta pressora, como região anteroventral do terceiro ventrículo (MnPO, OVLT), órgão subfornical, área preóptica, núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo.

Uma vez identificadas as áreas que expressavam c-fos após a injeção ip de pilocarpina, foi estudado o efeito do pré-tratamento com 4-DAMP (25 nmol/1 μ l) icv na expressão de c-fos induzida pela pilocarpina. Os testes com 4-DAMP icv se justificavam, pois esse antagonista mostrou efeitos reduzindo a salivação, ingestão de água e a resposta pressora induzida pela pilocarpina. A dose do antagonista que foi usada nos estudos de expressão de c-fos foi definida considerando-se que fosse uma dose que bloqueasse salivação, ingestão de água e respostas cardiovasculares.

Duas horas após a injeção ip de pilocarpina (4 μ mol/Kg de peso corporal) ou salina, os animais anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg de peso corporal), foram perfundidos com salina tamponada seguida da perfusão com paraformaldeído 4%. Os cérebros foram removidos e submetidos aos procedimentos histológicos e de imuno-histoquímica segundo a metodologia descrita anteriormente. As injeções icv de 4-DAMP (25 nmol/1 μ l) ou veículo foram feitas 15 minutos antes das injeções ip de pilocarpina ou salina.

RESULTADOS

1. Efeitos da injeção icv dos antagonistas colinérgicos muscarínicos sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip.

A salivação induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal) teve uma variação de 476 ± 54 a 718 ± 61 mg/7 min.

Injeções icv de 4-DAMP (25, 50, 100 e 250 nmol/1 μl) reduziram a salivação induzida pela pilocarpina ip [$F(9, 64) = 18,28$; $p < 0,001$] (Figura 1). Injeção icv de 4-DAMP (10 nmol/1 μl) não inibiu a salivação induzida por pilocarpina ip (Figura 1).

Injeções icv de pirenzepina (500 nmol/1 μl), methoctramina (500 nmol/1 μl) ou tropicamide (500 nmol/1 μl) [$F(5,44) = 2,67$; $p > 0,05$] não inibiram a salivação induzida por pilocarpina ip, (Figura 2).

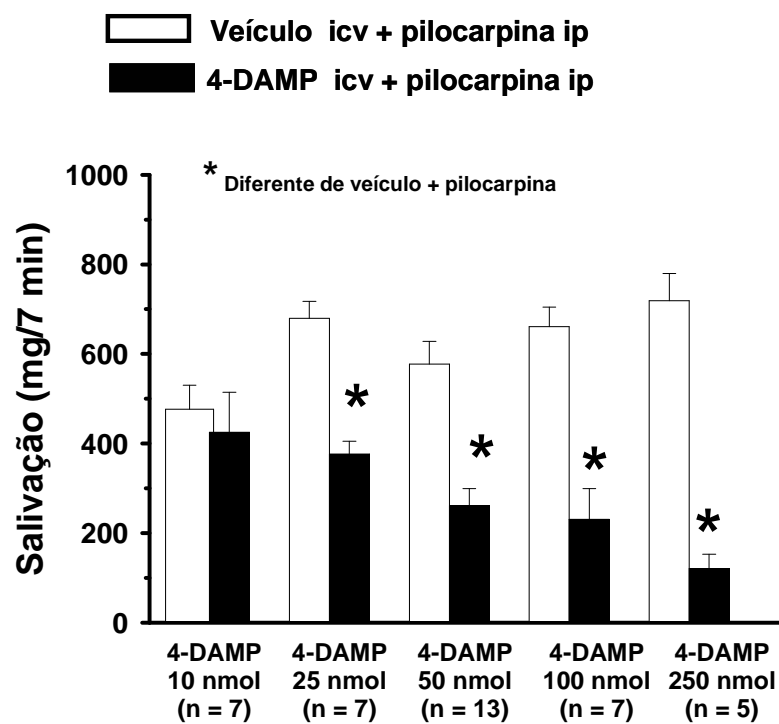


FIGURA 1: Salivação (mg/7 min) induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal) em ratos previamente tratados com 4-DAMP (10, 25, 50, 100 e 250 nmol/1 μ l) ou salina injetados no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

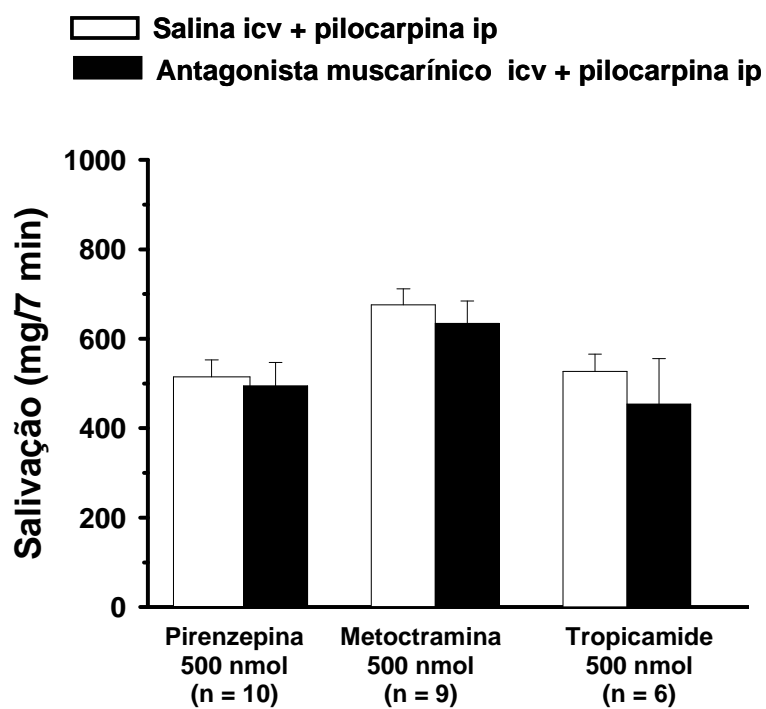


FIGURA 2: Salivação (mg/7 min) induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal) em ratos previamente tratados com pirenzepina (500 nmol/1 μ l), methoctramina (500 nmol/1 μ l), tropicamide (500 nmol/1 μ l) ou salina injetados no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

2. Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos na ingestão de água induzida pela pilocarpina ip.

A ingestão de água induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal) teve uma variação de $3,2 \pm 0,74$ a $5,93 \pm 1,34$ ml/60 min.

Pirenzepina (0,1 e 1 nmol/1 μl), [F(3,21) = 3,23; P <0,05] e [F(3,15) = 4,25; P < 0,05], respectivamente, metoctramina (50 nmol/1 μl) [F(3,21) = 10,38; P <0,001] e 4-DAMP (5 e 10 nmol/1 μl) [F(1,5) = 28,41; P <0,05] e [F(3,18) = 3,27; P <0,05] e [F(1,48) = 21,585; P <0,05], respectivamente, injetados icv reduziram a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip (Figuras 3, 4 e 5).

Pirenzepina (0,05 nmol/1 μl), metoctramina (10 e 25 nmol/1 μl), 4-DAMP (1 nmol/1 μl), tropicamide (500 nmol/1 μl) injetados icv não alteraram a ingestão de água induzida por pilocarpina ip (Figuras 3, 4, 5 e 6).

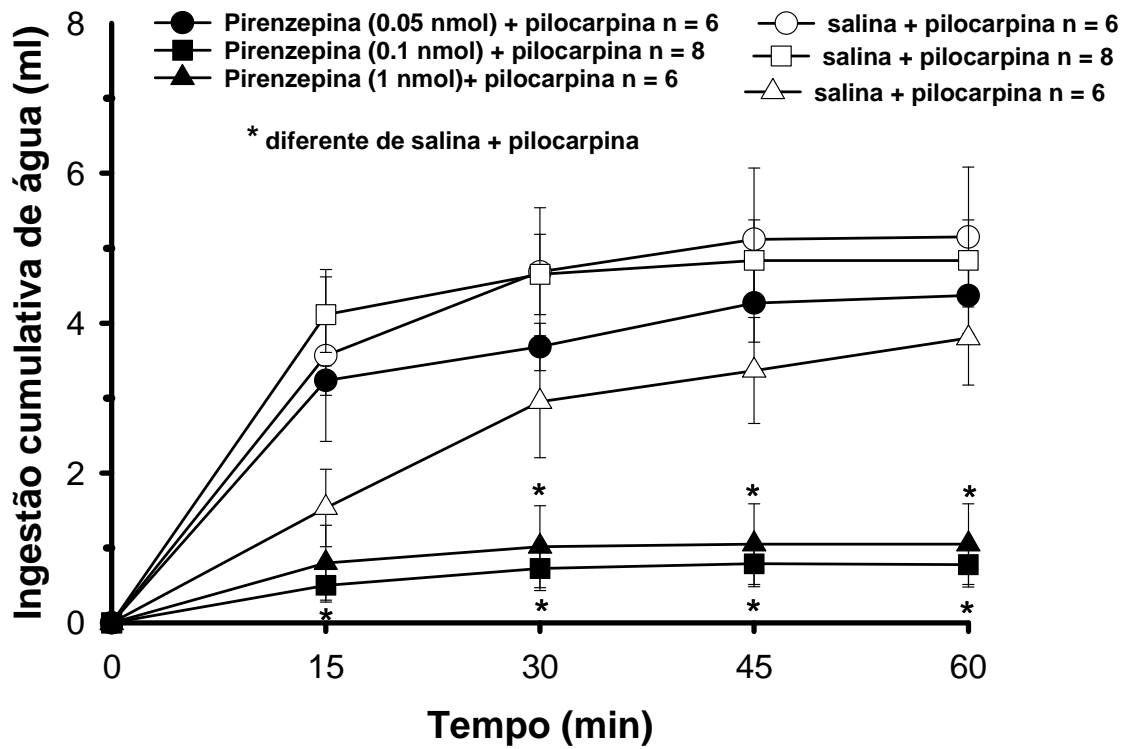


FIGURA 3: Ingestão de água induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com pirenzepina (0,05; 1 e 1 nmol/1 μl) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

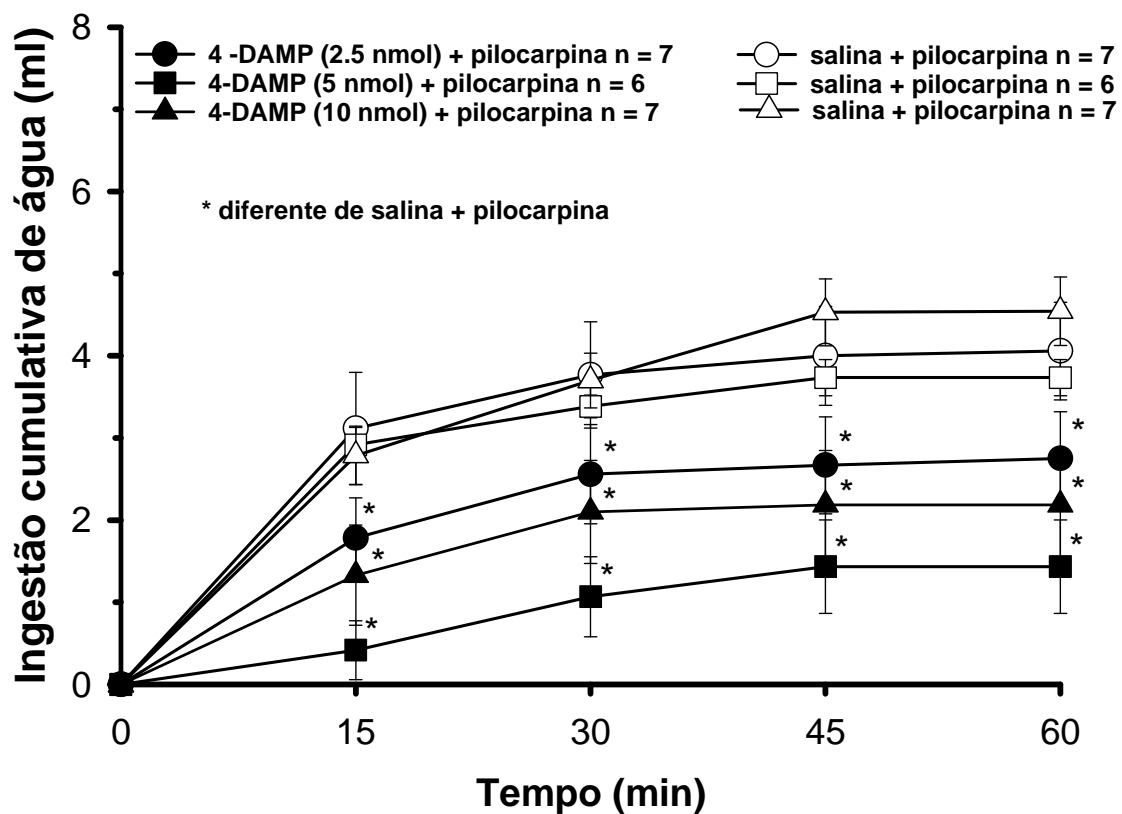


FIGURA 4: Ingestão de água induzida pela injeção ip de pilocarpina ($4 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com 4-DAMP (2,5; 5 e $10 \text{ nmol}/1 \mu\text{l}$) ou salina injetados no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

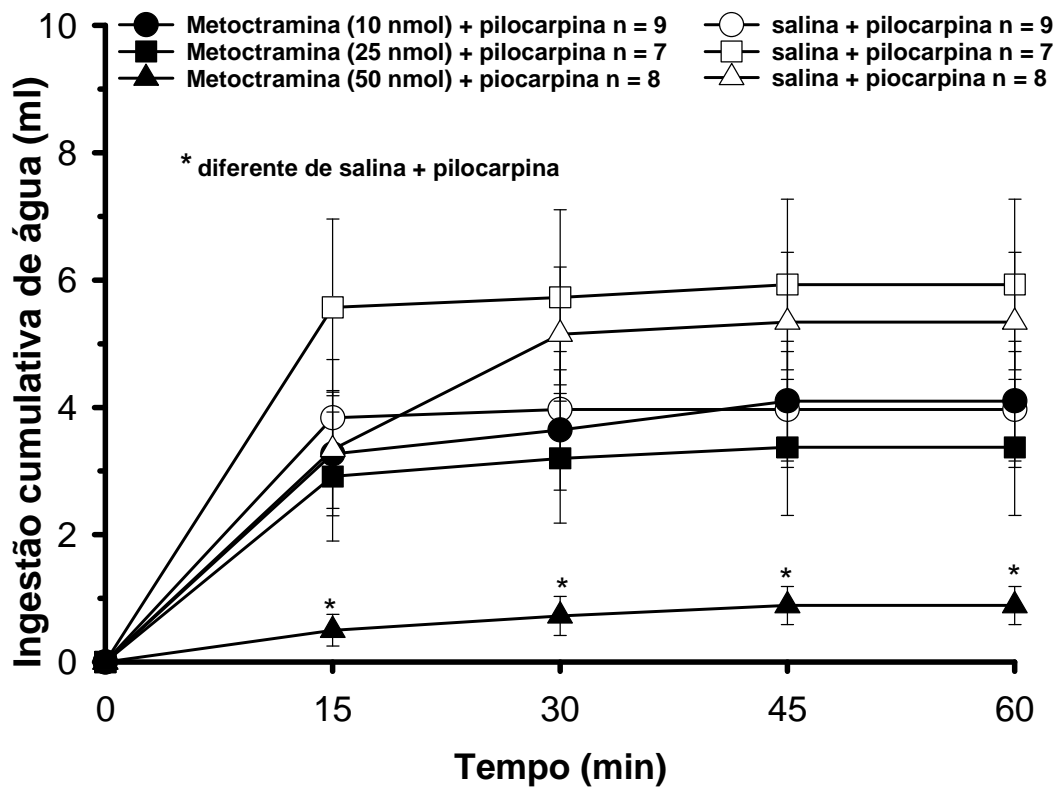


FIGURA 5: Ingestão de água induzida pela injeção ip de pilocarpina (4 µmol/kg de peso corporal) em ratos previamente tratados com metoclopramina (10, 25 e 50 nmol/1 µl) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como média ± EPM. n = número de animais.

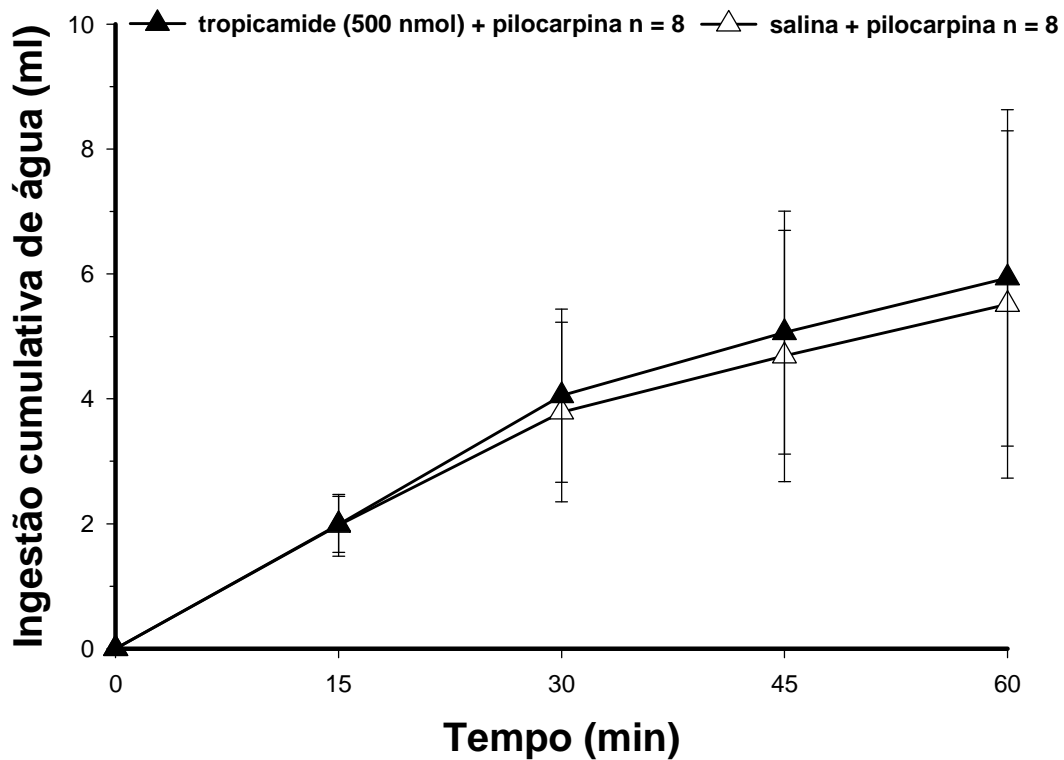


FIGURA 6: Ingestão de água induzida pela injeção ip de pilocarpina ($4 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com tropicamide ($500 \text{ nmol}/1 \mu\text{l}$) ou salina injetados no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

3. Efeitos da injeção icv dos antagonistas muscarínicos específicos na resposta pressora induzida pela pilocarpina iv.

Pilocarpina (4 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal) iv induz uma resposta hipotensora transitória (menos que 1 minuto) e logo em seguida uma resposta hipertensora de longa duração, sem alterações na frequência cardíaca (Figuras 7, 8, 9, 10 e Tabela 1). A resposta hipotensora produzida pela pilocarpina variou de -30 ± 9 a -44 ± 3 mmHg e a resposta hipertensora da pilocarpina iv variou de 40 ± 5 a 53 ± 4 mmHg.

O tratamento com pirenzepina (100 nmol/1 μl), [F(4, 17) = 13,53; P < 0,001] ou 4-DAMP (25 e 50 nmol/1 μl) [F(6, 31) = 29,33; P < 0,001] reduziu a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv (Figuras 7 e 8).

A injeção de pirenzepina (25 e 50 nmol/1 μl), 4-DAMP (10 nmol/1 μl), metoctramina (25 e 50 nmol/1 μl) [F(4,19) = 12,57; P >0,001] e tropicamide (500 nmol/1 μl) [F(2,17) = 3,39; P > 0,001] não inibiram a resposta pressora induzida por pilocarpina ev, (Figuras 7, 8, 9 e 10).

A resposta hipotensora induzida pela pilocarpina ev não foi alterada por pela injeção icv prévia de pirenzepina (25, 50 e 100 nmol/1 μl) [F(4,17) = 12,19; P >0,001], 4-DAMP (10, 25 e 50 nmol/1 μl) [F(6,31) = 6,65; P >0,001], metoctramina (25 e 50 nmol/1 μl) [F(4,19) = 13,85; P >0,001] e tropicamide (500 nmol/1 μl) [F(2,17) = 3,39; P > 0,001] (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Pilocarpina ev não produziu nenhuma alteração na frequência cardíaca nos animais pré-tratados com salina ou pirenzepina (100 nmol/1 μl), metoctramina

(50 nmol/1 μ l), 4-DAMP (50 nmol/1 μ l) ou tropicamide (500 nmol/1 μ l) [F(8,37)
=1,63; P >0,05] (Tabela 1).

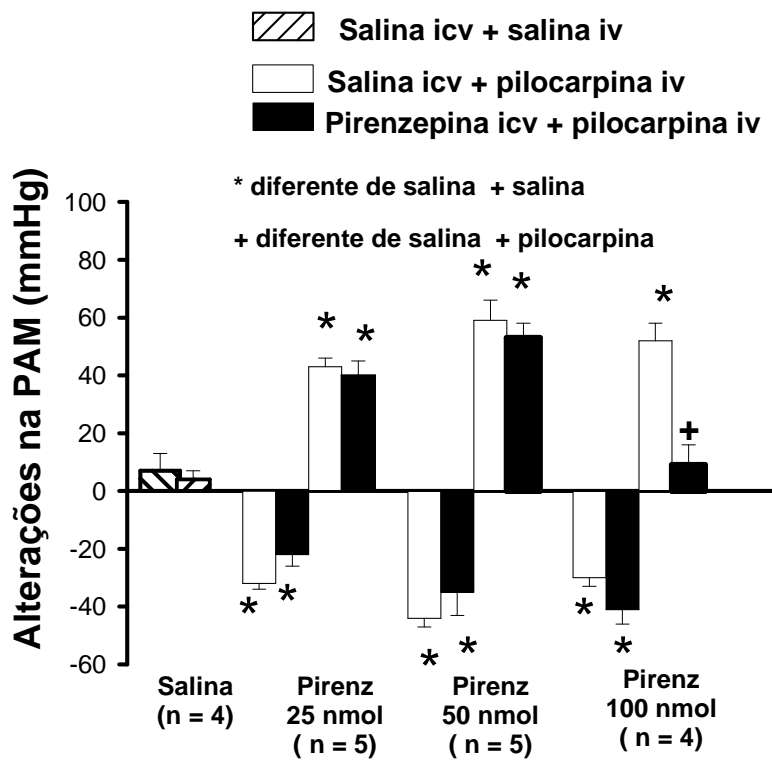


FIGURA 7: Alterações da pressão arterial média (Δ PAM) induzida pela injeção ip de pilocarpina ($4 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com pirenzepina (25, 50 e 100 nmol/ $1 \mu\text{l}$) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

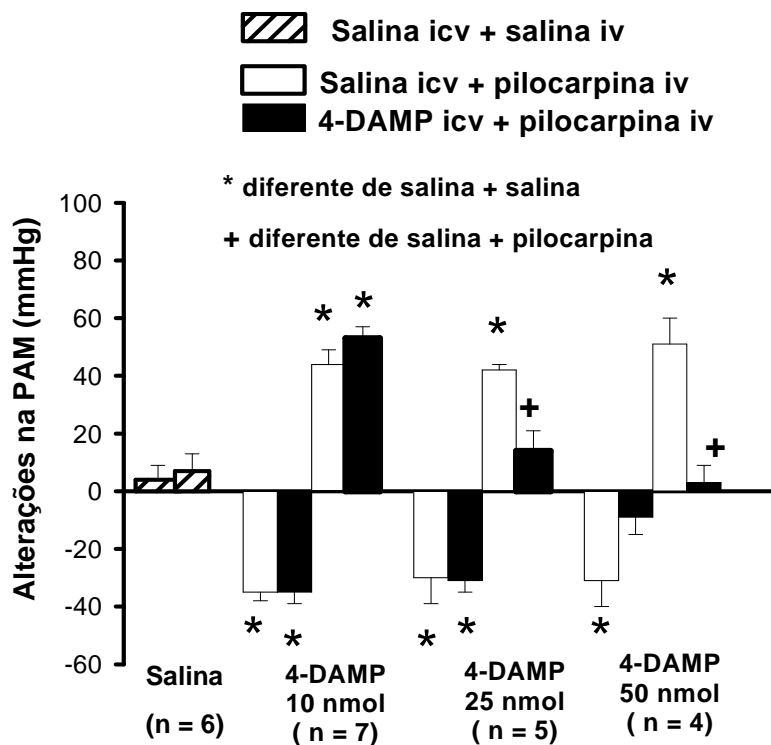


FIGURA 8: Alterações da pressão arterial média (Δ PAM) induzida pela injeção ip de pilocarpina ($4 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com 4-DAMP (10, 25 E 50 $\text{nmol}/1 \mu\text{l}$) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

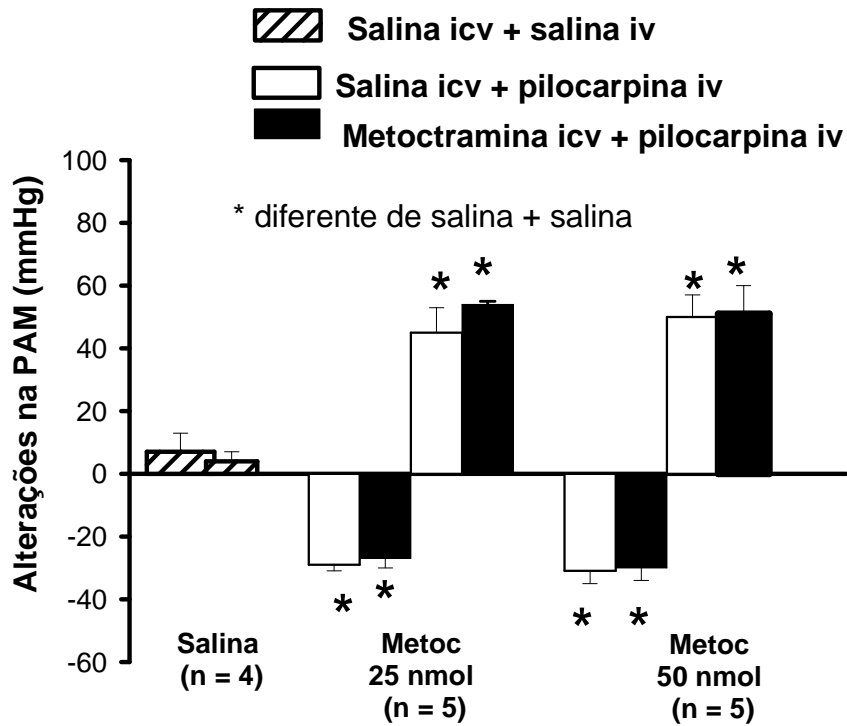


FIGURA 9: Alterações da pressão arterial média (Δ PAM) induzida pela injeção ip de pilocarpina ($4 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com metoctranina (25 e 50 nmol/ $1 \mu\text{l}$) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

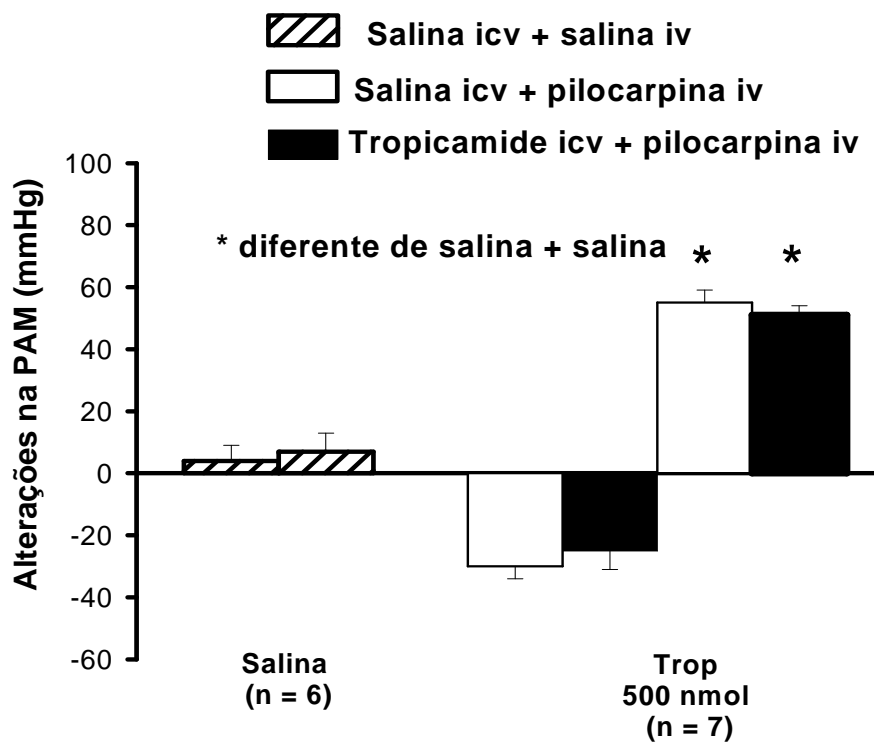


FIGURA 10: Alterações da pressão arterial média (Δ PAM) induzida pela injeção ip de pilocarpina ($4 \mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) em ratos previamente tratados com tropicamide ($500 \text{ nmol}/1 \mu\text{l}$) ou salina injetados no VL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

Tabela 1: Alterações na FC após injeções de salina ou pilocarpina ev em ratos pré-tratados com salina ou antagonista muscarínico no VL.

tratamento	Δ FC
Salina + salina (n = 6)	22 ± 16
Salina + pilocarpina (n = 4)	51 ± 21
Pirenzepina + pilocarpina (n = 4)	46 ± 10
Salina + pilocarpina (n = 4)	51 ± 30
4-DAMP + pilocarpina (n = 4)	45 ± 41
Salina + pilocarpina (n = 5)	56 ± 14
Metoctramina + pilocarpina (n = 5)	53 ± 12
Salina + pilocarpina (n = 7)	63 ± 13
Tropicamide + pilocarpina (n = 7)	34 ± 18

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Doses: pilocarpine (4 µmol/kg de peso corporal), pirenzepina (100 nmol/1µl), 4-DAMP (50 nmol/1µl), metoctramina (50 nmol/1µl) e tropicamide (500 nmol/1µl). n = número de animais .

4- Alterações da expressão da proteína c-fos em algumas áreas prosencefálicas produzida pela injeção de pilocarpina ip.

Pilocarpina (4 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) ip induziu um aumento na expressão de da proteína c-fos no núcleo supra-óptico (SON), [F(3,17) = 6,64; P < 0,05] porém não aumentou a expressão dessa proteína no OVLT [F(3,17) = 1,525; P > 0,05] , MnPO [F(3,17) = 1,27; P > 0,05], SFO [F(3,17) = 2,511; P > 0,05], PVN parvo [F(3,17) = 0,719; P > 0,05] e magnocelular [F(3,17) = 1,356; P > 0,05], ASL dorsal [F(3,17) = 0,45; P > 0,05] e intermediária ipsilateral [F(3,17) = 0,708; P > 0,05], ASL dorsal [F(3,17) = 0,842; P > 0,05] e intermediária contralateral, [F(3,17) = 0,309; P > 0,05] e ASM [F(3,17) = 0,577; P > 0,05] (Figuras 11, 12 e 13).

O aumento da expressão de fos no SON foi reduzido pelo pré-tratamento com 4-DAMP (25 nmol/1 μl) injetado no VL (Figuras 12 e 14).

Lamina terminal

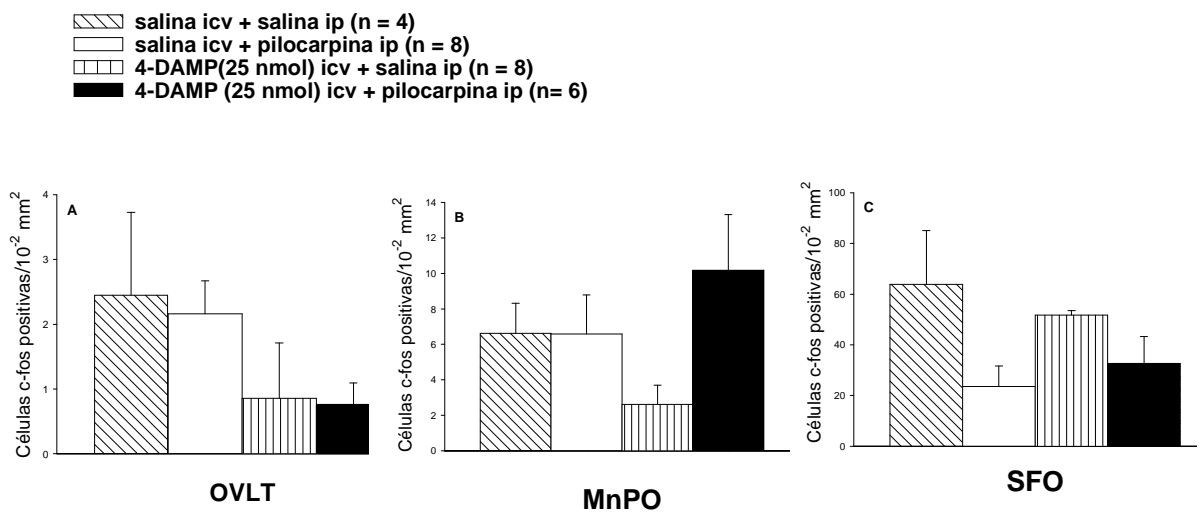


FIGURA 11: Expressão da proteína c-fos no (A) órgão vascular da lâmina terminal – OVLT, (B) núcleo preóptico mediano – MnPO, (C) órgão subfornical – OSF em ratos tratados com salina ou pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal) ip. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

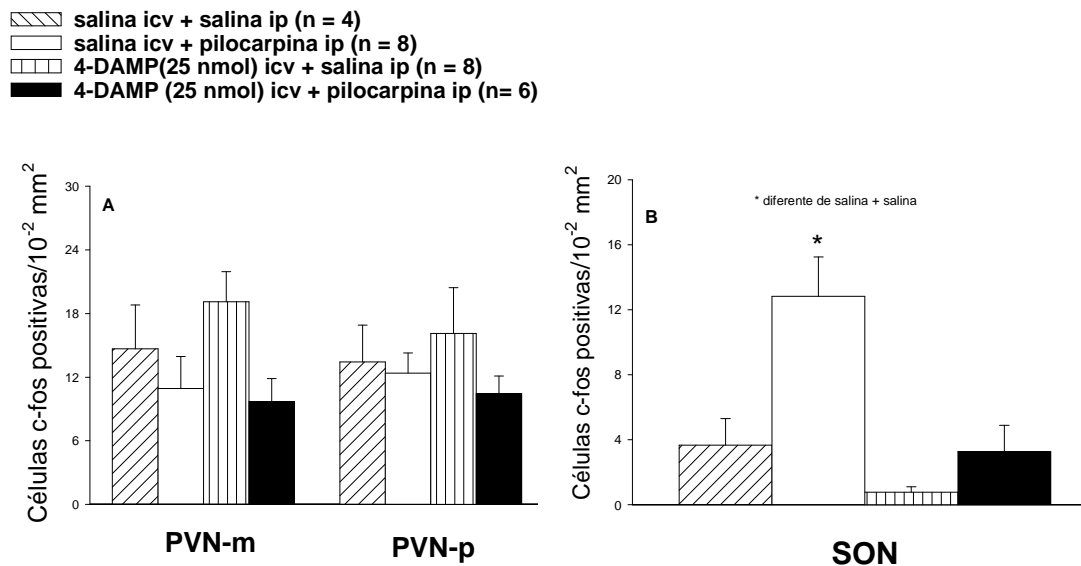
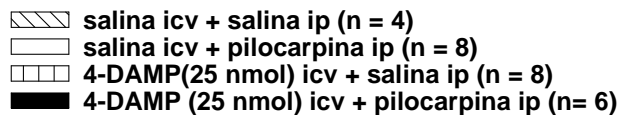


FIGURA 12: Expressão da proteína c-fos (A) no núcleo paraventricular (PVN) parvo e magnocelular e (B) núcleo supra-óptico (SON) em ratos tratados com salina ou pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal) ip pré-tratados com salina ou 4-DAMP (25nmol/1 μ l) icv. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.



 salina icv + salina ip (n = 4)

 salina icv + pilocarpina ip (n = 8)

 4-DAMP(25 nmol) icv + salina ip (n = 8)

 4-DAMP (25 nmol) icv + pilocarpina ip (n= 6)

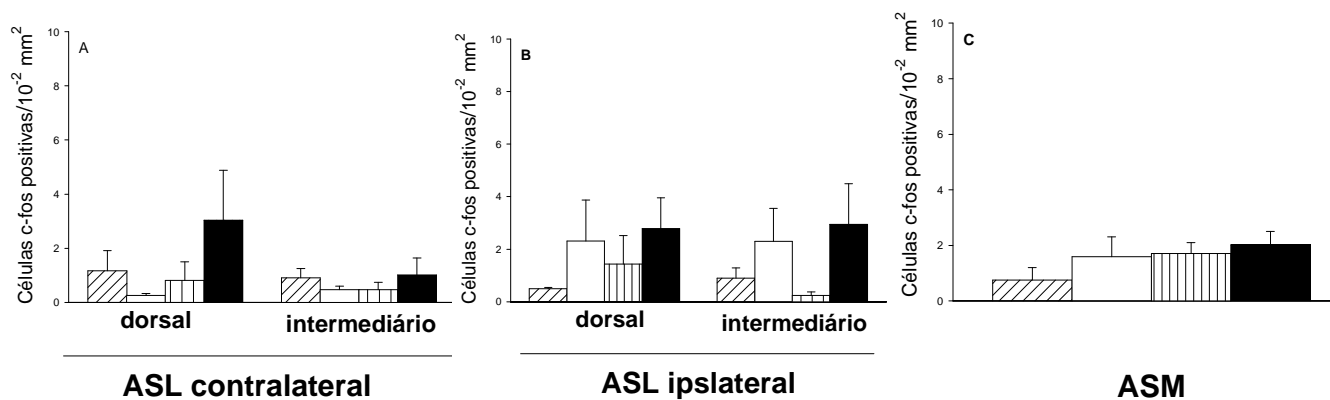


FIGURA 13: Expressão da proteína c-fos na (A) ASL contralateral, (B) ASL ipsilateral, (C) ASM, em ratos tratados com salina ou pilocarpina (4 μ mol/kg de peso corporal) ip. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

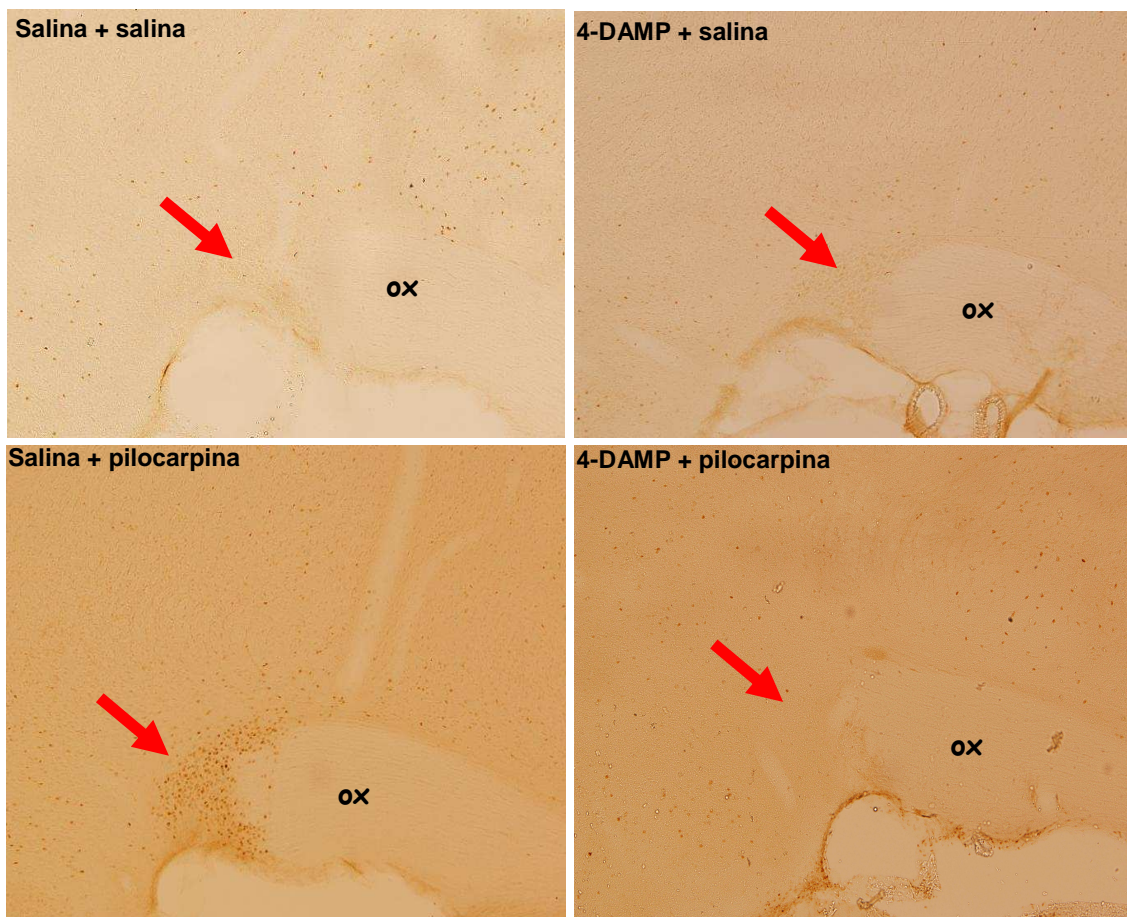


FIGURA 14: Fotomicrografias (10 x) de cortes transversais do cérebro de um animal mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no núcleo supra-óptico (SON) em ratos tratados com salina ou pilocarpina (4 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) ip pré-tratados com salina ou 4-DAMP (25nmol/1 μl) icv. Quiasma óptico está representado pela sigla OX .

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, semelhantes àqueles de estudos anteriores (Ferguson, 1993; Hoffman e cols., 1977; Imai e cols., 1989; Iwabuchi e cols., 1994; Rowland e cols., 2003; Gay, 1976; Fregly e cols., 1982; Moreira e cols., 2002; Takakura e cols., 2004, 2005) mostram que a pilocarpina injetada periféricamente em ratos induz salivação, ingestão de água e uma transitória resposta hipotensora (menos de 1 minuto) seguida por uma resposta hipertensora que tem duração aproximada de uma hora. O pré-tratamento com tropicamide (antagonista M_4) icv não produziu nenhuma alteração das respostas induzidas pela pilocarpina injetada periféricamente. A salivação induzida por pilocarpina ip foi reduzida pela injeção icv de 4-DAMP (antagonista M_1/M_3), enquanto que os outros antagonistas não produziram nenhum efeito sobre a salivação induzida pela pilocarpina ip o que sugere que pelo menos parte da salivação produzida pela pilocarpina ip depende da ativação de receptores M_3 centrais. A ingestão de água induzida pela pilocarpina ip foi reduzida pela injeção previa icv de pirenzepina, metoctramina ou 4-DAMP (antagonistas M_1 , M_2/M_4 e M_1/M_3 , respectivamente) sugerindo, assim, que a ingestão de água induzida pela pilocarpina ip dependeria pelo menos da ativação de receptores M_1 e M_2 centrais. A resposta pressora induzida pela pilocarpina iv foi reduzida pela injeção previa de pirenzepina ou 4-DAMP icv o que sugere que a resposta pressora produzida pela pilocarpina ip dependeria pelo menos da ativação de receptores M_1 centrais. A hipotensão induzida pela pilocarpina iv não foi alterada pelo pré-tratamento com antagonistas colinérgicos muscarínicos, mesmo nas doses que produziram efeitos inibitórios na resposta pressora, e ingestão de água induzidas pela pilocarpina injetada

periféricamente. O antagonista 4-DAMP icv na dose de 25 nmol reduziu a salivação, mas não a hipotensão, mostrando uma dissociação dessas respostas. Considerando que 4-DAMP é um antagonista de receptores muscarínicos M_1/M_3 , não se pode excluir a participação dos receptores muscarínicos centrais M_3 na ingestão de água e resposta pressora induzidas pela pilocarpina periférica. Pilocarpina (4 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal) produziu aumento da expressão de c-fos no núcleo supra-óptico (SON), mas não em outras áreas prosencefálicas, como área septal lateral (ASL), área septal medial (ASM), núcleo paraventricular (PVN), órgão subfornical (SFO), órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano (MnPO). O aumento de c-fos no SON produzido pela pilocarpina foi reduzido pela injeção prévia icv de 4-DAMP. Assim, o mesmo antagonista que reduziu todas as respostas da pilocarpina que foram testadas também reduziu o aumento da expressão de c-fos no SON. Portanto, parece que salivação, ingestão de água e resposta pressora produzidas pela pilocarpina ip dependem de uma ativação do SON.

Sabe-se que a ativação de receptores muscarínicos M_3 por pilocarpina ou outros agonistas colinérgicos agindo diretamente nas glândulas salivares produz salivação (Ferguson, 1993; Garret, 1987; Bradley, 1991; Iwabuchi e cols., 1994; Izumi e cols., 1995 e Sato e cols., 2006). Contudo, recentes evidências tem sugerido que a pilocarpina injetada sistemicamente atravessa a barreira hemato-encefálica (Fredman e cols., 1989) e pode agir centralmente para produzir salivação, uma vez que lesões na região AV3V, hipotálamo lateral e área pré-óptica medial reduzem a salivação induzida pela pilocarpina ip, (Renzi e cols., 1993, 2002 e Lopes de Almeida e cols., 2006). A pilocarpina injetada centralmente (icv) produz salivação e o antagonista muscarínico atropina injetado em doses que

agem apenas centralmente reduz a salivação induzida pela pilocarpina ip, sugerindo o envolvimento de receptores centrais na salivação induzida pela pilocarpina ip (Renzi e cols., 1993 e Takakura e cols., 2003). O presente estudo mostrou que a injeção central (icv) do antagonista muscarínico para receptores M₁/M₃ (4-DAMP), reduziu a salivação, o que não aconteceu com a injeção do antagonista para receptores muscarínicos M₁ ou por outros antagonistas. Esses resultados sugerem que a ativação de receptores muscarínicos centrais M₃ é importante para a salivação produzida pela pilocarpina injetada periféricamente.

Os presentes resultados também mostram que os receptores muscarínicos centrais M₁ estão envolvidos com na resposta pressora induzida pela pilocarpina iv e os receptores muscarínicos M₁ e M₂ estão envolvidos na ingestão de água induzida pela pilocarpina ip. Injeções centrais de agonistas colinérgicos induzem ingestão de água e resposta pressora que são bloqueadas pelo prévio tratamento icv com atropina (antagonista muscarínico inespecífico) (Grossman,1960; Fisher e Coury, 1962; Levitt e Fisher, 1966; Giardina e Fisher, 1971; Rowland e cols., 2003). Estudos anteriores mostraram que a injeção central de atropina inibe a ingestão de água induzida por pilocarpina ip, sugerindo a participação de receptores muscarínicos centrais na resposta dipsogênica induzida pela pilocarpina ip (Sato e cols., 2006). A ingestão de água induzida por bethanecol ou carbacol (agonistas colinérgicos muscarínicos) injetados icv foram bloqueados parcialmente por antagonistas muscarínicos M₁ e M₃ (Massi e cols., 1989; Polidoro e cols., 1990 e Rowland e cols., 2003). O presente estudo mostrou que o tratamento com antagonista M₁ (pirenzepina) injetado icv em uma concentração baixa (0.1 nmol) inibiu a resposta dipsogênica induzida pela pilocarpina ip.

As injeções de pilocarpina icv ou iv, semelhante às injeções ip produzem vasoconstrição mesentérica, vasodilatação nas glândulas salivares e resposta pressora, sem alterações na resistência vascular da musculatura esquelética e frequência cardíaca (Sanchez e Meier, 1993; Moreira e cols., 2002 e 2003; Takakura e cols., 2004 e 2005). A lesão eletrolítica da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) abole a vasoconstrição dos leitos muscular esquelético e mesentérico e a resposta pressora produzida pela pilocarpina ip (Takakura e cols., 2005). Em ratos com lesão AV3V foi observado que a pilocarpina ip induziu uma vasodilatação no leito do trem posterior (Takakura e cols., 2005). Estes resultados sugerem que a pilocarpina ip ativa mecanismos centrais para gerar a resposta pressora e uma região importante para essa resposta é a região AV3V. Os presentes resultados mostraram que a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv foi reduzida pela injeção previa de 4-DAMP nas doses de 25 e 50 nmol e a pirenzepina na dose de 100 nmol injetados icv, sugerindo que a pilocarpina iv ativa receptores muscarínicos centrais M_1 e talvez M_3 para induzir o aumento da pressão arterial. Sabe-se que a acetilcolina agindo em receptores muscarínicos M_3 periféricos produz vasodilatação e hipotensão (Khurana e cols., 2004). Porém, os presentes resultados mostraram que a pilocarpina, agonista colinérgico muscarínico, agindo em receptores muscarínicos centrais M_1 e talvez M_3 aumenta a pressão arterial. A pilocarpina injetada iv ativa mecanismos centrais e periféricos, com a dose usada no presente estudo, porém o efeito predominante é a resposta pressora. O efeito hipotensor da pilocarpina apenas aparece quando ocorre o bloqueio de mecanismos centrais, o que foi reportado em ratos com lesão AV3V (Takakura e cols., 2005). Nesses ratos, observou-se que a injeção de

pilocarpina ip induziu uma vasodilatação e hipotensão como consequência da ativação de mecanismos periféricos, uma vez que, eliminou o efeito dos mecanismos pressores centrais (Takakura e cols., 2005). Esses efeitos eram esperados com a injeção icv dos antagonistas específicos para os subtipos de receptores muscarínicos envolvidos na resposta pressora. Contudo, o presente estudo mostrou que o bloqueio dos subtipos de receptores centrais apenas aboliu a resposta pressora induzida pela pilocarpina iv, Contudo, não ocorreu uma resposta hipotensora duradora após a injeção iv de pilocarpina no lugar da hipertensão. Talvez as doses utilizadas dos antagonistas específicos para os subtipos de receptores muscarínicos não tenham sido suficientes para um bloqueio completo dos receptores centrais e, por isso, os mecanismos pressores centrais ainda estariam atuando parcialmente, contrabalançando os efeitos da ativação dos receptores periféricos. A hipotensão transitória induzida pela pilocarpina iv também não foi reduzida por nenhum dos antagonistas.

Estudos anteriores sugeriram o envolvimento de mecanismos periféricos na resposta dipsogênica induzida pela pilocarpina (Rowland e cols., 2003; Gay, 1976 e Fregly e cols., 1982), ou seja, ela seria uma decorrência da ativação do sistema renina-angiotensina que é produzida pela hipotensão causada pela vasodilatação induzida pela ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos periféricos. Essa hipótese poderia se aplicar no caso de agonistas muscarínicos que produzam hipotensão, mas certamente não se aplicar no caso da pilocarpina que produz um aumento da pressão arterial ao invés de hipotensão. Os presentes resultados sugerem que a ingestão de água induzida por pilocarpina ip é diferente da salivação e das respostas cardiovasculares por

dependem exclusivamente de mecanismos centrais. A Ingestão de água ocorre exclusivamente em receptores centrais muscarínicos M_1 , M_2 e talvez M_3 . O efeito da pilocarpina periférica na salivação é semelhante ao efeito quando injetada centralmente, enquanto que nas respostas cardiovasculares induzidas pela pilocarpina, os efeitos são opostos, ou seja, o mecanismo periférico induz uma hipotensão, enquanto que o mecanismo central induz a uma hipertensão (Moreira e cols., 2002 e Takakura e cols., 2004). Provavelmente os efeitos centrais e periféricos da pilocarpina na salivação são complementares, enquanto que a resposta pressora central da pilocarpina é oposta ou contrabalança o efeito hipotensor da ativação dos receptores colinérgicos periféricos, sendo um fator essencial para a manutenção da pressão arterial em um nível necessário para garantir fluxo sanguíneo nas glândulas salivares para que ocorra salivação.

O aumento na expressão da proteína c-fos no SON produzido pelo tratamento com pilocarpina ip foi praticamente abolido pela injeção prévia icv do antagonista 4-DAMP sugerindo o envolvimento desse núcleo nas respostas estudadas. Estudo anterior (Saad e cols, 2004) demonstrou que após a injeção de pilocarpina no SON ocorria um aumento dose-dependente da salivação e da pressão arterial, demonstrando assim que essa área é importante para essas respostas. A administração icv de betanecol induz ingestão de água e aumento da expressão de c-fos no SON (Rowland e cols., 2003). O tratamento combinando-se pirenzepina + 4-DAMP icv aboliu a ingestão de água e o aumento da expressão de c-fos no SON induzidos pelo betanecol icv, sugerindo a importância desse núcleo e dos receptores M_1 e M_3 centrais para a ingestão de água produzida pela ativação colinérgica central (Rowland e cols., 2003). Outro estudo demonstrou que

pilocarpina injetada perifericamente pode induzir c-fos em diferentes áreas cerebrais, como no córtex cingular e estriatum medial (Wirtshafter, 2004), o que não ocorreu no presente estudo, provavelmente porque a concentração da pilocarpina que foi utilizada naquele estudo foi 50 vezes maior do que a utilizada no presente trabalho. Os nossos resultados imunohistoquímicos estão de acordo com o estudo de Wirtshafter, 2004 e sugerem a participação de mecanismos centrais envolvendo o SON nas respostas produzidas pela ativação colinérgica central.

Sabe-se que a ocitocina e a vasopressina são sintetizadas pelos neurônios do SON. Estudos anteriores mostraram uma relação entre liberação desses dois peptídeos e um aumento na atividade elétrica dos neurônios do SON (Bicknell, 1988; Renaud e cols., 1991). Sabe-se que nesse núcleo existe neurônios colinérgicos que direta ou indiretamente estão relacionados com a liberação de vasopressina (Armstrong, 1983; Masson e cols., 1983). O estudo presente mostra que os neurônios do SON são ativados pela administração periférica de pilocarpina. Ainda não é possível saber se isso se deve a uma ação direta da pilocarpina ativando os receptores muscarínicos do SON ou a ativação de outra área cerebral que envia projeções para o SON. De Carvalho Borges e cols., 2006 mostraram que lesões na região AV3V diminuem a expressão da proteína c-fos em núcleos hipotalâmicos como o SON, diminuindo também a liberação de vasopressina e ocitocina, o que sugere a uma relação entre essas áreas. Outro estudo (Xu e cols., 2001) demonstrou que o SFO tem íntima relação com o SON, pois quando se fazia a estimulação colinérgica injetando-se fisostigmina (inibidor reversível de colinesterase) no SFO aumentava-se a expressão da proteína c-fos no SON e essa expressão era diminuída com a injeção de atropina no SFO.

Para cada resposta testada, a dose efetiva de cada antagonista muscarínico injetado icv foi diferente. Pirenzepina em pequena dose (0.1 nmol) aboliu a ingestão de água induzida por pilocarpina ip. Contudo, a redução da resposta pressora ocorreu apenas com a dose de 100 nmol de pirenzepina, e não na dose de 50 nmol (uma dose 500 vezes maior do que a dose necessária para inibir a ingestão de água). Esses resultados sugerem que receptores muscarínicos centrais M_1 envolvidos nas respostas dipsogênica e pressora provavelmente não são os mesmos. Provavelmente, as pequenas doses de pirenzepina devem inibir os receptores muscarínicos M_1 localizados mais periventriculares do que os receptores M_1 relacionados com a resposta pressora induzida pela injeção de pilocarpina periférica. Sato et al, 2006 propôs em seus resultados que a ativação de receptores muscarínicos centrais por pilocarpina para induzir a ingestão de água estão localizados nos órgãos circunventriculares, provavelmente o órgão subfornical (SFO). Porém nossos resultados não demonstraram tal ativação, mas sim que o tratamento com pilocarpina ip induziu uma maior ativação no SON. O pré-tratamento com 4-DAMP icv quase aboliu todas as respostas estudadas, entretanto, de maneira similar a pirenzepina, as doses efetivas para cada resposta não foi a mesma. Embora uma dose pequena de 4-DAMP (5 nmol) tenha reduzido a ingestão de água, apenas a dose de 25 nmol (dose 5 vezes maior do que a necessária para inibir a resposta dipsogênica) reduziu a salivação e a resposta pressora induzidas pela pilocarpina periférica. A explicação para as diferentes doses de 4-DAMP é a mesma discutida para a pirenzepina. A menor dose de 4-DAMP deve inibir os receptores M_1 e/ou M_3 envolvidos na resposta dipsogênica, mas similar ao que ocorreu com pirenzepina não bloqueou os receptores M_1 envolvidos com a resposta pressora ou os receptores M_3 envolvidos com

salivação. Estudos anteriores (Sato e cols., 2006), similares aos presentes resultados com 4-DAMP, mostraram que pequenas doses de atropina icv são efetivas para inibir a ingestão de água induzida pela injeção de pilocarpina ip, mas não são suficientes para inibir a salivação induzida pela pilocarpina ip. O mesmo estudo (Sato e cols., 2006) também mostrou que pequenas doses de pilocarpina icv podem induzir ingestão de água, mas não salivação, o que ainda sugere que os receptores muscarínicos envolvidos na ingestão de água são mais facilmente atingidos pela injeção icv do que os receptores muscarínicos envolvidos na salivação. Conseqüentemente, os presentes resultados testando antagonistas específicos para os subtipos de receptores muscarínicos e estudos anteriores utilizando injeções icv de atropina (antagonista muscarínico inespecífico) ou mesmo pilocarpina tem mostrado efeitos muito similares que sugerem que os receptores muscarínicos ativados pela pilocarpina para induzir salivação, ingestão de água e, no caso do presente estudo, a resposta pressora, não estariam localizados na mesma área. Contudo, deve-se considerar que os resultados de c-fos de diferentes áreas prosencefálicas mostraram aumento de atividade apenas no SON. Mesmo excluído-se as áreas onde a expressão de c-fos após a injeção periférica de pilocarpina já foi estudada no presente estudo, talvez exista outra área central ativada que ainda não foi estudada e que explicaria os efeitos de diferentes doses dos antagonistas. Portanto, mais estudos seriam necessários para se confirmar as hipótese apresentadas.

Em resumo, os resultados sugerem que a salivação induzida por pilocarpina ip depende da ativação receptores muscarínicos centrais M_3 . A ingestão de água induzida por pilocarpina ip depende da ativação de receptores muscarínicos centrais M_1 e M_2 e a resposta pressora depende de receptores muscarínicos

centrais M_1 . O envolvimento de receptores muscarínicos M_3 na ingestão de água e na resposta pressora não é claro devido ao 4-DAMP inibir os receptores M_1 e M_3 . Os resultados também mostram que ativação receptores centrais M_1 e/ou M_3 pela pilocarpina ip aumenta a atividade do núcleo supra-óptico o que pode ser importante para a ingestão de água, salivação e a resposta pressora produzida pela pilocarpina ip.

REFERÊNCIAS

1. Anderson, L.C.; Garrett, J.R., 1998. Neural regulation of blood flow in submandibular salivary secretion. *Eur. J. Morphol.* 45: 458-568.
2. Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levy, A. I., Wainer, B. H., Terry, R. D., 1983. Distribution of cholinergic neurons in rat brain demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 216,53–68.
3. Aslan, N., Goren, Z., Onat, F., Oktay, S., 1997. Carbachol- induced pressor responses and muscarinic M1 receptors in the central nucleus of amygdala in conscious rats. *Eur J. Pharmacol.* 333, 63-67.
4. Baun, B.J., 1987. Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.*, 66, 628-632.
5. Bicknell, R. J., 1988. Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. *J. Exp. Biol.* 139, 51-65
6. Brann, M.R., Ellis, J., Jorgensen, H., Hill-Eubanks, D., Jones, S.V., 1993. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes: localization and structure/function. *Prog Brain Res* 98,121–127.
7. Bradley, R.M., 1991. Salivary secretion. In: *Smell and taste in health and disease*. Ed. Raven Press, New York, pp 127-147.
8. Cecanho, R., Anaya, M., Renzi, A., Menani, J.V., De Luca Jr., L.A., 1999. Sympathetic mediation of salivation induced by intracerebroventricular pilocarpine in rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 76, 9-14.
9. De Carvalho Borges, B., Carnio, E. C., Elias, L. L. K., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L. G. S., da Rocha, M. J. A., 2006. Lesion of the anteroventral third ventricle (AV3V) reduces hypothalamic activation and hypophyseal

- hormone secretion induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Research* 1115, 83–91.
10. Elverdin, J.C., Luchelli-Fortis, M.A., Stefano, F.J.E., and Perec, C.J., 1984. Alpha-1 adrenoceptors mediate secretory responses to norepinephrine in innervated and denervated rat submaxillary glands. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 229, 261-266.
 11. Emmelin, N., 1987. Nerve interactions in salivary glands. *J. Dent. Res.* 66, 509-517.
 12. Feigl, E.O., 1975. Reflex parasympathetic coronary vasodilatation elicited from cardiac receptors in dog. *Cir. Res.* 37, 175-185.
 13. Ferguson, M., 1993. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 75, 186-191.
 14. Freedman, S.B., Harley, E.A., Pastel, S., 1989. Direct measurement of muscarinic agents in the central nervous system of mice using ex vivo binding. *Eur. J. Pharmacol.* 175, 253-260.
 15. Fregly, M.J., Kiktam, D.C., Greenleaf, J.E., 1982. Bethanecol-induced water intake in rats: possible mechanisms of induction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 727–732.
 16. Fisher, A.E., Coury, J.N., 1962. Chemical tracing of a central neural circuit underlying the thirst drive. *Science* 138, 691–693.
 17. Fox, R.I., Kontinen, Y., Fisher, A., 2001. Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjogren's syndrome. *Clin. Immunol.* 101, 249–263.
 18. Garrett, J.R., 1987. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J. Dental Res.* 66, 387–397.

19. Garret, J.R. and Anderson, L.C., 1991. Rat sublingual salivary glands secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. *Arch. Oral Biol.* 36, 675-683.
20. Gay, P.E., Benner, S.C., Leaf, R.C., 1976. Drinking induced by parenteral injections of pilocarpine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, 633–638.
21. Ghelardini, C.; Malmberg-Aiello, P.; Giotti, A.; Malcangio, M.; Bartolini, A., , 1990. Investigation into atropine-induced antinociception. *Br. J. Pharmacol.* 101, 49-54.
22. Giardina, A.R., Fisher, A.E., 1971. Effect of atropine on drinking induced by carbachol, angiotensin and isoproterenol. *Physiol. Behav.* 7, 653–655.
23. Goyal, R. K., 1989. Muscarinic receptor subtypes. Physiology and clinical implications. *N Engl J Med.*, 321, 1022 -1029.
24. Grossman, S.P., 1960. Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of the hypothalamus. *Science* 132, 301–302.
25. Hoffmann, W.E., Philips, M.I., Schmid, P.G., Falcon, J., Weet, J.F., 1977. Antidiurectic hormone realease and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. *Neuropharmacology* 16, 463-472.
26. Imai, Y., Abe, K., Sasaki, N., Minami, N., Munakata, M., Yumita, S., Nobunaga, T., Sekino, H., Yoshinaga, K., 1989. Role of vasopressin in cardiovascularresponses to central cholinergic stimulation in rats. *Hypertension* 13, 549–557.
27. Izumi, H.; Karita, K., 1994. Parasympathetic-mediated reflex salivation and vasodilatation in the cat submandibular gland. *Am. J. Physiol.* 267, 747-753.

28. Izumi, H. and Karita, K., 1995. Low-frequency subthreshold sympathetic stimulation augments maximal reflex parasympathetic salivary secretion in cats. *American J. Physiol.* 268, 1188-1195.
29. Iwabuchi, Y., Kataguri, M., Masuhara, T., 1994. Salivary secretion and histopathological effects after single administration of the muscarinic agonist Sin-2011 in MRL/lpr mice. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* 388, 315-325.
30. Jensen, J.L.; Bradin, P.; Berg, T.; Aars, H., 1991. Parotid secretion of fluid amylase and kallikrein during reflex stimulation under normal conditions and after acute administration of autonomic blocking agents in man. *Acta Physiological Scandinavica* 143: 321-329.
31. Khurana, S., Chacon, I., Xie, G., Yamada, M., Wess, J., Raufman, J.P., Kennedy, R.H., 2004. Vasodilatory effects of cholinergic agonists are greatly diminished in aorta from M3R^{-/-} mice. *Eur. J. Pharmacol.* 493, 127-132.
32. Levitt, R.A., Fisher, A.E., 1966. Anticholinergic blockade of centrally induced thirst. *Science* 154, 520–522.
33. Lopes de Almeida, R., De Luca Jr., L.A., Colombari, D.S.A., Menani, J.V., Renzi, A., 2006. Damage of the medial preoptic area impairs peripheral pilocarpine-induced salivary secretion. *Brain Res.* 1085, 144-148.
34. Massi, M., Polidori, C., Melchiorre, C., 1989. Methoctramine, a selective M₂ muscarinic receptor antagonist, does not inhibit carbachol-induced drinking in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 163, 387–391.
35. Mason, W.T., Ho, Y. W., Eckenstein, F., Hatton, G. I., 1983. Mapping of cholinergic neurons associated with rat supraoptic nucleus: combined

immunocytochemical and histochemical identification. *Brain Res Bull* 11:617–62

36. Mayorga, A.J., Cousins, M.S., Trevitt, J.T., Conlan, A., Gianutsos, G., Salamone, J.D., 1998. Characterization of the muscarinic receptor subtype mediating pilocarpine-induced tremulous jaw movements in rats. *Brain Res.*, 795, 179-190.
37. Menani, J.V., Saad, W.A., Camargo, L.A.A., Renzi, A., De Luca Jr., L.A., Colombari, E., 1990. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriurectic responses to central carbachol. *Neurosci. Lett.* 133, 339-344.
38. Messer, W.S., Ellerbrock Jr., B., Price, M., Hoss, W., 1989. Autoradiographic analyses of agonist binding to muscarinic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 38, 837-850.
39. Moreira, T.S.; Takakura, A.C.T.; De Luca Jr., L.A.; Renzi, A.; Menani, J.V. , 2001. Moxonidine reduces pilocarpine-induced salivation in rats. *Autonomic Neuroscience - Basic and Clinical* 91, 32-36.
40. Moreira, T.S., Takakura, A.C.T., Colombari, E., De Luca Jr., L.A., Renzi, A., Menani, J.V., 2002. Hemodynamic responses to central injection of pilocarpine in rats . *Faseb Journal* A119-119.
41. Moreira, T.S., Takakura, A.C.T., Colombari, E., De Luca Jr., L.A., Renzi, A., Menani, J.V., 2003. Central moxonidine on salivary glands blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine. *Brain Res.* 987, 155-163.
42. Moreno M; Maqueda L; Naranjo JA and Martinez de Victoria E. Influence of superior cervical ganglion stimulation frequency on salivary secretion in the rabbit. *Rev. Esp Fisiol.* 42: 489-496, 1986.

43. Nakamura, K.; Masuhara, T., 1989. The relationship between pilocarpine induced autonomic ganglia stimulation activity and salivary secretion of submandibular gland in pithed rat. *Shigaki* 77, 548-570.
44. Norberg, K.A.; Olson, L., 1965. Adrenergic innervation of the salivary glands in the rats. *zeitchrift für Zellforschung* 68, 183-189.
45. Pelat, M., Lazartigues, E., Tran, M.A., Gharib, C., Montrastruc, J.L., Montastruc, P., Rascol, O., 1999. Characterization of the central muscarinic cholinergic receptors involved in the cholinergic pressor response in anesthetized dogs. *Euro J. Pharmacol.* 379, 117-124.
46. Pertwee, R. G.; Ross, T.M., 1991. Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce marked catalepsy in mice. *Neuropharmacology* 30, 67-71.
47. Polidori, C., Massi, M., Lambrecht, G., Mutschler, E., Tacke, R., Melchiorre, C., 1990. Selective antagonists provide evidence that M₁ muscarinic receptors may mediate carbachol-induced drinking in the rat. *Eur J. Pharmacol.* 179, 159–165.
48. Renaud, L. P., Bourque, C. W., 1991. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol.* 36(2), 131-169.
49. Renzi, A., Colombari, E., Mattos Filho, T.R., Silveira, J.E.N., Saad, W.A., Camargo, L.A.A., De Luca Jr. L.A., Deróbio, J.G., Menani, J.V., 1993. Involvement of the central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats. *J. Dent. Res.* 72, 1481-1484.

50. Renzi, A., 1994. Papel do sistema nervoso central no controle da secreção salivar induzida pela injeção periférica ou central de pilocarpina em ratos. Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara – UNESP-. Tese de Livre-Docência.
51. Renzi, A., De Luca Jr., L.A., Menani, J.V., 2002. Lesions of the lateral hypothalamus impair pilocarpine-induced salivation in rats. *Brain Res. Bull* 58, 455-459.
52. Rowland, N.E., Farnbauch, L.J., Roberstson, K.L., 2003. Brain muscarinic receptor subtypes mediating water intake and Fos following cerebroventricular administration of bethanacol in rats. *Psychopharmacology* 167, 174-179.
53. Saad, Wilson Abraão; Gutierrez, Laura Izabel; Siqueira, Ismael Francisco Motta Guardad, Camargo, Luis Antonio de Arruda; dos Santos, Talmir Augusto Faria Brisola; Saad, William Abraão; Simões, Sylvio; Guarda, Renata Saad, 2004. Nitric oxide of the supraoptic nucleus influences the salivary secretion, sodium renal excretion, urinary volume and arterial blood pressure induced by pilocarpine. *Life Sciences* 74 1593–1603.
54. Sanchez, C., Méier, E., 1993. Central and peripheral mediation of hypothermia, tremor and salivation induced by muscarinic agonists in mice. *Pharmacol. Toxocol.* 72, 262-267.
55. Sato, N., Honda, E., Haga, K., Yokoto, M., Inenaga, K., 2006. Pilocarpine-induced Salivation and Thirst in Conscious Rats. *J. Dental Res.* 85, 64-68.
56. Takakura, A.C.T., Moreira, T.S., Laitano, S.C., De Luca Jr., L.A., Renzi, A., 2003. Central muscarinic receptors on pilocarpine-induced salivation. *J. Dental Res.* 82, 993-997.

57. Takakura, A.C.T., Moreira, T.S., De Luca Jr., L.A., Colombari D.S.A., Renzi, A., Menani, J.V., 2004. Biphasic cardiovascular responses induced by the cholinergic agonist pilocarpine injected peripherally in rats. XIV Reunião Annual da Fesbe, Aguas de Lindóia, SP. Abstract 02.001.
58. Takakura, A.C.T., Moreira, T.S., De Luca Jr., L.A., Renzi, A., Menani, J.V., Colombari, E., 2005. Effects of AV3V lesion on pilocarpine- induced pressor response and salivary gland vasodilation. *Brain Res* 1055, 111-121.
59. Tice, M.A.B., Hashemi, T., Taylor, L.A., McQuade, R.D., 1996. Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. *Dev. Brain Res.* 92, 70–76.
60. Zhice Xu , Elizabeth Pekarek, Jianyi Ge, Jiaming Yao, 2001. Functional relationship between subfornical organ cholinergic stimulation and cellular activation in the hypothalamus and AV3V region. *Brain Research* 922, 191–200.
61. Zubieta, J.K., Frey, K.A., 1993. Autoradiographic mapping of M₃ muscarinic receptors in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 415–422.
62. Wirtshafter, D., 2004. Role of dopamine D1 receptors in the striatal and cortical fos expression induced by the muscarinic agonist pilocarpine. *European Journal of Pharmacology* 488, 85– 90.