

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JULIANA BEZERRA MEDEIROS DE LIMA

**Participação das vias intracelulares moduladas pelo monóxido de carbono na  
regulação do equilíbrio hidroeletrolítico**

Ribeirão Preto

2018

JULIANA BEZERRA MEDEIROS DE LIMA

**Participação das vias intracelulares moduladas pelo monóxido de carbono na  
regulação do equilíbrio hidroeletrolítico**

**Versão corrigida**

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação  
Serviço de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Lima, Juliana Bezerra Medeiros de  
Participação das vias intracelulares moduladas pelo monóxido de carbono na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico / Juliana Bezerra Medeiros de Lima; orientador: Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues. – 2018.  
152 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Versão Original

1. Monóxido de Carbono. 2. Hemoxigenase. 3. Núcleo Supraóptico. 4. Vasopressina. 5. Ocitocina. 6. Desidratação. 7. Óxido Nítrico. 8. Estresse Oxidativo. I. Antunes-Rodrigues, José, orient. II. Título.

Nome: LIMA, Juliana Bezerra Medeiros de

Título: Participação das vias intracelulares moduladas pelo monóxido de carbono na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor Ciências (área de concentração: Fisiologia).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2014/10060-3 e 2017/13653-3, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento desse estudo, o que o tornou possível.

Ao meu orientador e mestre Prof. Dr. José Antunes Rodrigues por me guiar durante todos esses anos, por sua sabedoria indubitável e pelo amor dedicado à ciência. Por ser o exemplo do cientista que quero me tornar, não há palavras para descrever o quanto sou grata por toda a partilha e cuidado que me foram oferecidos, não poderia ter escolhido melhor professor para essa jornada.

À Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias por ser exemplo de cientista e de dedicação ao ensino, com certeza, me mostrou que uma mulher pode alcançar excelência em ciência tanto quanto um homem. Agradeço por sempre estar disponível e ser um modelo a seguir.

Ao Prof. Dr. Wamberto A. Varanda e à Dra. Melina Pires da Silva por terem concordado com as minhas idéias e terem colaborado ativamente para esse estudo, sou uma cientista melhor por causa de vocês.

Ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por me receberem nesses 7 anos e me cederem subsídios e estrutura para a realização desse estudo.

Ao Prof. Dr. Matthew Zimmerman por me receber em seu laboratório e me ensinar tanto em tão pouco. Ao Prof. Dr. Irving Zucker por me abrir as portas de seu laboratório e por estar sempre presente, um exemplo de cientista cujo a ciência sempre foi o norte de sua carreira.

Ao *Cellular and Integrative Physiology Department* da *University of Nebraska Medical Center* e todos seus funcionários por me receberem tão bem e me cederem subsídios e estrutura para a realização desse estudo.

Aos amigos que reconheci pelo caminho, só fui capaz de concluir esse caminho por tê-los ao meu lado a todo momento, eu amo vocês. Agradeço ao Kadu pelo companheirismo nesse tempo de Ribeirão Preto. À minha família agradeço por estarem, de uma forma, ou de outra, sempre presente nos momentos cruciais.

Aos meus pais Ana e Julio agradeço por serem o meu alicerce e por me fazerem acreditar que eu sou capaz de tudo; aos meus irmãos Luana e Leonardo por serem meus fiéis escudeiros; aos meus avós Lucinda, Jairto, Expedito e Maria (*in memoriam*) por serem exatamente como são e me amarem exatamente como sou; e ao meu sobrinho Bernardo por trazer felicidade e ainda mais amor à nossa família.

## RESUMO

LIMA, Juliana Bezerra Medeiros de. **Participação das vias intracelulares moduladas pelo monóxido de carbono na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico.** 2018. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O monóxido de carbono (CO) tem um importante papel na fisiologia animal incluindo plasticidade sináptica, processos de memória e aprendizagem, inflamação e liberação de neuropeptídeos hipotalâmicos. Recentemente tem sido demonstrado que a liberação de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em resposta a alterações no balanço hidromineral pode ser modulada por esse neuromodulador gasoso, contudo, os mecanismos pelos quais essa modulação ocorre ainda não foram elucidados. Nesse sentido, nós mapeamos possíveis alvos intracelulares do CO pelos quais esse gás poderia afetar as respostas neuroendócrinas tais como as propriedades passivas de membrana de neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico (SON), via de sinalização da p38 MAPK, sistema do óxido nítrico (NO)/óxido nítrico sintase (NOS), participação de astrócitos hipotalâmicos e a resposta antioxidante a diferentes condições de hidratação: euhidratação, 24 e 48 horas de privação hídrica. Nós observamos que a inibição da formação central de CO reduziu o aumento das concentrações plasmáticas de AVP e OT induzido pela privação hídrica, bem como inibiu a atividade NOS nos grupos hidratado e desidratado por 48 horas (PH 48); enquanto a razão p-p38 MAPK/p38 MAPK foi aumentada pela doação central de CO em todas as condições de hidratação analisadas. Além do mais, nós demonstramos a expressão de HO-1, p38 MAPK e p-p38 MAPK em astrócitos hipotalâmicos. Ainda, observamos que camundongos silenciados para Nrf2 no SON tem a resposta à desidratação prejudicada. Esses dados indicam o papel do CO como uma molécula neuromodulatória nas respostas neuroendócrinas à desidratação podendo exercer sua função via resposta antioxidante em tempo mais curto de restrição hídrica e via sistema do NO em tempo mais prolongado.

Palavras-chave: Monóxido de Carbono. Desidratação. Hipotálamo. Óxido Nítrico. p38 MAPK. Vasopressina. Ocitocina.

## ABSTRACT

LIMA, Juliana Bezerra Medeiros de. **Participation of intracellular pathways modulated by carbon monoxide in the regulation of hydroelectrolytic balance.** 2018. 152 p. Thesis (Doctor of Philosophy, concentration area: Physiology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Carbon monoxide plays important roles in animal physiology including synaptic plasticity, learning and memory processes, inflammation and hypothalamic neuropeptide release. Recently it has been demonstrated that the AVP and OT release in response to changes in hydromineral balance can be modulated by this gaseous neuromodulator; however, the mechanisms by which this modulation occurs need to be elucidated. In order to answer this questioning, we evaluated the CO effect on neuroendocrine responses, SON magnocellular neurons passive membrane properties, p38 MAPK signaling, NO/NOS system and astrocytes participation in rats during control or 24/48 WD conditions. We observed that CO formation inhibition reduced the water deprivation-induced increase in plasma AVP and OT concentration and NOS activity in basal and 48 WD groups; while p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio was increased by central CO donation in both euhydrated and dehydrated conditions. Furthermore, we demonstrated HO-1, p38 MAPK and p-p38 MAPK expression in MBH astrocytes. These data indicate the CO role as neuromodulatory molecule in neuroendocrine responses to dehydration where it might play its biological functions through p38 MAPK phosphorylation and NOS activity in a water restriction longer period.

Key words: Carbon Monoxide. Dehydration. Hypothalamus. Nitric Oxide. p38 MAPK. Vasopressin. Oxytocin.

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2.2.1	Avaliar <i>in vivo</i> , em ratos Wistar submetidos à privação hídrica: .....	20
2.2.2	Avaliar <i>ex vivo</i> , em fatias hipotalâmicas de ratos Wistar contendo o SON:.....	21
2.2.3	Avaliar <i>in vitro</i> , na cultura primária de astrócitos hipotalâmicos.....	21
2.2.4	Avaliar <i>in vivo</i> , em camundongos C57BL/6J submetidos à privação hídrica: .	21
2.2.5	Avaliar <i>ex vivo</i> , em camundongos C57BL/6J submetidos a privação hídrica: .	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1	Animais .....	23
3.2	Drogas .....	24
3.2.1	Inibidor da HO e doador de CO.....	24
3.2.2	Inibidores de Sinapse .....	24
3.2.3	Vetores Virais .....	24
3.3	Protocolos <i>in vivo</i> .....	26
3.3.1	Modelo Animal: Rato Wistar.....	26
3.3.2	Modelo Animal: Camundongo Nrf2 <sup>Flox/Flox</sup> .....	36
3.4	Protocolos <i>ex vivo</i> .....	40
3.4.1	Modelo Animal: Rato Wistar (80-100 g).....	40
3.4.2	Modelo Animal: Camundongo C57BL/6J.....	44
3.5	Protocolo <i>IN viTRo</i> .....	45
3.5.1	Modelo Animal: Rato Wistar neonato (1-2 dias).....	45
3.6	Análise Estatística .....	48
3.7	PROCOLOS EXPERIMENTAIS .....	49
3.7.1	Protocolo I. Avaliação das propriedades passivas de neurônios magnocelulares	



do núcleo supraóptico de ratos Wistar machos de 80 a 100 .....	49
3.7.2 Protocolo II. Avaliação dos efeitos da privação hídrica de 24 e 48 horas em ratos Wistar adultos jovens tratados com injeção intracerebroventricular de ZnDPBG ou CORM-3 ou respectivos veículos (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ou CORM-3 <sub>Inativado</sub> ).....	50
3.7.3 Protocolo III. Avaliação dos efeitos da estimulação hipertônica sobre o imunorreatividade de astrócitos hipotalâmicos a p38 MAPK, p-p38 MAPK e HO-1 de ratos Wistar neonatos .....	52
3.7.4 Protocolo IV. Avaliação dos efeitos da privação hídrica de 24 e 48 horas em camundongos sob deleção condicional de Nrf2 no núcleo supraóptico .....	53
4 RESULTADOS .....	56
4.1 Protocolo I. Avaliação das propriedades passivas de neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico de ratos wistar machos.....	56
4.2 Protocolo II. Avaliação dos efeitos da privação hídrica de 24 e 48 horas em ratos Wistar adultos jovens tratados com injeção intracerebroventricular de ZnDPBG ou CORM-3 ou respectivos veículos (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ou CORM-3 <sub>Inativado</sub> ). .....	59
4.2.1 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre o hematócrito e concentração plasmática de proteínas induzidos por diferentes períodos de desidratação.....	59
4.2.2 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre as concentrações plasmáticas AVP, OT, ANP, CORT e ANG II induzidos por diferentes períodos de desidratação .....	60
4.2.3 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre a atividade das enzimas HO e NOS hipotalâmicas induzidas por diferentes períodos de desidratação.....	63
4.2.4 Efeito de diferentes períodos de privação hídrica sobre a atividade da aconitase e da produção de peróxido de hidrogênio hipotalâmicos.....	64
4.2.5 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre a expressão gênica de HO-1, nNOS, Nrf2, AT1R, Gss, Gclc e Gclm no SON induzida por diferentes períodos de desidratação.....	65
4.2.6 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre a expressão proteica de p38 MAPK e p-p38 MAPK no SON induzida por diferentes	

períodos de desidratação .....	72
4.2.7 Efeito da inibição da formação central de CO sobre a expressão proteica de HO-1, nNOS e GFAP no SON induzida por diferentes períodos de desidratação .....	74
4.3 Protocolo III. Avaliação dos efeitos da estimulação hipertônica sobre o imunorreatividade de astrócitos hipotalâmicos a p38 MAPK, p-p38 MAPK e HO-1 de ratos Wistar neonatos.....	76
4.4 Protocolo IV. Avaliação dos efeitos da privação hídrica de 24 e 48 horas em camundongos sob deleção condicional de Nrf2 no núcleo supraóptico .....	77
5 DISCUSSÃO.....	86
6 CONCLUSÃO.....	98

## **INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

Para que permaneça vivo, o organismo necessita manter em uma faixa limitada a concentração de eletrólitos e o volume de água do meio interno, situação denominada homeostase hidroeletrólítica. Para isso, existe a regulação tônica do equilíbrio hidrossalino, a fim de manter a osmolalidade do meio extracelular compatível à vida. O sódio ( $\text{Na}^+$ ) é um constituinte essencial do compartimento extracelular e fator determinante da osmolalidade plasmática, bem como da manutenção do volume do líquido extracelular (LEC). Este íon constitui o principal carreador do fluxo de água entre os compartimentos extra (intravascular e intersticial) e intracelular (LIC) (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

A regulação da homeostase hidroeletrólítica envolve principalmente estruturas do sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso autônomo, sistema cardiovascular, sistema neuroendócrino e rins (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

Os estímulos que deflagram respostas às alterações de concentração iônica e de volume plasmático são provenientes, basicamente, de três classes de receptores sensíveis a essas alterações: a) osmorreceptores, b) receptores de  $\text{Na}^+$  e c) barorreceptores e receptores de volume.

Os primeiros estão presentes em estruturas cerebrais que, em conjunto, são denominados órgãos circumventriculares. Dentre eles, destacam-se o órgão subfornicial (SFO), o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), os quais fazem parte da região da lâmina terminal<sup>1</sup>. Características como a ausência de barreira hematoencefálica e o íntimo contato com o liquor, fazem dessas estruturas essenciais no que se diz respeito à integração de informações periféricas e o início da resposta efetora. Dessa forma, o aumento da osmolalidade do LEC resulta na despolarização das células presentes nesses órgãos levando à consequente ativação dos neurônios nos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) e, por fim, à liberação hormonal (Trudel & Bourque, 2003). Terminações osmosensíveis são encontradas também na periferia, em íntima associação com vasos sanguíneos gastrointestinais, renais e hepáticos (Aires, 2008). Além disso, é sabido que na ausência de conexões sinápticas os neurônios magnocelulares do SON podem sofrer alterações de excitabilidade durante mudanças de osmolalidade, ou seja, podem ser considerados osmosensíveis (Mason, 1980; Oliet & Bourque, 1992).

---

<sup>1</sup> A parede anterior do terceiro ventrículo é a região encefálica conhecida como “lamina terminalis”. A lamina terminalis é composta pela SFO, órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT, outro órgão circumventricular), e o núcleo mediano pré-óptico (MnPO) (Verbalis, 2007).

Os receptores para  $\text{Na}^+$ , por sua vez, estão presentes em estruturas cerebrais como SFO e SON e são sensíveis especificamente ao sódio, sendo assim um sistema mais sofisticado e especializado no que se diz respeito à percepção das alterações desse íon no organismo (Denton *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2000; Noda, 2007).

A terceira classe de receptores (pressão/barorreceptores e receptores de volume) está presente no arco aórtico (monitorando o fluxo para a circulação sistêmica), no seio carotídeo (monitorando o fluxo sanguíneo para a cabeça), nas arteríolas renais e na região cardiopulmonar (Johnson & Thunhorst, 1997; Fitzsimons, 1998). Essas estruturas respondem ao estiramento da parede arterial decorrente da passagem da onda de pulso (barorreceptores) ou ao enchimento das câmaras cardíacas (receptores de volume), sendo, portanto, sensíveis a estímulos mecânicos. A estimulação destas terminações ativa o núcleo do trato solitário (NTS) via aferência vagal, localizado na área bulbar do tronco cerebral, estímulo que, posteriormente, atinge o SON e o PVN (determinando a secreção hormonal), bem como a região da lâmina terminal e áreas límbicas e corticais (determinando a ativação de respostas comportamentais efectoras) (De Luca *et al.*, 2007).

De forma integrada, esses três conjuntos de receptores monitoram momento-a-momento a dinâmica osmótico-volumétrica e enviam informações para áreas específicas do SNC (Cunningham *et al.*, 2004) gerando respostas integradas que modulam: (a) a sede e/ou o apetite ao sal, (b) a atividade simpática, (c) a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona e (d) a secreção de arginina vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) pela neurohipófise, e do peptídeo natriurético atrial (ANP) pelo coração (McCann *et al.*, 1994; McCann *et al.*, 2002; Chriguier *et al.*, 2003; McCann *et al.*, 2003; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

Os neurônios magnocelulares do PVN e SON são grandes células neurais que têm seus terminais nervosos localizados na porção posterior da hipófise, a partir de onde os hormônios sintetizados no hipotálamo são liberados para a circulação sistêmica (Harris, 1951). Os neurônios magnocelulares são responsáveis pela síntese de dois hormônios essenciais no controle da homeostase hidroeletrolítica, já mencionados anteriormente: AVP e OT. Esses hormônios são liberados quando há alterações de volume e/ou osmolalidade do líquido extracelular, a fim de promover respostas efectoras que regulem o balanço de sódio e água no organismo. A elevação da tonicidade do líquido extracelular, induzida pela ingestão de solução hipertônica ou pela privação hídrica, aumenta a expressão de mRNA para AVP e OT no PVN e SON (Glasgow *et al.*, 2000), bem como aumenta a expressão da proteína c-Fos (que pode ser considerada um marcador da atividade neuronal) tanto nestes neurônios, como

também em neurônios localizados no OVLT, MnPO e SFO (Mckinley *et al.*, 1994; Godino *et al.*, 2005).

A liberação de AVP e OT é regulada por inúmeros neurotransmissores, incluindo impulsos sinápticos excitatórios glutamatérgicos e inibitórios GABAérgicos (Stern & Ludwig, 2001), bem como peptídeos opioides (Robertson, 1992). Mais recentemente, foi demonstrado que o monóxido de carbono (CO) possui uma ação modulatória na atividade dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos (Gomes *et al.*, 2004; Gomes, D. A. *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012).

O CO é um gás incolor, inodoro, tóxico, dicotômico e estável (devido à tripla ligação entre o átomo de carbono e o de oxigênio), resultante de processos naturais que ocorrem na atmosfera, em plantas, nos oceanos (plâncton, algas) e durante a atividade vulcânica e também de atividades humanas, como processos industriais, queimadas e materiais agrícolas (Raub *et al.*, 2000; Wu & Wang, 2005).

Em 1857, Claude Bernard (Bernard, 1857) chamava a atenção para os importantes efeitos nocivos do CO quando inalado que, ao se ligar reversivelmente à hemoglobina (Haldane, 1895), culminaria em hipóxia tecidual. Desde então milhares de publicações discutem os devastadores efeitos do CO como um agente tóxico.

Contudo, o fato de o cérebro produzir CO em quantidades próximas às aquelas observadas no baço (órgão responsável pela degradação das hemoglobinas senis e, consequentemente com maior produção de CO) (Maines, 1997) e a evidência da presença da enzima heme oxigenase (HO, responsável pela maior volume de produção desse gás no organismo) em diversas regiões cerebrais (Verma *et al.*, 1993) fundamentaram a atribuição, há cerca de 25 anos, de uma segunda e importante função ao CO, a de possível mensageiro neural.

O CO é produzido endogenamente como consequência de dois processos distintos (Wu & Wang, 2005), um enzimático e outro não enzimático: 1) do catabolismo oxidativo das enzimas HO sobre os grupamentos heme provenientes de qualquer hemoproteína, resultando na degradação dessa estrutura em quantidades equimolares de CO, biliverdina e  $Fe^{2+}$  (Maines, 1997), e 2) da peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados (Wolff, 1976; Rodgers *et al.*, 1994; Vreman *et al.*, 2004), sendo o segundo processo sem aparente relevância fisiológica.

Esta enzima se apresenta sob três isoformas distintas: HO-1, HO-2 e HO-3 (Maines, 1997). As enzimas HO-2 e HO-3 são as isoformas constitutivas, enquanto a HO-1 é o subtipo induzido. HO-1 e HO-2 são produtos da expressão de genes distintos, enquanto a HO-3

parece ser um subproduto, splicing alternativo, de expressão do gene da HO-2 (Cruse & Maines, 1988; Mccoubrey *et al.*, 1997).

A isoforma induzida (HO-1), também conhecida e descrita primariamente como heat-shock protein (HSP) 32, é expressa em abundância em tecidos envolvidos no metabolismo das hemácias e da hemoglobina, como o baço e fígado, e pode ser induzida na maioria dos tecidos (Zakhary *et al.*, 1996). Além disso, ela é sensível a uma gama de agentes e estímulos que causam estresse oxidativo e condições patológicas, não há descrita atualmente na literatura enzima que responda a tantos diferentes estímulos como a HO-1. Já a isoforma HO-2 é responsiva apenas a glicocorticoides (Maines, 1997), sendo predominantemente expressa no cérebro e testículos, com atividade menos relevante no endotélio, segmento distal do néfron, fígado, plexo mioentérico do intestino e outros tecidos (Ewing & Maines, 1992; Maines, 1993; Verma *et al.*, 1993; Zakhary *et al.*, 1996). Quanto à HO-3, pouco se tem discutido na literatura sobre seu potencial biológico e ainda não foi descrita função específica para essa isoforma (Wu & Wang, 2005).

Além do CO, durante a oxidação do grupamento heme, dois outros subprodutos são formados: o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e a biliverdina, sendo o  $\text{Fe}^{2+}$  rapidamente sequestrado pela ferritina. Já a biliverdina (Bv), é rapidamente reduzido pela biliverdina redutase a bilirrubina (Br), sendo esse o antioxidante endógeno mais abundante em tecidos de mamíferos (Doré *et al.*, 1999).

Uma série de evidências experimentais tem demonstrado a importância do CO no controle dos sistemas vascular, cardíaco, neuronal, imune, respiratório, reprodutor, gastrointestinal, renal, hepático e endócrino (Wu & Wang, 2005; Motterlini & Otterbein, 2010). Mais recentemente, seu papel como neuromodulador tem sido amplamente estudado e discutido. A expressão das isoformas HO-2 e HO-1 foi demonstrada nos núcleos hipotalâmicos SON e PVN, conhecidos por controlar a liberação de OT, AVP (Ewing & Maines, 1992; Vincent *et al.*, 1994).

Vincent e colaboradores (Vincent *et al.*, 1994) demonstraram que as populações neuronais presentes no PVN e SON são imunorreativas à HO. Ainda nesse sentido, Turnbull e colaboradores (Turnbull *et al.*, 1998) demonstraram que o CO produzido endogenamente estimula a liberação de AVP do hipotálamo de rato, bem como Kostoglou-Athanassiou e colaboradores (Kostoglou-Athanassiou *et al.*, 1996) demonstraram o mesmo padrão para a secreção de OT. Várias outras evidências experimentais sugerem que o sistema HO-CO esteja envolvido na regulação neuroendócrina. Em nosso laboratório, estudos *in vitro* conduzidos por Gomes e colaboradores (Gomes *et al.*, 2004; Gomes, Dayane a. *et al.*, 2010)

demonstraram que o sistema nitrérgico (óxido nítrico – NO) parece interagir com o sistema COérgico no controle da liberação de OT pelo hipotálamo médio basal (HMB) em resposta às variações da osmolalidade do meio de incubação, efeito semelhante ao que ocorre com a secreção de ANP nas mesmas condições experimentais. Ainda, Reis e colaboradores (Reis *et al.*, 2012) demonstraram aumento na expressão da HO-1 em neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos dos núcleos PVN e SON de ratos submetidos à privação hídrica de 48 horas (PH 48), além disso, utilizando o método de “*whole cell patch clamp*” em neurônios do SON obtidos de animais desidratados, estes autores observaram, ainda, diminuição na taxa de disparos destes neurônios, efeito esse potencializado pela adição de cromo mesoporfirina (CrMP), um inibidor da HO, ao meio de superfusão. Ademais, achados recentes obtidos em protocolos *in vivo* nesse laboratório (ainda não publicados) demonstraram que a formação de CO é necessária para que a integridade da resposta hormonal e neuronal à privação de 24 horas (PH 24) e , ainda, que a ação desse gás durante a PH 24 parece ocorrer de forma independente de NO (Lima *et al.*, dados não publicados). Nesse, foi observado que, em ratos euhidratados, a inibição central da HO resultou em diminuição da concentração plasmática de OT, sugerindo que a atividade da HO possa alterar de maneira distinta a atividade de MNCs dependendo de seu fenótipo, no entanto, havendo a possibilidade de que a interação desses sistemas gasosos aconteça a partir da PH48h, atribuindo um possível caráter tempo-dependente a essa interação (já especulada por Kostoglou-Athanassiou e colaboradores em 1998).No mais, apesar das evidências apontando uma ação direta do CO na secreção de AVP e OT, dados da literatura sugerem um fator tempo-dependente ou hidratação-dependente na interação com o sistema nitrérgico, como demonstrado por Reis e colaboradores (Reis *et al.*, 2012) em animais submetidos à PH 48, podendo essa influenciar diretamente as respostas efetoras moduladas pelo CO.

Vista a modulação do CO sobre a liberação hormonal de AVP e OT, surge o questionamento sobre qual a via de ação desse gás sobre os MNCs. Nesse sentido, a principal e mais discutida ação do CO é aquela que decorre da estimulação da atividade da guanilato ciclase solúvel (sGC) ao se ligar ao domínio heme da enzima promovendo o aumento da produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Ma *et al.*, 2007), molécula que, por fim, parece promover a ação biológica deste gás sobre diferentes sistemas, principalmente no que se diz respeito à modulação da atividade neuronal (Brüne *et al.*, 1990; Kharitonov *et al.*, 1995). Além da sGC, é sabido que o CO pode exercer seus efeitos através de vias independentes de GMPc, tais como aumentar a atividade dos canais de grande condutância de



potássio (BK) de alterar a fosforilação da proteína quinase 38 ativada por mitógeno (p38 MAPK) (Kim *et al.*, 2006), ou interagir com o sistema NOS-NO (White & Marletta, 1992).

A ação do CO sobre diferentes canais iônicos é um tema relativamente recente na literatura (para revisão ver Wilkinson & Kemp, 2011). Nesse contexto, é sabido que os canais BK são expressos no músculo liso, cérebro, pâncreas e bexiga (Ghatta *et al.*, 2006) e, além disso, foi hipotetizada uma ação estimulatória direta do CO sobre esses (Wang, Wu, *et al.*, 1997) em células vasculares do músculo liso (Wang, Wang, *et al.*, 1997), sendo sua ação exercida através da subunidade  $\alpha$  do canal (relacionada ao poro) (Jaggar *et al.*, 2005).

Quanto à p38 MAPK, uma proteína da superfamília das MAPK responsiva ao aumento da osmolalidade (Han *et al.*, 1994; Uhlik *et al.*, 2003) é descrita como um possível alvo intracelular do CO sendo os efeitos biológicos observados estímulo e sítio-específicos (Takeda & Ichijo, 2002).

Ainda, os sistemas mediados pelos moduladores óxido nítrico NO e CO apresentam similaridades que fundamentam a hipótese de interação. Ambos possuem isoenzimas constitutivas e induzíveis com propriedades químicas semelhantes, incluindo peso molecular, difusão e permeabilidade na membrana celular. No entanto, o NO é um radical livre e o CO um composto estável, devido às suas diferenças estruturais, o NO possui alta reatividade com meia vida curta e o CO possui reatividade mediana com meia vida mais prolongada, entretanto, os dois sistemas ativam a sGC e aumentam a concentração intracelular do segundo mensageiro GMPc (Foresti *et al.*, 1999). Estudos empregando a técnica de imunofluorescência revelaram a coexistência das enzimas HO e óxido nítrico sintase (NOS – enzima responsável pela clivagem de L-arginina em quantidades equimolares de citrulina e NO) (Palmer *et al.*, 1987), e também de HO e OT, HO e AVP no PVN e SON. Foi observado que em animais submetidos à privação hídrica de 48 horas, há um aumento da expressão da duas enzimas (HO e NOS) acompanhado de uma elevação do número de colocalizações entre a HO e os peptídeos OT e AVP (Reis *et al.*, 2015). Estes dados reforçam a hipótese de que possa haver interação dos sistemas HO e NO relacionada à modulação da liberação de AVP e OT. Desta forma, é proposto um equilíbrio dinâmico entre os dois sistemas que ainda parece estar em função tempo- ou hidratação-dependente, como citada anteriormente, onde a influência relativa de cada sistema na determinação das respostas efetoras é alterada em relação à extensão do estímulo.

Ainda, é sabido que a desidratação induz o aumento da angiotensina II (ANG II) plasmática, a qual se liga aos seus receptores principalmente no órgão subfornicial (SFO), um

componente circumventricular da parede anterior do terceiro ventrículo<sup>2</sup>. A ativação do SFO inicia uma cascata de eventos que leva a ativação do SON e PVN (Fitzsimons, 1979).

Essencialmente, existem 3 tipos de receptores de ANG II no sistema nervoso central (SNC) de roedores: AT<sub>1</sub>, o qual apresenta dois subtipos AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub>, e o do tipo 2 (AT<sub>2</sub>) (Iwai & Inagami, 1992; Sasamura *et al.*, 1992; Wright & Harding, 1994). Trabalhos prévios da literatura têm mostrado que camundongos *knockout* para AT<sub>1</sub> perdem sua habilidade de concentrar urina devido a uma concentração plasmática reduzida em condição basal, além disso eles não respondem, ou respondem de forma atenuada, à desidratação (Morris *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2001); no mais, outros pesquisadores reportaram que a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) no SFO é suficiente para induzir o comportamento ingestivo (Coble *et al.*, 2014), uma das respostas mais importantes à desidratação juntamente à secreção de AVP.

A ação da ANG II através da ativação de AT<sub>1</sub> está relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zimmerman *et al.*, 2002), ao passo que a expressão de AT<sub>1</sub> é redox-dependente e a superprodução de ROS poderia resultar em uma hiperestimulação das vias mediadas pela cascata de sinalização de AT<sub>1</sub> (Dikalov & Nazarewicz, 2013). Visto que a concentração plasmática de ANG II está elevada em ratos submetidos tanto à desidratação, o estresse oxidativo nessas áreas cerebrais (SFO, SON e PVN) poderia, portanto, estar envolvido na resposta a este estímulo. Somada à ação de ANG II nesses núcleos, há o fato de que camundongos deletados para HO-1 apresentam resposta diminuída ao estresse oxidativo (Poss & Tonegawa, 1997), supondo-se que a presença e atividade dessa enzima possam estar relacionadas à resposta antioxidante.

Até o momento, nós investigamos a ação de moléculas gasosas em regiões do SNC relacionadas ao balanço hidromineral, considerando suas funções principais na modulação da neurotransmissão pelos dois principais representantes: óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), dos quais as ações têm sido avaliadas por alguns grupos (para revisão: (Ruginsk *et al.*, 2015) ). Evidências indicam que essas moléculas poderiam estar envolvidas em processos que lidam com a sinalização redox quando o animal enfrenta um quadro de desidratação.

Uma das maneiras pelas quais o organismo responde ao estresse oxidativo é através da ativação fator de transcrição fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) através da

---

<sup>2</sup>Essa região tem uma alta densidade de receptores de angiotensina II do tipo 1(AT1), enzima conversora de angiotensina (ACE), células e terminais imunorreativos à ANG II e neurônios responsivos à ANG II (Allen *et al.*, 1998).

oxidação do Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), uma proteína repressora dissociando essas moléculas e tornando o Nrf2 ativo (Kobayashi *et al.*, 2004), e a função do Nrf2 é aumentar a produção celular de enzima de fase II<sup>3</sup>, uma delas é a HO-1. A expressão da HO-1 pode ser induzida por uma gama de estímulos, entre eles o Nrf2, que se liga ao seu sítio específico no elemento de resposta antioxidante (ARE) do gene *Hmox1* (Alam *et al.*, 1999). Além disso, já foi sugerido que o CO pode induzir a dissociação do complexo Keap1-Nrf2 (Wang *et al.*, 2011) ativando esse fator de transcrição.

Juntas, essas evidências sugerem um possível aumento no estresse oxidativo em áreas cerebrais relacionadas às respostas neuroendócrinas de animais submetidos à desidratação, assim, a observação da dinâmica da geração de ROS nessas áreas e a modulação do principal sistema antioxidante cerebral (glutathiona) são necessários para que se comprove essa teoria.

Dessa maneira, estudos em relação à forma como o CO atua intracelularmente para modular a liberação de AVP e OT frente a um estímulo osmótico são necessários para que se entenda a real função fisiológica desse gás quanto à regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico.

Nesse sentido, o entendimento da ação fisiológica do CO pode fornecer informações relevantes em relação a influência desse gás sobre a modulação da produção e secreção de hormônios responsáveis por controlar funções vitais, tais como a AVP e OT, uma vez que a manipulação farmacológica desse gás tem sido amplamente discutida e já é utilizada de forma experimental na clínica (Wu & Wang, 2005), podendo-se oferecer, assim, embasamento científico para a prevenção, por exemplo, de possíveis efeitos colaterais importantes. Além disso, esse estudo pode resultar em esclarecimento da relação entre os sistemas COérgico e nitrérgico no controle do equilíbrio hidrossalino pois apesar de amplamente discutido, os mecanismos e a dinâmica dessa relação ainda permanecem inconclusivos. No mais, o mapeamento do efeito do CO sobre diferentes possíveis alvos intracelulares como canais iônicos, p38 MAPK e resposta antioxidante podem ser a base de conhecimento para a ação multi-facetada desse gás que hora é dado como uma molécula danosa, hora dado como benéfico.

---

<sup>3</sup> Existem 3 tipos de enzimas metabolizadoras de fármacos (DMEs): as enzimas de fase I são responsáveis pela oxidação de xenobióticos/fármacos; as de fase II conjugam os produtos da ação enzimáticas das de fase I; as enzimas de fase III são, usualmente, transportadores que retiram das células os metabólitos finais (Zhang *et al.*, 2013).

**OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral aprofundar o conhecimento da ação do CO durante o estímulo osmótico de diferentes durações sobre a função dos seguintes possíveis alvos intracelulares desse gás: propriedades eletrofisiológicas de neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico, interação com o sistema do óxido nítrico, p38 MAPK, células astrocíticas e sinalização redox, bem como a possível interação tempo-dependente e/ou hidratação/dependente dos dois sistemas gasosos (CO-NO), no controle de aspectos neuroendócrinos, principalmente concentrações plasmáticas de AVP e OT, relacionados ao equilíbrio hidroeletrolítico em animais submetidos a privação hídrica de 24 e 48 horas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho se propôs a avaliar:

#### 2.2.1 Avaliar *in vivo*, em ratos Wistar submetidos à privação hídrica:

Os efeitos da administração central de inibidor da hemoxigenase (ZnDPBG) ou doador de monóxido de carbono (CORM-3), em animais submetidos, ou não, a 24 ou 48 horas de privação hídrica, sobre:

- Os parâmetros bioquímicos plasmáticos tais como hematócrito e proteína plasmática;
- A concentração hormonal plasmática de AVP, OT, ANP, CORT e ANG II;
- A expressão proteica de p38 MAPK e p-p38 MAPK do SON;
- A expressão gênica de HO-1, nNOS, Nrf2, Gss, Gclc, Gclm, AT1r.
- A expressão qualitativa de GFAP, nNOS e HO-1 no SON;
- A atividade das enzimas NOS do SON;
- A atividade das enzimas HO do SON;
- A atividade da enzima aconitase;
- A geração de peróxido de hidrogênio.

### **2.2.2 Avaliar *ex vivo*, em fatias hipotalâmicas de ratos Wistar contendo o SON:**

Os efeitos da administração de inibidor da hemoxigenase (ZnDPBG) ou doador de monóxido de carbono (CORM-3), na presença ou ausência de bloqueadores sinápticos, sobre:

- As seguintes propriedades passivas de membrana de neurônios MNCs do SON:
  - Potencial de membrana;
  - Frequência de potenciais de ação;
  - Resistência de entrada.
- O fenótipo dos neurônios estudados.

### **2.2.3 Avaliar *in vitro*, na cultura primária de astrócitos hipotalâmicos**

Os efeitos da variação da osmolalidade nos astrócitos hipotalâmicos cultivados, sobre:

- A expressão de HO-1;
- A expressão de p38 MAPK;
- A expressão de p-p38 MAPK.

### **2.2.4 Avaliar *in vivo*, em camundongos C57BL/6J submetidos à privação hídrica:**

Os efeitos do silenciamento condicional de Nrf2 no SON, em animais submetidos a 24 ou 48 horas de privação hídrica, sobre:

- A ingestão de água;
- Peso corporal;
- Os parâmetros bioquímicos plasmáticos tais como hematócrito e osmolalidade plasmática;
- A expressão gênica de Nrf2, HO-1, AVP, NQO1, SOD1 e SOD2;
- A expressão qualitativa de eGFP, Nrf2 e HO-1 no SON.

### **2.2.5 Avaliar *ex vivo*, em camundongos C57BL/6J submetidos a privação hídrica:**

Os efeitos do silenciamento condicional de Nrf2 no SON, em animais submetidos a 24 ou 48 horas de privação hídrica, sobre:

- O conteúdo de ânion superóxido de SON.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos pesando entre 250 e 280 gramas (aproximadamente 60 dias) foram utilizados para a maioria dos experimentos desenvolvidos no Brasil. No entanto, para os protocolos fisiológicos, os animais pesavam de 80 a 100 gramas (25 a 30 dias), e para o protocolo de cultura primária de astrócitos foram utilizados ratos neonatos (1 a 2 dias). Todos os animais eram provenientes do biotério central do campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP em gaiolas coletivas (3 animais por caixa para os estudos de eletrofisiologia ou 5 animais por caixa para os demais), aclimatados à temperatura ambiente controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz: 06 - 18h) e livre acesso à água e alimento. Os protocolos experimentais que compõem o estudo foram submetidos à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e aprovados sob o número 006/2014-1.

Camundongos C56BL/6J pesando entre 20 e 25 gramas (aproximadamente 60 dias) foram utilizados nos protocolos experimentais desenvolvidos nos EUA. Camundongos selvagens (*wild-type*) foram obtidos na companhia THE JACKSON LABORATORY© (Bar Harbor, Maine, EUA), enquanto os camundongos transgênicos  $\text{Nrf2}^{\text{Flox/Flox}}$  foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr. Inving H. Zucker (Omaha, Nebraska, EUA). Os animais  $\text{Nrf2}^{\text{Flox/Flox}}$  foram originalmente desenvolvidos pelo Dr. Shyam Biswal na Johns Hopkins University (Baltimore, Maryland, EUA). O gene  $\text{Nrf2}$  nos camundongos  $\text{Nrf2}^{\text{Flox/Flox}}$  foi modificado através da inserção de 2 sequências loxP flanqueando o Exon 5 do gene. Os experimentos realizados nos EUA foram submetidos à Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da University of Nebraska Medical Center (UNMC) e aprovados sob o número 17-084-10FC.



## 3.2 DROGAS

### 3.2.1 Inibidor da HO e doador de CO

Como principais ferramentas farmacológicas utilizadas nesse estudo estão um inibidor da HO e um doador de CO. O Zn(II) deuteroporfirina IX 2,4-bis-etileno glicol (ZnDPBG; Frontier Scientific, #ZnD630-9), inibidor inespecífico da atividade enzimática da HO, foi diluído em 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> imediatamente antes de sua injeção, os animais controle foram submetidos à injeção intracerebroventricular de 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O Tri-carbonil-cloro-(glicinato)-rutênio (II) (CORM-3; Sigma-Aldrich, #SML0496), molécula doadora de monóxido de carbono, da mesma forma que o ZnDPBG, foi diluído imediatamente antes de seu uso, sendo uma alíquota dissolvida no dia precedente ao experimento para ser utilizada como veículo (CORM-3<sub>Inativado</sub>). Doador e veículo, foram diluídos em salina 0,9% estéril.

### 3.2.2 Inibidores de Sinapse

Além dessas, nos protocolos eletrofisiológicos realizados na presença de bloqueadores sinápticos foram utilizados:

- D-AP5 10 µM: D(-)-2-Amino-5-ácido fosfonopentanóico, Sigma-Aldrich, #A8054, antagonista de receptor glutamatérgico N-metil D-Aspartato (NMDA);
- DNQX 30 µM: 6,7-Dinitroquinoxalina-2,3(1H,4H)-diona, Sigma-Aldrich, #D0540, antagonista de receptor glutamatérgico não-NMDA;
- PICRO 30 µM: Picrotoxina, Sigma-Aldrich, #P1675, antagonista de receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA).

### 3.2.3 Vetores Virais

Para os protocolos de deleção seletiva de Nrf2 foram utilizados dois vetores adenovirais: Ad-Cre (Ad5CMVCre-eGFP) e Ad-eGFP (Ad5CMVeGFP) obtidos do Centro de Vetores Virais da Universidade de Iowa (Viral Vector Core – VVC / University of Iowa) (Iowa, EUA). A expressão de ambos eGFP e Cre Recombinase estão sob controle do promotor CMV (citomegalovírus) e ambos expressam como proteína *reporter* a proteína fluorescente verde melhorada (eGFP). Em relação ao adenovírus que expressa a enzima Cre, a

mesma está fusionada à eGFP, titulação de  $1 \times 10^{10}$  a  $5 \times 10^{10}$  pfu/mL, sendo 200 nL injetados em cada núcleo (injeção bilateral), Ad-eGFP apresentava a mesma titulação foi obtida, e o mesmo volume foi injetado. Detalhes da construção e obtenção dos plasmídeos e vetores virais estão disponibilizados pelo fabricante (Anderson *et al.*, 2000).

### **3.3 PROTOCOLOS *IN VIVO***

#### **3.3.1 Modelo Animal: Rato Wistar**

##### **3.3.1.1 Anestesia Geral**

Os animais submetidos à manipulação cirúrgica foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) (Mecawi *et al.*, 2010). Após o término das cirurgias, os animais receberam dose profilática de antibiótico (50.000 unidades de penicilina G) via intramuscular.

##### **3.3.1.2 Implante de Cânula Intracerebroventricular**

Para a realização das injeções centrais, foi implantada uma cânula no ventrículo lateral direito dos animais, sete dias antes dos experimentos de acordo com metodologia previamente descrita por (Antunes-Rodrigues & Mccann, 1970). Resumidamente, com o auxílio de um aparelho estereotáxico (Kopf), os animais anestesiados receberam um implante de cânula guia de aço inoxidável (10 mm de comprimento, 0,6 mm de diâmetro externo e 0,4 mm de diâmetro interno), que foi fixada por meio de parafusos e resina de acrílico autopolimerizável sobre a calota craniana com base nas seguintes coordenadas anatômicas do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1997):

Ântero-Posterior: 0,5 mm posterior ao bregma;

Látero-Lateral: 1,5 mm à direita ao bregma;

Dorso-Ventral: 3,6 mm abaixo da calota craniana.

##### **3.3.1.3 Análises Plasmáticas**

###### **3.3.1.3.1 Extração e Dosagem de AVP e OT**

Os procedimentos foram realizados de acordo com técnicas previamente descritas (Haanwinckel *et al.*, 1995; Elias *et al.*, 1997).

Para as dosagens de AVP e OT, amostras de sangue do tronco foram coletadas em frascos contendo heparina (50 µL/mL de sangue) e centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A extração dos peptídeos foi realizada a partir de 1 mL de plasma (sobrenadante da centrifugação do sangue total), ao qual foram adicionados 2 mL de acetona gelada,

procedendo-se agitação vigorosa por 30 segundos e, então, centrifugação a 2500 rpm por 30 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado em tubo limpo e a ele foram adicionados 2 mL de éter de petróleo. O tubo foi tampado, agitado em vórtex por 30 segundos e mantido em repouso por 5 minutos. A fase superior foi descartada, e a fase inferior liofilizada e utilizada para a realização do radioimunoensaio (RIE).

O princípio do RIE utilizado é a competição entre o hormônio contido na amostra (não-marcado) e o hormônio radioativo adicionado à mesma (traçador) pela ligação com o sítio de ligação do anticorpo primário, dessa maneira, quanto maior a concentração de hormônio originalmente presente na amostra, menor é a radioatividade do tubo de ensaio (Mantovani, 2011). Para o RIE de AVP e OT, cada amostra liofilizada foi reconstituída em 250 µL de tampão próprio e toda as amostras foram mensuradas em duplicata (duas replicatas de 100 µL cada). Foram utilizados como primeiro anticorpo o anti-AVP (coelho – #RAS8103 – Peninsula Laboratories) e o anti-OT (coelho – #HIC8152 – Peninsula Laboratories) e, além disso, adicionada a cada amostra quantidade conhecida de hormônio marcado com <sup>125</sup>I (2000 CPM/100 µL AVP e 4000 CPM/100 µL OT). Após incubação, foi adicionado o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho – produção própria). Ao fim das 24 horas, foi adicionado 1 mL de polietileno glicol (PEG) 6,25% aos tubos. O sobrenadante foi descartado, enquanto a fase inferior foi submetida à leitura de radioatividade gama (Packard®). A sensibilidade dos ensaios e o coeficiente de variação intra-ensaio foram 0,1 pg/mL e 5,9% para AVP e 0,1 pg/mL e 1,9% para OT.

### **3.3.1.3.2 Extração e Dosagem de CORT**

Os procedimentos foram realizados de acordo com técnica previamente descrita por Haack e colaboradores (1979).

A extração da corticosterona foi realizada a partir de 25 µL de plasma (obtido do sangue coletado com heparina), aos quais foi adicionado 1 mL de álcool etílico absoluto. As amostras foram agitadas por 30 segundos e, então, centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e liofilizado.

Para o RIE, as amostras foram reconstituídas com 2,5 mL de tampão próprio e cada amostrada foi analisada em duplicata (duas replicatas de 500 µL). Foram adicionados anticorpo anti-Corticosterona (coelho – #C8784-100TST – Sigma-Aldrich) Corticosterona marcada com <sup>3</sup>H (Corticosterona [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)] – #ART 0652; American Radiolabeled Chemicals, Sain Louis, MO, USA). Após a incubação, uma solução de Carvão-Dextran 0,5/0,05% foi adicionada às amostras a fim de se obter a separação da fração ligada ao

anticorpo. O sobrenadante foi coletado em tubo limpo e a ele foram adicionados 2 mL de líquido de cintilação. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 2 horas em ambiente escuro. A radioatividade foi determinada em um aparelho Tri-Carb® 2910 TR (PerkinElmer). A sensibilidade dos ensaios foi de 31,25 µg/dL, os coeficientes de variação intra-ensaio foram 5,20% e 2,34% e o inter-ensaio foi 3,33%.

### **3.3.1.3.3 Extração e dosagem de ANG II e ANP**

Para a mensuração das concentrações plasmáticas de ANG II e ANP, amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos contendo inibidores de proteases: 1 mM Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF - 10µL/mL de sangue); 1 mM Pepstatina A (10 µL/mL de sangue); Ácido Etileno-diamino Tetra-Acético 10 % (EDTA – 10 µL/mL de sangue); 1mM Para-hidroxi-mercúrio-benzoato (10 µL/mL de sangue) e 30 mM Fenantrolina (50 µL/mL de sangue). O sangue foi centrifugado (20 minutos, 3000 rpm, 4 °C), o plasma coletado e a extração foi realizada por meio de técnica de cromatografia, a partir de 1 mL de plasma utilizando-se colunas C-18 ativadas com ácido trifluoroacético (C-18 sorbent - Sep-Column – #Y1000; Laboratórios Península, San Carlos, CA, USA). A 1 mL de plasma foi adicionado 1 mL de Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1% (Solução A) e os tubos tampados, agitados em vórtex por 30 segundos e centrifugados a 3000 rpm, 4° C por 15 minutos. Ao passo que as colunas C-18 foram ativadas com 4 mL de Acetonitrila 60% em TFA 0,1 % (Solução B) e, logo após, lavadas com 20 mL de Solução A. Após a ativação e lavagem da coluna, o sobrenadante proveniente do plasma acidificado e centrifugado foi vertido na mesma, nesse passo as moléculas de interesse ficaram retidas por adsorção na coluna C-18. Após a finalização da passagem do sobrenadante, a coluna foi lavada novamente com 20 mL de Solução A e, então, os hormônios foram eluídos em 3 mL de Solução B e o líquido resultante foi coletado em tubo limpo, liofilizado e armazenado a -20° C até o momento do ensaio. No dia do ensaio, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 400 µL de tampão específico. As dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaio de duplo-anticorpo, como o apresentado anteriormente para OT, AVP e CORT, utilizando técnicas previamente descritas (Haack *et al.*, 1979; Gutkowska *et al.*, 1984). A sensibilidade dos ensaios e o coeficiente de variação intra-ensaio foram respectivamente 0,75 pg/tubo e 6,91% para ANP e 0,78 pg/tubo e 0,74% para ANGIIL.

#### **3.3.1.3.4 Determinação do Hematócrito**

O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito. O sangue do tronco foi coletado em um microcapilar heparinizado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. A leitura foi realizada em seguida com o auxílio de régua, sendo a medida em cm da coluna de células vermelhas dividida pela altura total em cm do sangue coletado, multiplicado por 100. Os valores obtidos foram expressos em porcentagem (%) de glóbulos vermelhos.

#### **3.3.1.3.5 Dosagem de Proteína Plasmática**

A determinação da proteína plasmática foi realizada pela técnica de Bradford (Bradford, 1976). 10 µL de plasma, obtido de sangue coletado em tubo heparinizado, foi diluído em 2 mL de água destilada (1:200) e, então, pipetados em duplicata em microplaca de 96 poços. A curva padrão foi construída a partir de solução padrão de albumina (1000 µg/mL) com fator de diluição 1:2, sendo o ponto mais baixo 15,625 µg/mL. O corante (#5000006 – Bio-Rad) foi diluído para a concentração de uso (1:5) e 200 µL pipetados por poço. Após 5 minutos de incubação ao abrigo de luz, a absorbância das amostras foi lida em comprimento de onda de 562 nm e determinada em relação à curva padrão. Os resultados obtidos foram expressos em g/dL.

#### **3.3.1.4 Microdissecção**

Para os protocolos de atividades enzimáticas os animais foram decapitados, os cérebros coletados e o HMB imediatamente dissecado com o auxílio de lupa e tesoura de córnea. Foram utilizados como referências anatômicas o quiasma óptico como estrutura rostral e os corpos mamilares como estrutura caudal, a profundidade do corte foi de aproximadamente 1 mm, todas as coletas foram executadas pelo mesmo experimentador. Os ensaios enzimáticos foram realizados imediatamente após obtenção do tecido.

Para os protocolos de qPCR e *western blotting* os animais foram decapitados, os cérebros coletados e imediatamente congelados em gelo seco e armazenados a -80 °C. O SON foi removido pela técnica de micropunch em um criostato a partir de uma fatia espessa (1500 µm, coordenadas de -0,6 a -2,1 mm em relação ao bregma), com o auxílio de agulha de aço inoxidável de 1,5 mm de diâmetro interno, o quiasma óptico foi utilizado como referência anatômica.

### 3.3.1.5 Determinação da atividade da HO

A técnica foi padronizada a partir das técnicas previamente descritas (Kutty & Maines, 1981; McNally *et al.*, 2004). As amostras de SON foram homogeneizadas em tampão (Tris, NaCl, KCl, Ditioneitol – DTT, EDTA e Sódio dodecil sulfato – SDS, pH 7,4).

A reação se deu em 400  $\mu$ L de meio [contendo hemina, Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina – NADPH, Glicose-6-fosfato, Glicose-6-fosfato desidrogenase e citosol hepático [obtido da homogeneização 1:1 (p:v) de fígado fresco em tampão citrato de sódio, pH 5,0, em glicerol; seguido de centrifugação a 105000 g por 20 min)], dissolvido em tampão contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  e NaCl, pH 7,4. A reação foi incubada por 1 hora, ao abrigo da luz, a 37°C, e foi bloqueada pela adição de 400  $\mu$ L de clorofórmio. A bilirrubina gerada foi medida em espectrofotômetro: A460nm – A530nm. Os resultados foram expressos em nmol bilirrubina/500  $\mu$ g proteína/60 minutos.

### 3.3.1.6 Determinação da atividade da NOS

A determinação da atividade da NOS no tecido foi realizada por meio de uma modificação do método descrito por Bredt e Snyder (Bredt & Snyder, 1989). Os fragmentos foram homogeneizados em 200  $\mu$ L de tampão de homogeneização gelado. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Quarenta microlitros do sobrenadante foram adicionados a 1 mL do tampão de ensaio, composto por ácido 4 - (2-hidroxi-etil)-1-piperazina metanossulfônico (HEPES), HEPES com 100 mM de valina,  $\text{CaCl}_2$ , DTT, Tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), NADPH e 100.000 CPM de  $^{14}\text{C}$ -L-arginina (270  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ , 0.21  $\mu\text{mol}$ ) e incubado pelo período de 15 minutos em banho-maria a 37 °C e agitação de 50 rpm. No final deste período (15 minutos), a reação foi bloqueada adicionando-se 1 mL de resina de troca catiônica (Dowex® 50W×8 hydrogen form, Sigma) gelada, previamente ativada com NaOH e diluída em HEPES, EDTA, pH 5,5. A resina foi removida por centrifugação (10000 g, 10 min) e 400  $\mu$ L do sobrenadante contendo L-citrulina foi adicionado a um frasco contendo 3 mL de líquido de cintilação (ScintiSafe™, Fisher Scientific) para determinação da quantidade de  $^{14}\text{C}$ -citrulina em contador de cintilação beta. Como a NOS converte a arginina em citrulina e NO em concentrações equimolares, os resultados foram expressos como citrulina marcada com  $^{14}\text{C}$  produzido por tecido em 15 minutos (pmol/mg de proteína/15 min). Alíquotas de 10  $\mu$ L do homogenato diluídas na proporção 1:15 foram utilizadas para dosagem de proteína e normalização dos resultados de atividade enzimática.

### 3.3.1.7 Determinação da atividade da aconitase

O ensaio da atividade da aconitase seguiu conforme as recomendações do kit (#MAK051; Sigma-Aldrich®). O HMB foi homegeinizado em tampão de ensaio gelado e mecanicamente lisados. O homogenato foi centrifugado a 13.000 g, a 4°C, por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e ativados com 10 µL de solução de ativação por 1 h a 4°C. A seguir foram pipetados 50 µL, em duplicata, de cada amostra na microplaca de 96 poços e adicionado 50 µL da mistura de reação do kit contendo tampão de ensaio, mistura de enzimas e substrato. A atividade da aconitase ocorreu na placa protegida da luz, sob agitação de 80 rpm, durante 1 h em temperatura ambiente. Então, acrescentou-se 10 µL por poço do agente revelador e a placa foi novamente incubada por 10 minutos nas mesmas condições supracitadas. Finalizado este período, a placa foi lida no espectrofotômetro ( $A_{450nm}$ ), sendo os resultados expressos como nmol de isocitrato/µg de proteína solúvel. A proteína foi determinada pelo método de BCA (Protein Assay, Bio-Rad) a partir de 10 µL do sobrenadante não diluído, pipetados em duplicata em microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ( $A_{562nm}$ ).

### 3.3.1.8 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A determinação da produção de peróxido de hidrogênio foi realizada através do uso de kit comercial (*Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit*, #MAK165, Sigma Aldrich). O HMB dissecado foi homogeneizado em 150 µL de PBS 0,1M gelado, alíquotas de 50 µL do homogenato foram avaliadas em duplicata. O ensaio foi desenvolvido em acordo com as instruções do fabricante. Duas alíquotas de 10µL foram submetidas à determinação do conteúdo proteico pela técnica de Bradford, o resultado foi utilizado para a normalização dos valores encontrados. Os resultados foram expressos em nmol/g de proteína).

### 3.3.1.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Após o micropunch as amostras de tecido foram transferidas para um microtubo contendo Trizol® (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -80°C durante um período máximo de 24h até a extração de RNA.

O isolamento do RNA total a partir de cada amostra ocorreu por meio do método Tiocianato de Guanidina-Fenol-Clorofórmio, de acordo com as instruções do fabricante



(Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, realizou-se a remoção do DNA residual por meio do kit DNA-free kit (DNase treatment and removal reagents, Ambion). A integridade e a qualidade do RNA total foram avaliadas por meio das razões A260/A280 (apenas amostras com valores entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas) e A260/A230 A280 (apenas amostras com valores entre 2,0 e 2, 2 foram utilizadas). A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria no equipamento SpectraMax i3x - SpectraDrop™ Micro-Volume Microplate (Molecular Devices).

Posteriormente efetuou-se a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 525 ng de RNA, utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). O cDNA resultante foi diluído em água RNase free na proporção 1:4, determinada anteriormente pela curva de eficiência por PCR em tempo real, e armazenado em freezer - 20°C até a quantificação por PCR em tempo real

A quantificação por PCR em tempo real foi realizada utilizando Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. A reação de PCR foi realizada em triplicata, com 4 µL de cDNA e de 8µL de uma mistura contendo 6,25µL de solução Taqman 2X Master Mix (Applied Biosystems), 0,65µL de sonda específica e 1,6 µL de água livre de RNase. Os seguintes ensaios Taqman foram utilizados neste estudo: Rn01536933\_m1 (*Hmox1* – HO-1), Rn00582415\_m1 (*Nfe2l2*- Nrf2), Rn00583793\_m1 (*Nos1*- nNOS), Rn00564188\_m1 (*Gss*), Rn00689046\_m1 (*Gclc*), Rn00568900\_m1 (*Gclm*), Rn00578456\_m1 (*Agtr1a* – AT1R) e 4352340E (*Actb* – β-actina). Como controle negativo foi utilizado H<sub>2</sub>O ultrapura (MilliPore) autoclavada, o gene endógeno (β-actina) foi mensurado em todas as amostras. Os resultados foram analisados pelo método de  $\Delta\Delta CT$  ou curva padrão, quando a eficiência de amplificação não se encontrava entre 90-110%. A determinação do transcrito em cada amostra foi obtida pelo método de quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Para cada amostra, o “*threshold cycle*” (Ct) de mRNA foi determinado e normalizado pela média do Ct do gene controle endógeno ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Gene Alvo}} - Ct_{\text{Gene Controle}}$ ). O mRNA na amostra desconhecida corrigido pelo grupo controle (calibrador, grupo controle, hidratado tratado com veículo), foi determinada pelo método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Alvo}} - \Delta Ct_{\text{Controle}}$ ). Os dados foram apresentados como expressão de mRNA relativo ao grupo controle.

### 3.3.1.10 Western Blotting

O SON foi submetido à homogeneização em 80 µL de tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM/L pirofosfato de sódio, 100 mM/L fluoreto de sódio, 10 mM/L EDTA, 10 mM/L ortovanadato de sódio, 2 mM/L PMSF, 0.2 mg/mL aprotinina e 0.2 mg/mL leupeptina, à 4°C). Os fragmentos celulares foram centrifugados (14000 rpm por 40 minutos, 4° C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi coletado.

A partir do sobrenadante, foi realizada a dosagem de proteína das amostras, em duplicata, na diluição de 1:10 (1 parte de amostra e 9 partes de água ultrapura), pelo método BCA (Protein Assay, Bio-Rad), em espectrofotômetro com comprimento de onda de 562 nm.

A massa de proteína do SON utilizada para a análise da expressão por *western blotting* foi de 15 microgramas. As amostras contendo as proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra pH 6,8 [20% de glicerol, Tris 1M pH 6,8, duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, ditioneitol (DTT) 200mM, azul de bromofenol 0,2%] a 95 °C por 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, com 0,75 mm de espessura. Para melhor compactação do material, a eletroforese foi iniciada a 80 V por 30 minutos e depois alterada para 100 V por 90 minutos. As proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose 0,45 mm Trans Blot por meio do sistema de tanque ligado a 100 V por 90 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (TBS-T e 10% de Albumina) por 90 minutos. Então, a membrana foi incubada com anticorpo primário, anti-p38 MAPK (coelho, 1:1000, #9212, Cell Signaling Technology®), anti-p-p38 MAPK (coelho, 1:1000, #9211, Cell Signaling Technology®) ou β-actina (rabbit, 1:80000, Cell Signalling) em solução contendo TBS-T e albumina 5%. A incubação ocorreu sob agitação, a 4 °C, overnight. Posteriormente, a membrana foi submetida a 6 lavagens de 5 minutos com solução TBS-T e incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (cabra anti-coelho, 1:5000, Cell Signaling) em solução contendo TBS-T e albumina 5%. A incubação ocorreu sob agitação, em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada 6 vezes em solução TBS-T e incubada por 5 minutos com a mistura de reagentes do kit de quimioluminescência amplificada (ECL Prime, Amersham Biosciences). A detecção por quimioluminescência foi realizada em sistema de detecção Chemidoc XRS + Imaging System (Bio-Rad), com exposição de 60 segundos e as imagens foram capturadas em intervalos de 10 segundos.

### 3.3.1.11 Perfusão Cerebral

Para o protocolo de imunofluorescência, os animais foram submetidos à perfusão cerebral 120 minutos após a administração de ZnDPBG, CORM-3 ou respectivos veículos, 24 ou 48 horas após o início da restrição hídrica. Após serem anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg), de acordo com técnica anteriormente descrita em “anestesia geral”. A perfusão foi realizada por punção transcardíaca de 150 mL de tampão fosfato-salino (PBS 0,01 M, pH 7,2), seguida por 350 mL de formaldeído (FA) 4% em solução PBS 0,01 M. A seguir, os cérebros foram cuidadosamente removidos da calota craniana e fixados em FA 4 % a 4 °C por 1 hora. Para a desidratação do tecido cerebral, os cérebros foram então incubados em solução de sacarose 30% em PBS 0,01 M a 4 °C por, pelo menos, 72 horas. Então, os tecidos cerebrais foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura criostato (Microm, modelo HM 5000M). As secções contendo o SON foram coletadas e divididas em três lotes, armazenadas em solução crioprotetora a -20° C até o momento de uso.

### 3.3.1.12 Imunofluorescência

Os cortes cerebrais foram lavados três vezes por 5 minutos com tampão salina Tris 1X (pH 7,6) em temperatura ambiente sob agitação e, então, submetidos ao bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se a seguinte solução de bloqueio; soro normal de cavalo 10 % em solução Tris + 0,3 % Triton X-100 + 0,04 % durante 1 hora. Logo após os tecidos foram incubadas por 48 horas sob agitação a 4° C com uma mistura dos anticorpos primários: policlonal rabbit anti-HO-1 (Enzo Life Sciences, 1:150) ou monoclonal rabbit anti-nNOS (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) e policlonal goat anti-GFAP (Sigma, 1:1000) em solução de bloqueio. Após o período estipulado, os tecidos foram lavados três vezes em lavados três vezes por 5 minutos com tampão salina Tris 1X (pH 7,6) em temperatura ambiente sob agitação e, em seguida, incubados no escuro com os respectivos anticorpos secundários, sendo eles: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Jackson IR, 1:500) e donkey anti-goat Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1:250) em solução de bloqueio por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Logo após os cortes foram novamente lavados três vezes em Tris e montados sobre lâminas e cobertos com Vectashield (Fluoromount) e lamínula. As lâminas foram guardadas no refrigerador e protegidas da luminosidade até o momento da captura das imagens utilizando o microscópio de varredura a laser multifóton (LSM 780 - Axio Observer

- Zeiss) equipado com uma objetiva de 63x. As fatias de imagens consecutivas foram tomadas em intervalos de 0,56mm, adquiridas sequencialmente em Z e foram reconstruídas usando o software livre Fiji-ImageJ. Os resultados foram analisados de maneira qualitativa.

### **3.3.2 Modelo Animal: Camundongo Nrf2<sup>Flox/Flox</sup>**

#### **3.3.2.1 Anestesia Geral**

Os animais que receberam a injeção bilateral sítio-específica (SON) de vetor adenoviral foram submetidos à anestesia inalatória prévia com isoflurano 3% (em mistura carbogênica – 95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>) por 10 min em uma caixa de acrílico (5 x 5 x 5 cm) vedada. Durante o procedimento, de cerca de 20 a 25 minutos, a manutenção da anestesia foi mantida a isoflurano 1% sendo essa administrada com o auxílio de uma máscara para anestesia inalatória acoplada ao aparelho estereotáxico. Ao final da injeção, o camundongo foi mantido em caixa individual sobre cobertor homeotérmico até recuperação total da anestesia e, então, o animal foi realocado à sua caixa original.

#### **3.3.2.2 Injeção Sítio-Específica de Vetor Viral**

Para a obtenção de camundongo com deleção condicional de Nrf2 no SON o vetor viral Ad-Cre foi injetado bilateralmente no SON de camundongos Nrf2<sup>flox/flox</sup>. As coordenadas cerebrais utilizadas foram (em relação ao bregma):

Ântero-Posterior: 0,46 mm posterior ao bregma;

Látero-Lateral: 1,15 mm à direita e 1,15 mm à esquerda ao bregma;

Dorso-Ventral: 6,0 mm a partir da calota craniana.

#### **3.3.2.3 Determinação do peso corporal**

Os camundongos foram pesados à 8h da manhã que antecedeu o início do período de restrição hídrica, a foi repetidamente pesada no mesmo horário até a finalização do experimento. O peso foi mensurado com o auxílio de uma balança digital e um bequer de 200 mL.

#### **3.3.2.4 Ingestão de água**

Sete dias após a microinjeção de Ad-eGFP ou Ad-Cre os animais foram pesados e alocados individualmente em gaiolas metabólicas (NALGENE Labware, Rochester, NY). Após período de aclimação de 5 dias, os animais foram divididos nos 3 grupos

experimentais: a. controle; b. PH 24; c. PH 48. No último dia do experimento a água foi reoferecida a todos os grupos e a ingestão foi mensurada a cada 15 minutos pelo período total de 90 minutos.

### **3.3.2.5 Análises plasmáticas**

Os animais foram eutanasiados (Pentobarbital, 39mg/mL, Fatal-Plus, Vortech®) e o sangue coletado por punção cardíaca do ventrículo esquerdo com uma agulha de 21G acoplada a uma seringa de 1 mL, ambas heparinizadas. Então, o volume total coletado foi transferido a um tubo de 1,5 mL contendo heparina, centrifugado a 3000 rpm, 4° C por 20 minutos. O plasma foi aliquoteado e armazenado a -80 °C até o momento do uso.

#### **3.3.2.5.1 Osmolalidade**

A osmolalidade foi determinada pelo método de pressão de vapor no aparelho VAPRO 5600 (WESCOR®) através de 10 µL de amostra de plasma, os resultados foram expressos como mOsm/kg H<sub>2</sub>O.

#### **3.3.2.5.2 Hematócrito**

O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito como descrito anteriormente. Os valores foram expressos como % de hemácias.

### **3.3.2.6 Microdissecção**

Após anestesia terminal, o cérebro foi coletado e o SON imediatamente dissecado por micropunch com uso de um microcapilar heparinizado e auxílio de lupa. O SON foi imediatamente processado para a dosagem de conteúdo superóxido ou congelado para ensaio de expressão gênica.

### **3.3.2.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

O RNA total foi isolado dos micropunches de SON com o uso do reagente *TRIZOL* (Invitrogen) e do kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), a amostra foi reversamente transcrita em cDNA dupla fita com o uso de *5x All-In-One RT Master Mix* (abm). O cDNA (8 ng) foi submetido ao qPCR em duplicata pelo método SYBR Green para os seguintes genes *Hmox1*,

*Nfe2l2*, *Avp*, *Sod1*, *Sod2* e *Nqo1*. Os primers utilizados foram os seguintes: *Hmox1* forward 5-AGGGTCAGGTGTCCAGAGAA-3', *Hmox1* reverse 5-CTTCCAGGGCGTGTAGATA-3'; *Nfe2l2* forward 5-GAGCAGGACATGGAGCAAGT-3', *Nfe2l2* reverse 5-GCTTGTTTTTCGGTATTAAGACAC-3'; *Avp* forward 5-GCTGCCAGGAGGAGAACTAC-3', *Avp* reverse 5-AAAACCGTCGTGGCACTC-3'; *Sod1* forward 5-AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC-3', *Sod1* reverse 5-CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG-3'; *Sod2* forward 5-CAGACCTGCCTTACGACTATGG-3', *Sod2* reverse 5-CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT-3'; *Nqo1* forward 5-AGGATGGGAGGTACTCGAATC-3', *Nqo1* reverse 5-AGGCGTCCTTCCTTATATGCTA-3'; e foi realizada no aparelho iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, California). A análise foi realizada através do método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , como descrito anteriormente, sendo utilizado como gene endógeno o 18s rRNA (forward 5-GCCCGAAGCGTTTACTTTGA3' e reverse 5-TCATGGCCTCAGTTCCGAA3'), e como grupo calibrador o grupo Ad-eGFP Controle. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### 3.3.2.8 Perfusão

Os animais foram submetidos à anestesia terminal como descrito anteriormente e, então, com o auxílio de uma bomba de perfusão os animais foram perfundidos com 50 mL de PBS 0,1 M (5 minutos) seguidos de 150 mL de PFA 4% (em PBS 0,1 M) (10 minutos). Os cérebros foram coletados e desidratados por pelo menos 3 dias em solução de sacarose 30% (em PBS 0,1 M) a 4° C.

### 3.3.2.9 Imunofluorescência

Os tecidos foram seccionados em cortes de 30  $\mu$ m de espessura, as secções contendo o SON foram coletadas em diretamente em lâminas pré-tratadas com polilisina (Thermo Scientific®) e armazenadas a -20° C até o momento do processamento.

As lâminas foram lavadas por 3 vezes com PB 0.1 M por 5 minutos e incubadas por 1 hora com soro normal de cavalo 10% (em PB 0,1 M) em câmara úmida sob temperatura ambiente. As soluções contendo os anticorpos primários, anti-HO-1 (1:150, coelho policlonal, #ADI-SPA-895-F, Enzo Life Sciences) e anti-Nrf2 (1:100, coelho policlonal, #ab31163, Abcam) foram preparadas em 0,3% Triton X-100/ 10% de soro normal de cavalo em PB 0,1 M e as lâminas foram incubadas por 24 horas a 4° C em câmara úmida. Após a incubação com os primários, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com PB 0.1 M por 5 minutos e,

então, incubadas à temperatura ambiente por 2 horas em câmara com Alexa-Fluor 594 (1:250, cabra anti-coelho policlonal, #ab150080, Abcam) e solução de 2% de soro normal de cavalo em PB 0,1 M. Por fim, as lâminas foram lavadas novamente (3 vezes com PB 0.1 M por 5 minutos, temperatura ambiente) e, após secagem, tratadas com solução de montagem (ClearMount™, Invitrogen), cobertas com lamínulas e preservadas em caixa de suporte escura a 4° C. As fotomicrografias foram capturadas no dia seguinte em microscópio confocal (LSM 710 Zeiss) com o auxílio do software Zen 2.3 (Zeiss). As análises pós-captura foram realizadas no software Zen Lite (Zeiss).



## 3.4 PROTOCOLOS *EX VIVO*

### 3.4.1 Modelo Animal: Rato Wistar (80-100 g)

#### 3.4.1.1 Eletrofisiologia

Duas horas antes dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório e mantidos sem manipulação até o momento da eutanásia. Para cada experimento, três ratos Wistar machos (80 – 100 g) foram decapitados e o tecido cerebral rapidamente coletado e transferido a um recipiente contendo solução “ACSF-corte” (fluido cérebro espinhal artificial, ver item “soluções” para descrição) a 0 °C, previamente equilibrada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>). Este procedimento foi realizado em até 2 minutos para que a integridade do tecido fosse mantida. Após 5 minutos, o cérebro foi seccionado de modo a obter-se um bloco de tecido contendo o hipotálamo. A base dorsal deste bloco contendo o hipotálamo e, por consequência, o SON, foi colada (cianoacrilato – Super Bonder®) a um suporte previamente preparado com “ACSF-ágar 4 %”. Este conjunto, por sua vez, foi colado à plataforma acessória do vibrátomo (modelo MA752, Campden Instruments Ltd, Loughborough, UK) e mergulhado em “aACSF” resfriado a 0 °C, contido em câmara própria do aparelho, com a superfície inferior do bloco de ágar e a caudal do bloco de tecido anexadas à plataforma do vibrátomo. Após o posicionamento adequado da lâmina do vibrátomo, a frequência foi ajustada para 2,5 mm e a velocidade do corte foi fixada a 0,12 mm/s, de modo a serem obtidas fatias viáveis com 230 µm de espessura. Toda fatia contendo o SON foi transferida (com a ajuda de uma pipeta de Pasteur) a uma câmara contendo “ACSF” a 35 °C, gaseificado continuamente com mistura carbogênica, conforme descrito previamente (Stuart & Sakmann, 1995). Em média, 3 fatias contendo o SON eram obtidas por animal e essas eram mantidas na câmara de incubação durante um período de 45 a 60 minutos, até o momento em que foram submetidas aos registros eletrofisiológicos.

##### 3.4.1.1.1 Registro eletrofisiológico – “*patch clamp*”

Para os registros eletrofisiológicos foi utilizada a técnica de *patch-clamp* no modo “whole cell”. Foram utilizadas fatias cerebrais de 230 nm de espessura contendo os núcleos supraópticos. Os neurônios magnocelulares foram visualizados por contraste óptico diferencial infravermelho com imagens capturadas por câmera digital CCD (SensiCam qe, The Cooke Corporation, Romulus, Michigan, USA), características anatômicas e

morfológicas foram utilizadas para identificação (Paxinos & Watson, 1997). As micropipetas foram feitas a partir de capilares de vidro de borosilicato e apresentavam resistência entre 4 to 6 M $\Omega$  quando preenchidas com a solução de pipeta (ver item “soluções” para descrição). Os registros foram realizados usando amplificador de patch-clamp Axon 200B (Molecular Devices, Foster City, CA, USA), e os sinais foram filtrados abaixo do limiar de 2 KHz e digitalizados a 10 KHz usando Digidata 1440A (Molecular Devices) controlado por Clampex (Molecular Devices).

As fatias cerebrais contendo o SON ficaram em uma câmara de registro montada sobre a platina de um microscópio (Nikon E-600FN, Melville, New York,), a qual foi continuamente superfundida com aCSF saturado com mistura carbogênica, a um fluxo de 2 a 3 mL/min. As fatias foram fixadas com uma pequena grade, construída com um aro de platina e fios de nylon para mantê-la imóvel no fundo da câmara e evitar seu deslocamento durante os registros.

Os registros foram gravados 3 min após atingir a configuração whole-cell, a capacitância da membrana e a resistência em série foram compensados (40–60%) através das configurações do amplificador. Primeiramente, os registros foram feitos em condição controle por 5 min, então, na ausência ou presença dos seguintes bloqueadores sinápticos: DNQX, DL-AP5 e PICRO por 5 min e, então, foi adicionado à solução contendo os inibidores ZnDPBG ou CORM-3 por 10 min.

A excitabilidade dos MNCs do SON foi avaliada pelo registro do número de potenciais de ação (na configuração current-clamp) em resposta a injeções de corrente de 5 pA (2 s), que foram aplicadas de -5 a -40 pA com intervalos de 1 s, esse protocolo foi aplicado 5 (controle), 10 (bloqueadores sinápticos) e 15 (bloqueadores sinápticos + ZnDPBG ou CORM-3) min após a entrada na célula. Ainda, a resistência de entrada foi medida pelo slope da curva relação voltagem-corrente obtida através do registro do potencial de membrana ( $V_m$  - em current-clamp) em resposta à injeções de corrente de 5 pA (2 s), as quais foram aplicadas de -5 a -60 pA com intervalo de 1 s, esse protocolo foi aplicado 5 (controle), 10 (bloqueadores sinápticos) e 15 (bloqueadores sinápticos + ZnDPBG ou CORM-3) min após a entrada na célula. Então, 5 min foram registrados como condição controle e 10 minutos foram registrados sob superfusão de ZnDPBG ou CORM-3, ou, antes da exposição ao inibidor de HO ou doador de CO, 5 min foram registrados sob superfusão de bloqueadores sinápticos (DNQX, D-AP5 e PICRO).

A atividade intrínseca (frequência de potenciais de ação) foi obtida através do protocolo gap-free, o registro consistiu na mensuração da taxa de disparo por 10 min sob

todas as condições experimentais (aCSF; aCSF + bloqueadores sinápticos; aCSF + bloqueadores sinápticos + ZnDPBG ou CORM-3), enquanto o Vm foi considerado, na análise do histograma, a voltagem na qual a célula permaneceu por maior período de tempo.

O potencial de junção líquida,  $-15$  mV entre a pipeta e a solução de banho, foi calculado usando Clampex e os valores aqui apresentados foram corrigidos. A análise off line dos sinais foi realizada com auxílio de programas do pacote pClamp 10 (Molecular Devices).

#### **3.4.1.1.2 Caracterização Fenotípica dos Neurônios**

Para a caracterização dos diferentes fenótipos, foi utilizada a técnica de marcação por imunofluorescência do neurônio registrado. Para isso, foi acrescentada à solução de pipeta utilizada para os registros eletrofisiológicos 0,2 % de biocitina (Tocris Bioscience, Bristol – UK). Após 20 minutos de registro, a fatia foi fixada em formaldeído (FA; 4 %) durante 12 horas e desidratadas em sacarose 30 % durante o mesmo período de tempo. Em seguida, as fatias permaneceram em solução anticongelante (crioprotetora: 20 % de glicerol, 30 % de etileno glicol em 50 mM de fostato, pH 7.4) para preservar a integridade do tecido para posterior tratamento imunoistoquímico. A biocitina foi revelada incubando-se as fatias em estreptavidina conjugada com o fluoróforo Alexa350® (1:500, overnight; Life Technologies), enquanto que neurônios vasopressinérgicos ou ocitocinérgicos foram identificados por meio da incubação overnight com o anticorpo primário anti-AVP (1:1000 Guinea Pig anti-(Arg8) - Vasopressin, #5048, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA) e anti-OT (1:1000 Rabbit, # T-4084 Peninsula Laboratories, San Carlos, CA). Posteriormente, as fatias foram incubadas com os anticorpos secundários donkey anti-guinea pig conjugado com Cy5 (para AVP) e donkey anti-rabbit conjugado com Alexa488® (para OT) por 1 hora (1:500). Os cortes foram montados com Fluormount (Sigma Aldrich) e os neurônios registrados foram identificados em um microscópio confocal (TCS SP5, Leica, Bensheim, Germany).

### 3.4.1.1.3 Soluções

#### Solução de Pipeta

140 mM gluconato de potássio ( $C_6H_{11}O_7K$ ), 10 mM KCl, 0,3 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 2 mM ATP e Na-ATP e 0,25 mM Na-GTP (pH 7.3, e osmolalidade entre 285 e 295 mOsm/Kg  $H_2O$ ), água ultrapura foi tratada overnight com dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) e utilizada para a preparação da solução.

#### ACSF (Corte)

A solução de fluido cérebro espinal artificial (aCSF) que foi utilizada nos procedimentos de obtenção das fatias teve a seguinte composição (em mM): NaCl 121; KCl 3;  $CaCl_2$  2,5;  $MgCl_2$  1,3;  $NaHCO_3$  26; glicose 25 e Ascorbato de sódio 0,4. A osmolaridade da solução ficou entre 305 – 313 mosm/Kg. $H_2O$  e o pH de 7,4 quando equilibrada com mistura carbogênica.

#### ACSF (Registro)

A solução de ACSF, utilizada nos procedimentos de manutenção e superfusão das fatias, teve a seguinte composição (em mM): NaCl 121; KCl 4;  $CaCl_2$  2,5,  $MgCl_2$  1,3,  $NaHCO_3$  26; e glicose 10. A osmolalidade desta solução ficou entre 295 – 300 mosm/Kg. $H_2O$  e pH de 7,4 quando equilibrada com mistura carbogênica.

### 3.4.2 Modelo Animal: Camundongo C57BL/6J

#### 3.4.2.1 Determinação do conteúdo de ânion superóxido no núcleo supraóptico

Imediatamente após a coleta, os SON microdissecados foram incubadas com um *spin probe* de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) sensível ao superóxido, a 1-hidroxi-metocarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirolidina (CMH) (200  $\mu$ M, Noxygen) por 60 minutos a 37° C em tampão de incubação de EPR contendo NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, D-glucose, HEPES, que foi suplementado com o quelantes de metal dietiltiocarbamato (DETC) (5  $\mu$ M, Noxygen) e deferoxamina (DF) (25  $\mu$ M, Noxygen). Após a incubação as amostras foram carregadas em seringas de 1 mL e congeladas imediatamente com nitrogênio líquido entre duas alíquotas de tampão de EPR, de maneira a formar um plug congelado homogêneo. A amostra congelada de EPR foi alocada em um “dedo” de nitrogênio líquido com uso de vidraria específica e inserida em um espectrômetro de EPR (Bruker eScan). O espectro de EPR obtido do SON de camundongos Ad-eGFP e Ad-Cre foram normalizados pelo peso total de tecido (mg) em cada amostra. Para a obtenção de sinal confiável, cada amostra foi composta de micropunches bilaterais de SON de 3 camundongos (6 SON/amostra). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias/mg de tecido).

### 3.5 PROTOCOLO *IN VITRO*

#### 3.5.1 Modelo Animal: Rato Wistar neonato (1-2 dias)

##### 3.5.1.1 Cultura primária de células astrocíticas

A cultura primária de astrócitos foi realizada com base no protocolo proposto por (Mccarthy & De Vellis, 1980). Após a coleta do HMB de ratos neonatos de 1 dia, precedido pela remoção das meninges, em meio de dissecação (HBSS modificado [sem cálcio e sem magnésio SLBG2926]), os HMBs foram transferidos para o um falcon (gentleMACS tubo C) contendo um mix de enzimas a partir do kit de dissociação (enzima 1 [50 µL] e 2 [1900µL], Kit neural tissue dissociation, MiltenyiBiotec), e então pré-aquecidos e acoplados ao homogenizador (gentle MACS dissociator, MiltenyiBiotec), e foram homogeneizados por 30 segundos. Na sequência, o tubo, com o tecido, foi incubado (incubadora Dubnoff, 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, 30 ciclos/min), por 15 minutos. Posteriormente, foi homogeneizado por 30 segundos e então, foi adicionado um mix de enzimas (enzima 3 [20 µL] e 4 [10 µL] do Kit), e foram novamente incubados, sob as mesmas condições, por 15 minutos. Posteriormente, o tubo foi acoplado ao homogenizador por 60 segundos e incubado por 15 minutos. Ao final o homogenato de tecido foi filtrado (40 µm, Milipore) e o filtro lavado com 10 mL de DMEM puro (Dulbecco's Modified Eagle Medium, [Life technologies # 11885076]). Em seguida foi realizada a centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensão com 1 a 2 mL de meio enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) inativado e 1% de solução de penicilina (10,000 IU/ml)-estreptomicina (10,000 µg/ml) (PS; Mediatech). Após a homogeneização do precipitado, as células foram cultivadas em garrafas P75 (75 cm<sup>2</sup>), contendo 10 mL de solução de DMEM (meio) completo, em incubadora (Galaxy 170R, Eppendorf) contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Transcorrida 1 hora, foi realizado o replaqueamento das células em suspensão em nova garrafa, P75. Este procedimento foi realizado 2 vezes. Terminados os dois procedimentos de replaqueamento, as células foram mantidas em cultivo por um período de 8-10 dias, havendo troca parcial do meio de incubação (70%) a cada 48-72 horas.

### 3.5.1.2 Coleta das células

Atingida a confluência de 80%, as células foram submetidas a repicagem que consistiu na agitação de 200 rpm por um período de 2h a 37°C, a fim de separar os oligodendrócitos, microglia e neurônios dos astrócitos. As células em suspensão foram desprezadas e foi realizada a lavagem das células aderidas, com 1mL de PBS. Em seguida foram adicionados 3 mL de tripsina, sendo a garrafa mantida por 15 minutos na incubadora (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C). Finalizada a etapa de tripsinização, foi adicionado o mesmo volume de meio completo, para interromper a reação enzimática da tripsina. O conteúdo foi removido e transferido para um tubo falcon, e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado com 2 a 3 mL de meio completo. Uma alíquota da suspensão foi utilizada para contagem das células viáveis através do método de exclusão com trypan blue, utilizando a proporção de 1:1, por visualização direta na câmara de Neubauer. As células foram então cultivadas em placa de 24 contendo lamínulas pré-tratadas com cell-tak (Corning®, [354240]). Os experimentos foram realizados quando a confluência das células atingiu em torno de 80%, geralmente, 2 dias após a repicagem.

### 3.5.1.3 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células) em placas de 24 poços, contendo lamínulas pré-tratadas com cell-tak. Após 48 horas as células foram submetidas, ou não, ao estímulo. O protocolo de IF foi realizado a partir da lavagem dos poços com Tris (1X) com PBS 0,01M, incubados com PFA 2% por 20 minutos para fixação das células à lamínula. Transcorrido este período as células foram lavadas com glicina 0,1 M por 5 minutos seguidos da lavagem das mesmas com Tris 1X (2X). A seguir, foram incubadas com 200 µL de solução de bloqueio (PBS 0,1 M; NHS 5%; Triton 0,3%), por 1 hora em temperatura ambiente, posteriormente com o anticorpo primário por 1 hora (anti p38MAPK produzido em *rabbit* [1: 50] - Cell Signalling #9212; anti p-p38MAPK produzido em *rabbit* [1: 200] - Cell Signalling #9211; anti HO-1 produzido em *rabbit* [1:500] - StressGen, #SPA-895 e anti GFAP produzido em *mouse* [1: 1000] - Sigma #G3893 - marcador para células astrocitárias). Após o período de incubação foi realizada a lavagem em tris 1X (3X), e novamente realizada a incubação com solução contendo os anticorpos secundários fluorescentes por 1h: alexa fluor 594 donkey anti-mouse [1:400] (Jackson Immunoresearch, 711-585-152), alexa fluor 488

donkey anti-rabbit [1:400] (Molecular Probes, A11055), a contra-coloração foi realizada com DAPI 2,5  $\mu\text{M}$  um composto fluorescente azul com alta afinidade a DNA dupla fita.



### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados utilizando o software Statistica (StatSoft, USA). Excitabilidade foi analisada por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguida de pós-teste de Fisher considerando o slope da relação voltagem-corrente como variável dependente e o tratamento (controle, bloqueadores sinápticos e bloqueadores sinápticos + ZnDPBG ou bloqueadores sinápticos + CORM-3) e os pulsos de corrente como variáveis independentes.  $V_m$ , resistência de entrada e frequência de potenciais de ação foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls (SNK), as medidas foram consideradas como variáveis dependentes e os tratamentos (controle, bloqueadores sinápticos e bloqueadores sinápticos + ZnDPBG ou bloqueadores sinápticos + CORM-3) foram considerados variáveis independentes. Os demais resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste Student-Newman-Keuls (SNK), Tukey ou Fisher. As medidas foram consideradas variáveis dependentes, os estímulos (controle, 24 ou 48 foras de privação hídrica) e os tratamentos (ZnDPBG, CORM-3 ou seus veículos) foram considerados variáveis independentes. Comparações de pós-teste foram consideradas somente quando o valor de “F” apresentou efeito significativo para uma variável independente ou para a interação. O nível de significância ( $\alpha$ ) foi estabelecido em 5%.

### 3.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.7.1 Protocolo I. Avaliação das propriedades passivas de neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico de ratos Wistar machos de 80 a 100

Ratos machos da linhagem Wistar, com idade de aproximadamente 20 dias (80 a 100 gramas) foram habituados por 3 dias em gaiolas coletivas (2 animais por caixa). No dia do experimento os animais foram alocados na sala de experimentação por pelo menos 2 horas antes da coleta. Após a obtenção de fatias cerebrais viáveis contendo o SON o protocolo experimental seguiu-se como esquematizado:

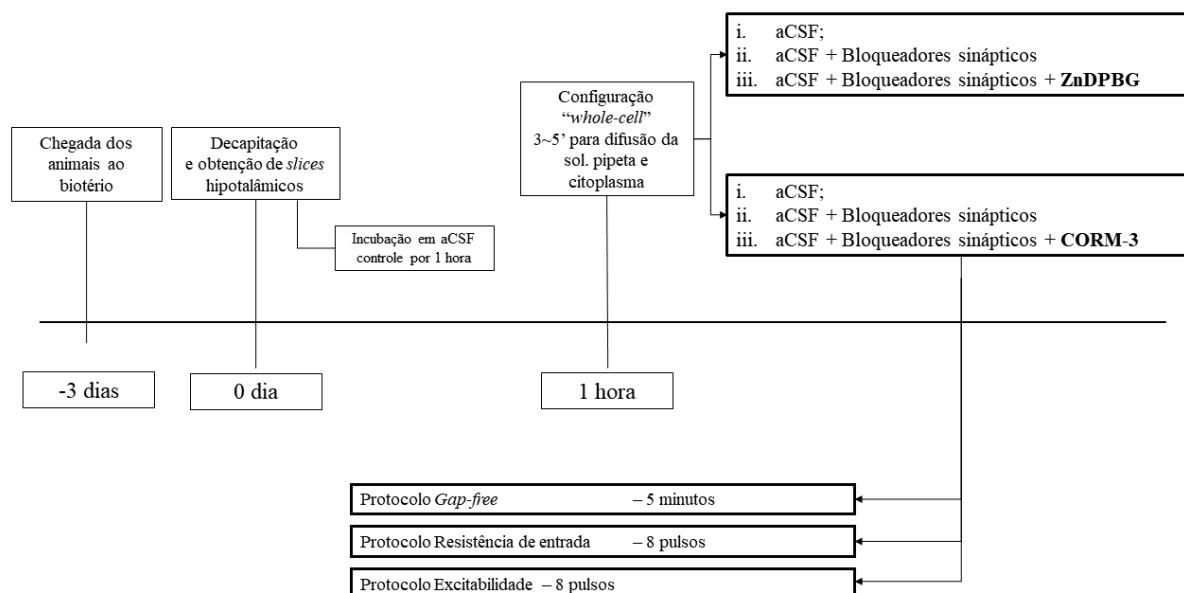


Diagrama 1. Linha do tempo do Protocolo I.

### **3.7.2 Protocolo II. Avaliação dos efeitos da privação hídrica de 24 e 48 horas em ratos Wistar adultos jovens tratados com injeção intracerebroventricular de ZnDPBG ou CORM-3 ou respectivos veículos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ou CORM-3<sub>Inativado</sub>).**

Ratos machos da linhagem Wistar, com idade de aproximadamente 60 dias (250 gramas) foram habituados por 3 dias em gaiolas coletivas (5 animais por caixa). No quarto dia os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de cânula no ventrículo lateral direito. Sete dias após a cirurgia os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos (a. Grupo Controle; b. Grupo Privação Hídrica de 24 horas; c. Grupo Privação Hídrica de 48 horas). No dia do experimento, cada grupo foi subdividido em dois: sendo um subgrupo de animais tratados com ZnDPBG e o outro de animais tratados com veículo.

#### Grupo Controle

acesso à água e ração comercial ad libitum:

- i. Grupo Controle + Veículo;
- ii. Grupo controle + ZnDPBG ou Grupo Controle + CORM-3

#### Grupo PH 24

submetido à privação hídrica por 24 horas e acesso a ração comercial ad libitum:

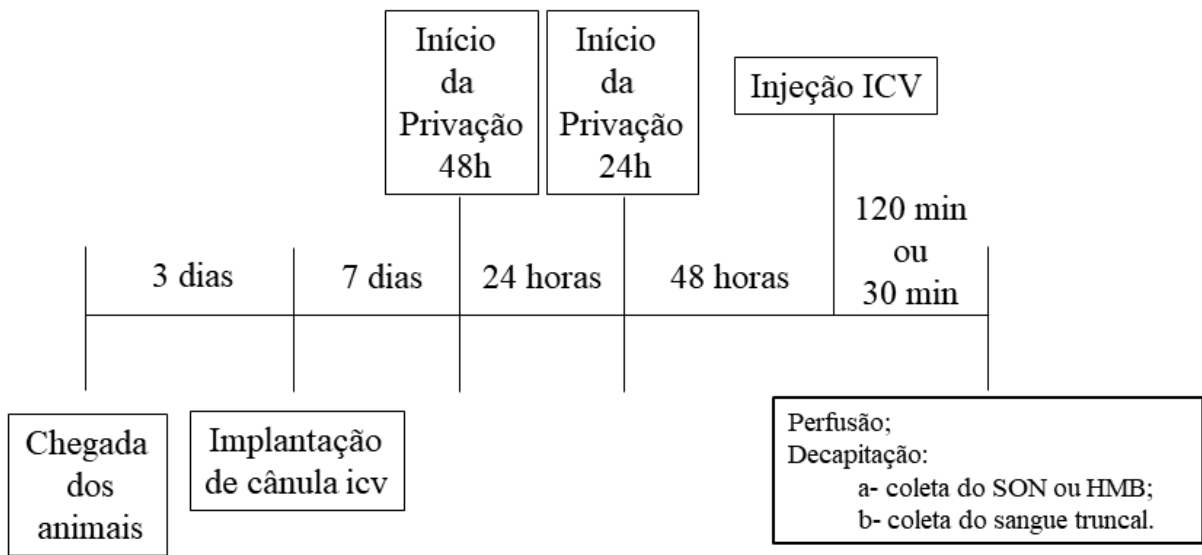
- i. Grupo PH 24 + Veículo;
- ii. Grupo PH 24 + ZnDPBG ou Grupo PH 24 + CORM-3

#### Grupo PH 48

submetido à privação hídrica por 48 horas e acesso a ração comercial ad libitum:

- i. Grupo PH 48 + Veículo;
- ii. Grupo PH 48 + ZnDPBG ou Grupo PH 48 + CORM-3

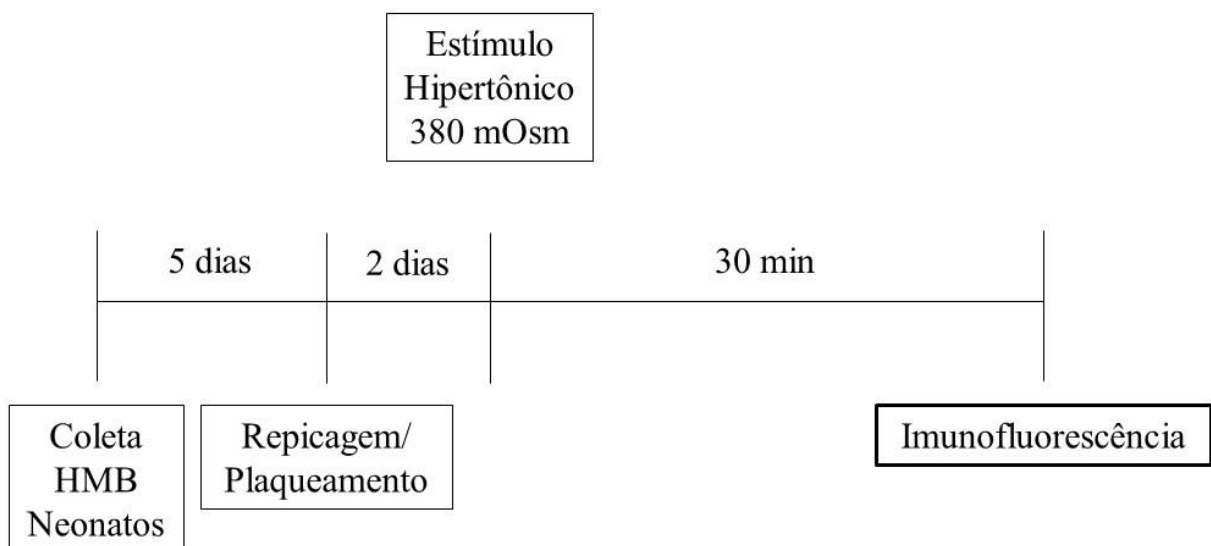
Trinta minutos após o tratamento os animais foram decapitados e foram coletados o SON ou o HMB e o sangue truncal, ou os animais foram perfundidos e o tecido cerebral coletado. Abaixo encontra-se a linha temporal desse protocolo experimental:



**Diagrama 2.** Linha do tempo do Protocolo II.

### 3.7.3 Protocolo III. Avaliação dos efeitos da estimulação hipertônica sobre o imunorreatividade de astrócitos hipotalâmicos a p38 MAPK, p-p38 MAPK e HO-1 de ratos Wistar neonatos

De maneira geral, 7 dias antes do experimento foi realizado o processo de coleta do hipotálamo médio basal de ratos Wistar machos neonatos (1-2 dias) e de segregação de células e plaqueamento. Dois dias antes do experimento, a cultura passou por um segundo processo de segregação e repicagem a fim da obtenção de uma cultura majoritariamente composta por astrócitos e, em seguida, realizou-se o plaqueamento de  $1 \times 10^4$  células em lamínulas de 13 mm<sup>2</sup> pré-tratadas com cell-tak® em placa de 24 poços. Vale ressaltar que a osmolalidade controle do meio de cultura dessas células é de 315 mOsm e que, durante o estímulo hipertônico, foi aumentada para 380 mOsm com adição de solução de NaCl concentrada, esse aumento de 20,63% foi pensado no sentido de mimetizar o aumento da osmolalidade plasmática usualmente observado em animais submetidos à privação hídrica de 48 horas. Nesse protocolo foram avaliadas qualitativamente a imunorreatividade astrocitária à HO-1, p38 MAPK e p-p38 MAPK e suas co-localizações com proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e contra-coradas com o marcador nuclear DAPI. Abaixo se encontra a linha temporal desse protocolo experimental:



**Diagrama 3.** Linha do tempo do Protocolo III.

### 3.7.4 Protocolo IV. Avaliação dos efeitos da privação hídrica de 24 e 48 horas em camundongos sob deleção condicional de Nrf2 no núcleo supraóptico

Nesse protocolo experimental dois sets de camundongos foram avaliados, camundongos C57BL/6J, considerados selvagens (*wild type*), e camundongos geneticamente modificados ( $Nrf2^{flox/flox}$ ) cujo o background genético foi a linhagem C57BL/6J.

Os animais selvagens foram submetidos à privação hídrica de 24 ou 48 horas e foram avaliados peso corporal, hematócrito, osmolalidade plasmática e conteúdo de ânion superóxido produzido pelo SON. Nesse experimento os grupos experimentais foram:

Grupo Controle

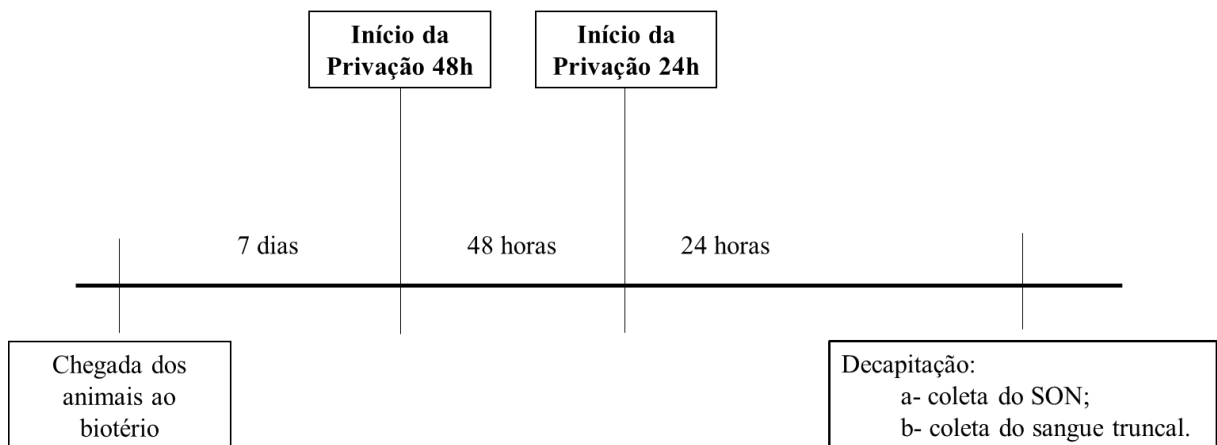
acesso à água e ração comercial ad libitum.

Grupo PH 24

submetido à privação hídrica por 24 horas e acesso a ração comercial ad libitum.

Grupo PH 48

submetido à privação hídrica por 48 horas e acesso a ração comercial ad libitum.



**Diagrama 4.** Linha do tempo do Protocolo IV.

Os animais transgênicos foram submetidos à injeção bilateral de vetor viral sete (7) dias antes do início dos estímulos de privação hídrica. Os animais que foram submetidos à avaliação da ingestão hídrica foram alocados em gaiolas metabólicas individuais 2 dias após o procedimento cirúrgico. Todos os animais foram coletados entre 8 e 9 horas da manhã do experimento. Nesse experimento os grupos experimentais foram:

#### Grupo Controle

acesso à água e ração comercial ad libitum:

- iii. Grupo Controle + Ad-eGFP;
- iv. Grupo controle + Ad-Cre

#### Grupo PH 24

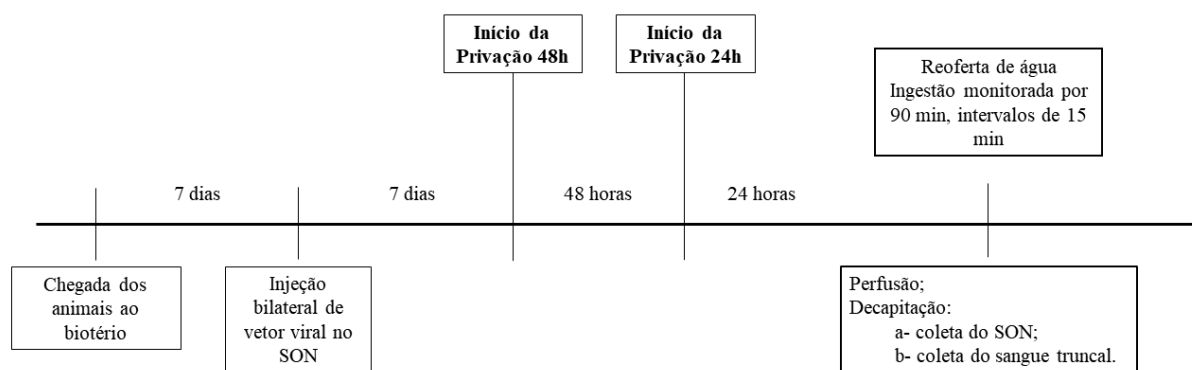
submetido à privação hídrica por 24 horas e acesso a ração comercial ad libitum:

- iii. Grupo PH 24 + Ad-eGFP;
- iv. Grupo PH 24 + Ad-Cre

#### Grupo PH 48

submetido à privação hídrica por 48 horas e acesso a ração comercial ad libitum:

- iii. Grupo PH 48 + Ad-eGFP;
- iv. Grupo PH 48 + Ad-Cre



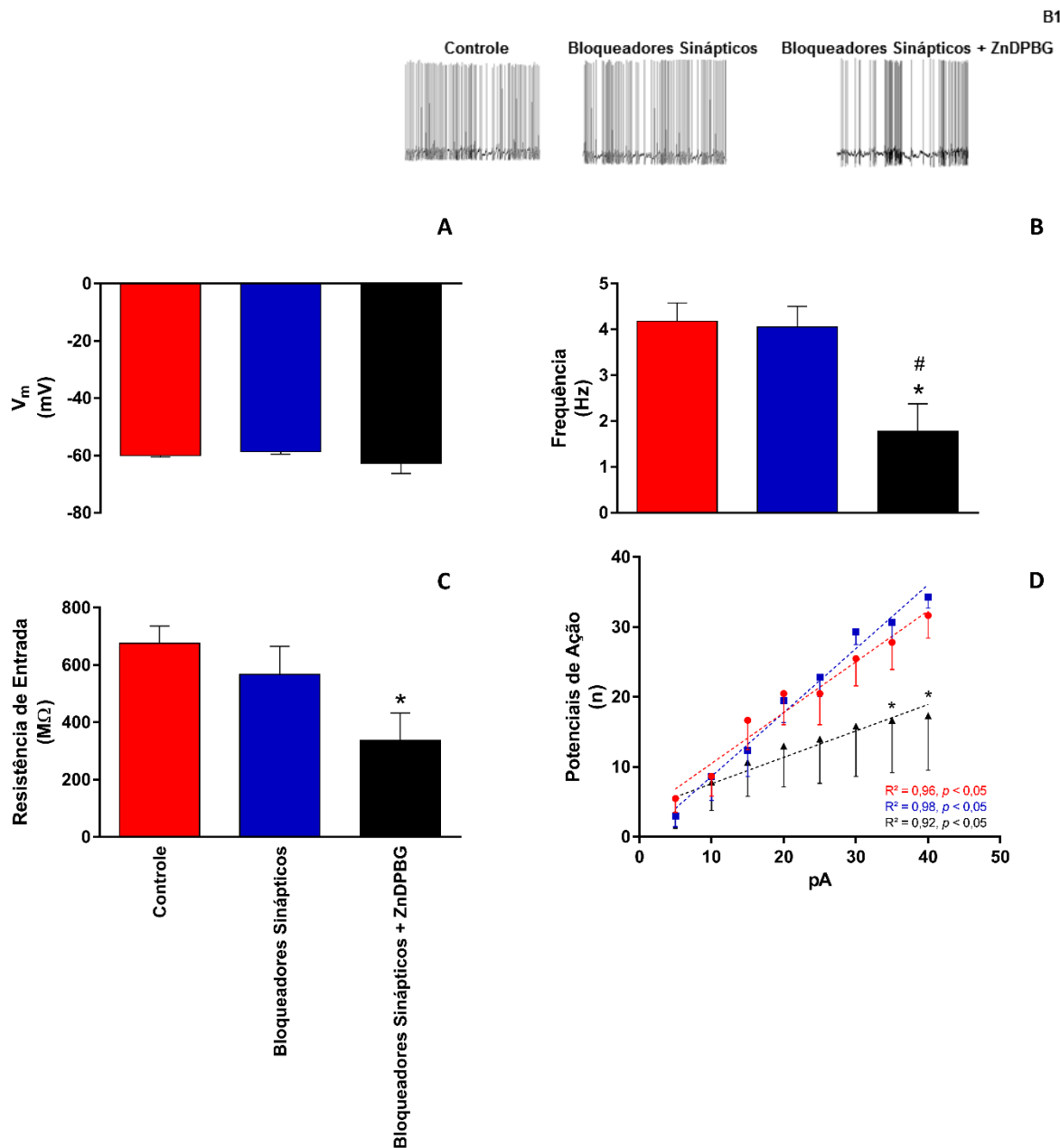
**Diagrama 5.** Linha do tempo do Protocolo IV.

**RESULTADOS**

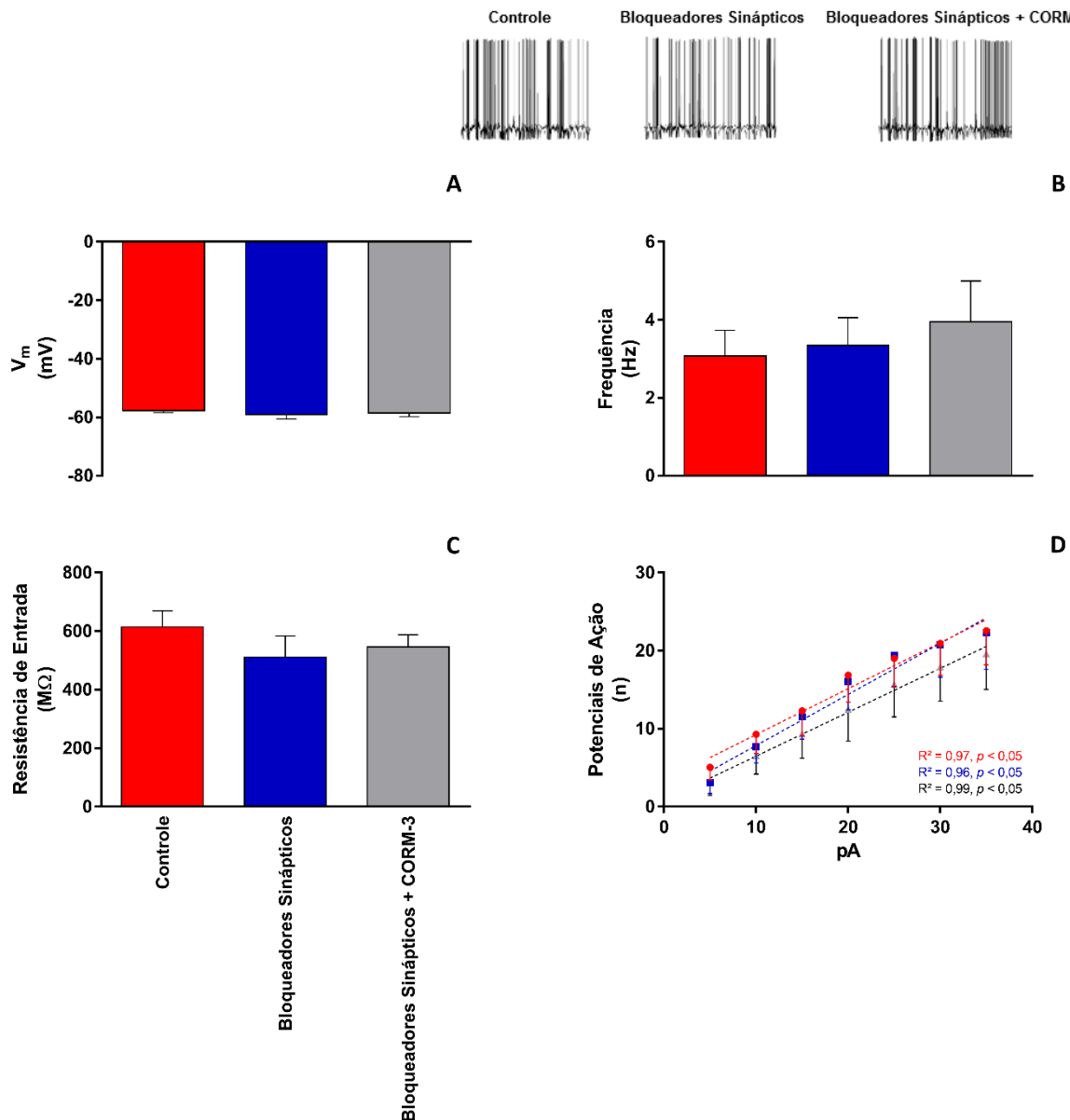


## 4 RESULTADOS

### 4.1 PROTOCOLO I. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PASSIVAS DE NEURÔNIOS MAGNOCELULARES DO NÚCLEO SUPRAÓPTICO DE RATOS WISTAR MACHOS



**Figura 1.** Efeitos da superfusão de aCSF, bloqueadores sinápticos (DNQX, 10  $\mu$ M; D-AP5, 30  $\mu$ M; PICRO, 30  $\mu$ M) ou bloqueadores sinápticos associados ao ZnDPBG (30  $\mu$ M) nas propriedades passivas de membrana de neurônios magnoceleulares do núcleo supraóptico: potencial de repouso (A), frequência (B), resistência de entrada (C) e excitabilidade (D). Em B1 estão esquematizados traços demonstrativos obtidos durante as análises de frequência (B). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo “bloqueadores sinápticos”. Em A, B e C, os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Os resultados mostrados em D foram analisados via ANOVA de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher.

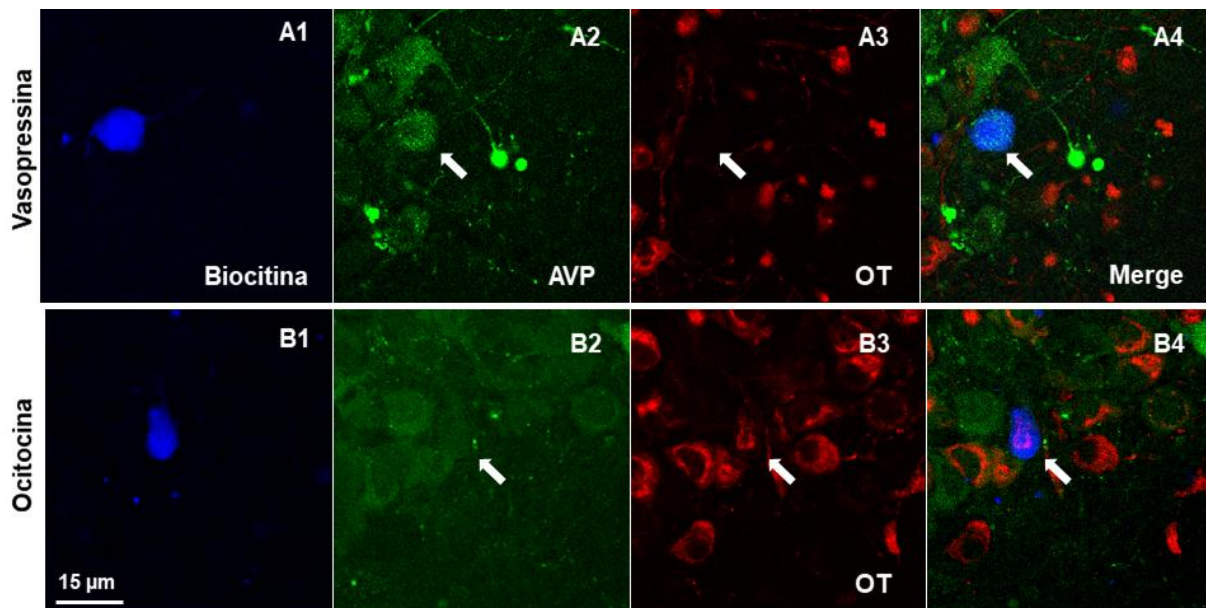


**Figura 2.** Efeitos da superfusão de aCSF, bloqueadores sinápticos (DNQX, 10  $\mu$ M; D-AP5, 30  $\mu$ M; PICRO, 30  $\mu$ M) ou bloqueadores sinápticos e CORM-3 (30  $\mu$ M) nas propriedades passivas de membrana de neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico: potencial de repouso (A), frequência (B), resistência de entrada (C) e excitabilidade (D). Em B1 estão esquematizados traços demonstrativos obtidos durante as análises de frequência (B). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. Em A, B e C, os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Os resultados mostrados em D foram analisados via ANOVA de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher.

A superfusão com bloqueadores de sinapse não apresentou efeitos em nenhuma propriedade passiva de membrana analisada, enquanto em associação com o ZnDPBG reduziu a frequência de disparo ( $F_{2,12} = 7,49$ ;  $p < 0,05$ ) em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ) e com os bloqueadores sinápticos isolados ( $p < 0,05$ ) (Figura 1B e 1B1), assim como diminuiu a resistência de entrada ( $F_{2,14} = 3,87$ ;  $p < 0,05$ ) em relação à condição controle ( $p < 0,05$ ; Figura 1C), e a excitabilidade (Tratamento\*Corrente:  $F_{14,83} = 4,45$ ;  $p < 0,05$ ) nos steps “- 35

pA” e “- 40 pA” ( $p$ 's < 0,05; Figura 1D) também em relação ao controle porém não alterou o potencial de repouso dos neurônios analisados (Figura 1A).

Entre as células tratadas com ZnDPBG que foram analisadas e fenotipadas, nós registramos quantidades proporcionais de neurônios AVP e OT em acordo com os protocolos de “single-cell qPCR” e imunofluorescência (Figura 3). Em relação às células superfundidas com CORM-3 não foram observadas alterações nos parâmetros analisados (Figura 2) e essas células não foram fenotipadas.



**Figura 3.** Caracterização fenotípica de neurônios magnocelulares do SON pela técnica de imunofluorescência. Fotomicrografias representativas de neurônios registrados identificados como vasopressinérgico (A1 a A4) e ocitocinérgico (B1 a B4). As pipetas foram preenchidas com biocitina e visualizadas por streptavidina em azul (A1 e B1). A imunoreatividade à vasopressina está demonstrada em verde (A2 e B2) enquanto a imunoreatividade à ocitocina foi marcada em vermelho (A3 e B3). Os fenótipos foram identificados pela co-localização de biocitina com o peptídeo (A4 e B4).

## 4.2 PROTOCOLO II. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRIVAÇÃO HÍDRICA DE 24 E 48 HORAS EM RATOS WISTAR ADULTOS JOVENS TRATADOS COM INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ZNDPBG OU CORM-3 OU RESPECTIVOS VEÍCULOS (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> OU CORM-3<sub>INATIVADO</sub>).

### 4.2.1 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre o hematócrito e concentração plasmática de proteínas induzidos por diferentes períodos de desidratação

Como demonstrado na Tabela 1, a desidratação induziu o aumento do hematócrito ( $F_{2,31} = 37,96$ ;  $p < 0,05$ ) e proteína plasmática ( $F_{2,32} = 24,38$ ,  $p < 0,05$ ) dos grupos experimentais submetidos à inibição da HO (tabela 1), esse aumento foi pontualmente observado nos grupos privados de água por 24 e por 48 horas ( $p$ 's  $< 0,05$ , SNK) para o hematócrito e somente no grupo PH 48 para a concentração de proteína plasmática ( $p < 0,05$ , SNK) o qual foi ainda maior do que a observada em animais submetidos ao período mais curto de restrição hídrica ( $p < 0,5$ ). O tratamento com ZnDPBG não afetou esses parâmetros.

Parâmetro Plasmático	Controle		PH 24		PH 48		Euhidratação vs. Desidratação
	Veículo	ZnDPBG	Veículo	ZnDPBG	Veículo	ZnDPBG	
Hematócrito (%)	41,65 ± 1,5	39,20 ± 0,75	47,82 ± 0,68*	50,59 ± 1,21	53,11 ± 1,24*	53,33 ± 1,52	$F_{2,31} = 37,96$ ; $p < 0,05$
Proteína (g/dL)	6,30 ± 0,04	6,68 ± 0,08	7,13 ± 0,06	7,31 ± 0,11	8,16 ± 0,40*+	8,72 ± 0,37	$F_{2,32} = 24,38$ ; $p < 0,05$

**Tabela 1.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/4 µL) ou veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4 µL) sobre o hematócrito e a concentração de proteína plasmática de animais submetidos a 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas de privação hídrica ou euhidratados (grupo Controle). Valores estão expressos como média ± EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo PH 24. Análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Parâmetro Plasmático	Controle		PH 24		PH 48		Euhidratação vs. Desidratação
	Veículo	CORM-3	Veículo	CORM-3	Veículo	CORM-3	
Hematócrito (%)	44,36 ± 1,00	44,63 ± 1,05	50,91 ± 1,26*	49,38 ± 0,71	55,18 ± 1,02*+	52,77 ± 0,80	$F_{2,79} = 46,39$ ; $p < 0,05$
Proteína (g/dL)	4,18 ± 0,18	4,30 ± 0,14	5,18 ± 0,24*	4,88 ± 0,17	5,08 ± 0,18*	5,27 ± 0,20	$F_{2,32} = 24,38$ ; $p < 0,05$

**Tabela 2.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de CORM-3 (100 µM/4 µL) ou veículo (CORM-3<sub>Inativado</sub> 100 µM/4 µL) sobre o hematócrito e a concentração de proteína plasmática de animais submetidos a 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas de privação hídrica ou euhidratados (grupo Controle). Valores estão expressos como média ± EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo PH 24. Análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Em relação aos animais tratados com CORM-3 (Tabela 2), ambos parâmetros foram aumentados pela desidratação (hematócrito:  $F_{2,79} = 46,39$ ;  $p < 0,05$ ; e, proteína:  $F_{2,32} = 24,38$ ;  $p < 0,05$ ). Esse aumento foi significativo nos grupos PH 24 ( $p < 0,05$ , hematócrito;  $p < 0,05$ , proteína, SNK) e PH 48 ( $p < 0,05$ , hematócrito;  $p < 0,05$ , proteína, SNK). Enquanto na comparação aos dois diferentes períodos de privação hídrica, um aumento ainda maior foi observado no hematócrito dos animais PH 48 em relação aos PH 24 ( $p < 0,05$ , SNK), mas a doação central de CO não afetou os parâmetros analisados.

#### **4.2.2 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre as concentrações plasmáticas AVP, OT, ANP, CORT e ANG II induzidos por diferentes períodos de desidratação**

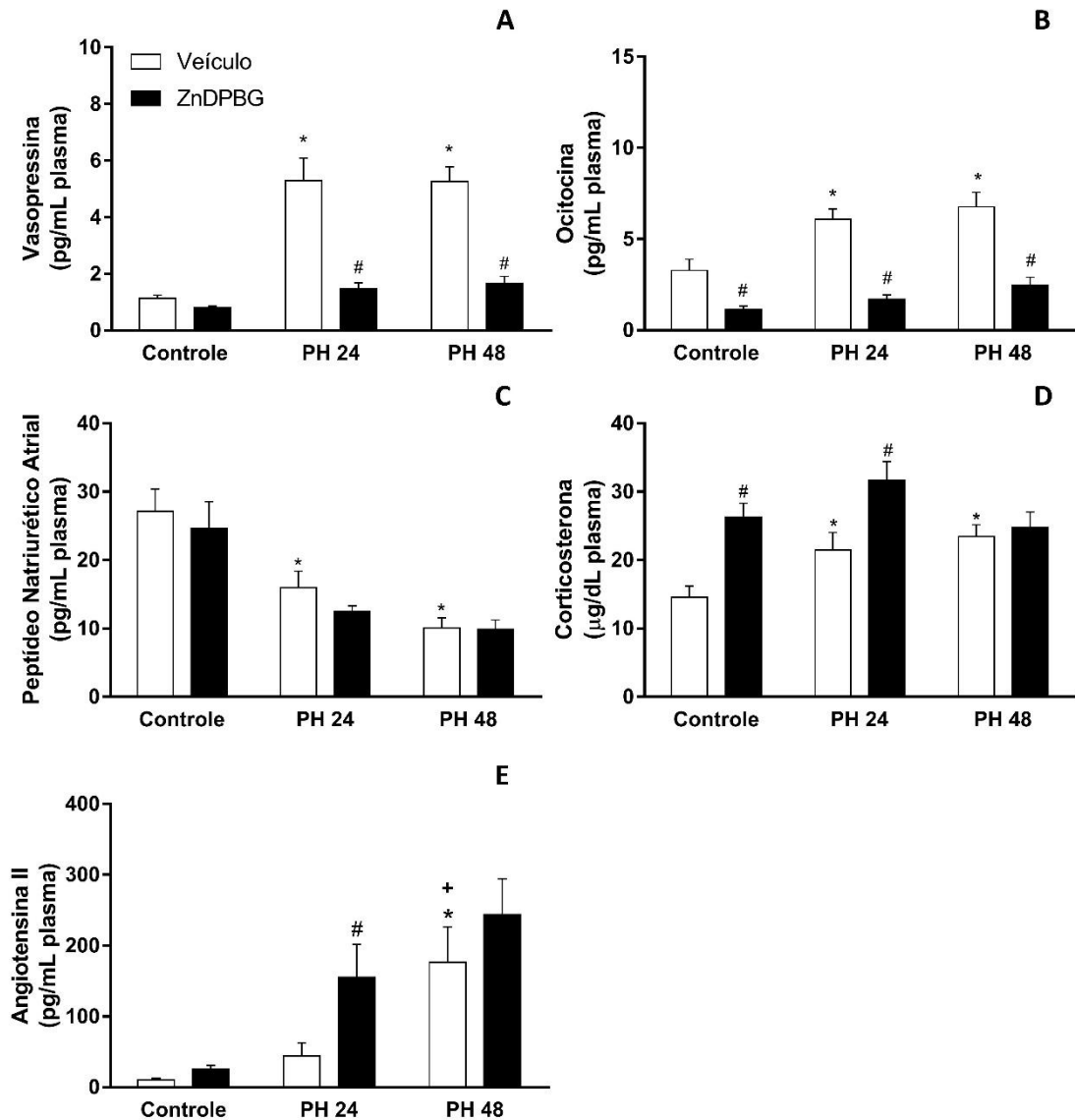
Independentemente do período de restrição hídrica, a desidratação induziu o aumento da concentração plasmática de AVP (ZnDPBG:  $F_{2,84} = 25,27$ ;  $p < 0,05$ , figura 4A; CORM-3:  $F_{2,63} = 28,57$ ;  $p < 0,05$ , figura 5A), OT (ZnDPBG:  $F_{2,85} = 12,21$ ;  $p < 0,05$ , figura 4B; CORM-3:  $F_{2,71} = 18,51$ ;  $p < 0,05$ , figura 5B), CORT (ZnDPBG:  $F_{2,33} = 6,79$ ;  $p < 0,05$ , figura 4D; CORM-3:  $F_{2,41} = 27,39$ ;  $p < 0,05$ , figura 5D) e ANG II (ZnDPBG:  $F_{2,42} = 14,75$ ;  $p < 0,05$ , figura 4E; CORM-3:  $F_{2,40} = 17,38$ ;  $p < 0,05$ , figura 5E) enquanto reduziu ANP (ZnDPBG:  $F_{2,40} = 20,84$ ;  $p < 0,05$ , figura 4C; CORM-3:  $F_{2,29} = 7,19$ ;  $p < 0,05$ , figura 5C) em ambos conjuntos de grupos experimentais.

No que se refere ao conjunto de grupos experimentais ZnDPBG, o mesmo aumento foi observado para AVP, OT e CORT em ambos PH 24 e PH 48 ( $p$ 's  $< 0,05$ , SNK) enquanto que para ANG II foi observado um aumento expressivo apenas no grupo 48 horas ( $p < 0,05$ , SNK) e apesar de aparentar que no grupo PH 48 há um decréscimo na concentração plasmática de ANP em relação ao grupo PH 24, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Em respeito ao set experimental de CORM-3, o mesmo perfil foi observado: ambos grupos PH 24 e PH 48 apresentam aumento específico nas concentrações plasmáticas de AVP, OT e CORT ( $p$ 's  $< 0,05$ , SNK), enquanto o pós-teste só detecta o aumento de ANG II no grupo 48 horas em comparação tanto ao grupo 24 horas quanto ao controle ( $p$ 's  $< 0,05$ , SNK) e há a redução de ANP nos dois grupos estimulados ( $p$ 's  $< 0,05$ , SNK).

Em condição controle (euhidratação) o tratamento com o inibidor da HO reduziu a concentração plasmática de OT ( $F_{1,85} = 78,71$ ;  $p < 0,05$ ), enquanto aumentou a de CORT ( $F_{1,62} = 18,17$ ;  $p < 0,05$ ) ( $p$ 's  $< 0,05$ , SNK). O tratamento com ZnDPBG reduziu o aumento induzido por privação hídrica, sendo o estímulo de 24 ou de 48 horas, tanto na concentração

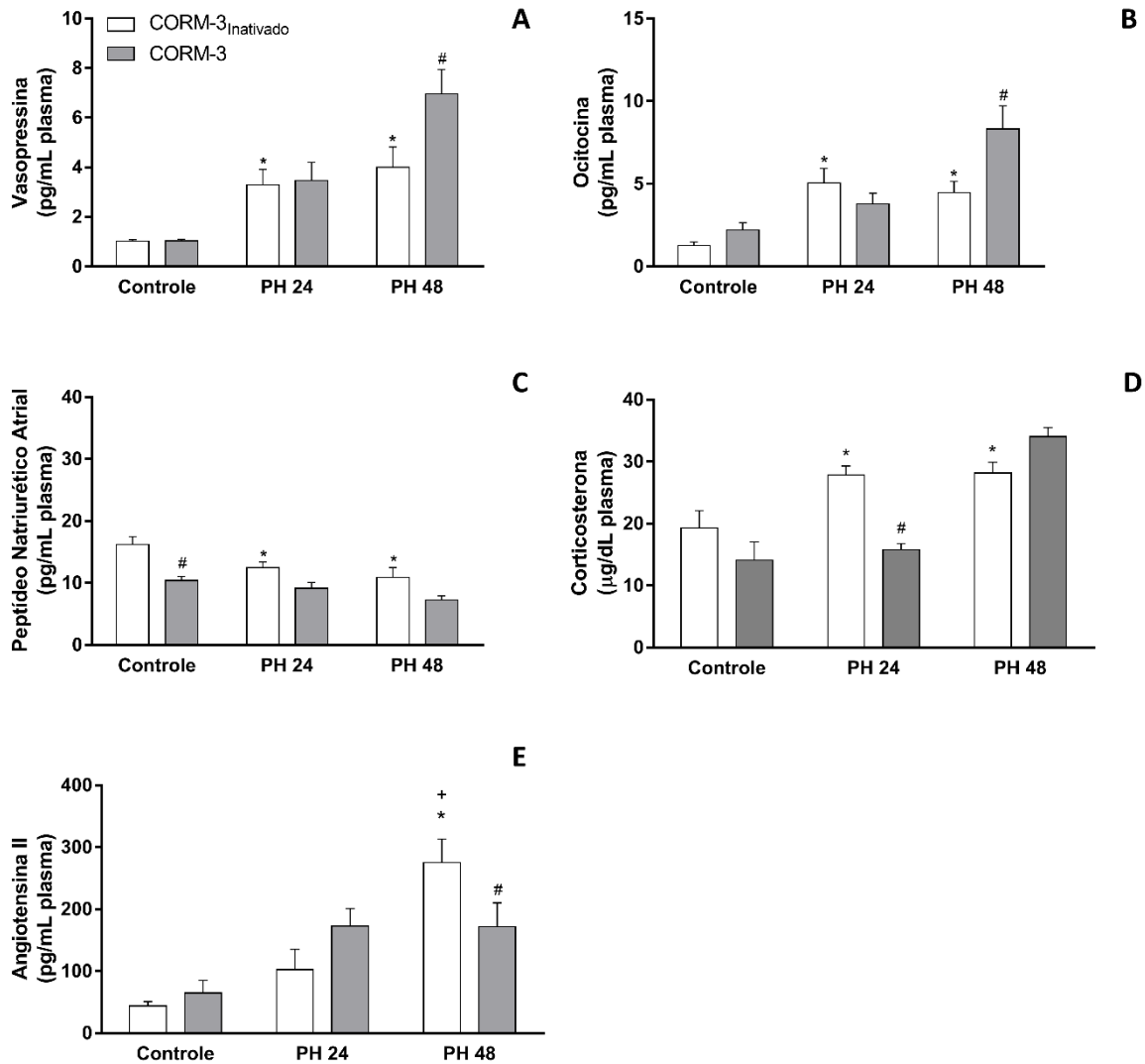
plasmática de OT ( $p$ 's < 0,05, SNK), quanto na de AVP ( $F_{1,84} = 63,05$ ;  $p < 0,05$ ;  $p$ 's < 0,05, SNK). Ao passo que o ZnDPBG icv potencializou apenas o efeito da PH 24 nas concentrações plasmáticas de CORT ( $p < 0,05$ , SNK) e ANG II ( $F_{1,42} = 4,81$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK) e não afetou ANP.



**Figura 4.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/4 µL) ou veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4 µL) sobre as concentrações plasmáticas de vasopressina (A), ocitocina (B), peptídeo natriurético atrial (C), corticosterona (D) e angiotensina II (E) de animais submetidos a 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas de privação hídrica ou euhidratados (grupo Controle). Valores estão expressos como média ± EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo PH 24; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com veículo submetido ao mesmo estímulo. Análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Nos animais hidratados a doação de CO reduziu a concentração plasmática de ANP ( $F_{1,29} = 22,14$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK). Em relação aos grupos PH 24 o aumento da concentração de CO central afetou a concentração plasmática de CORT, revertendo seu

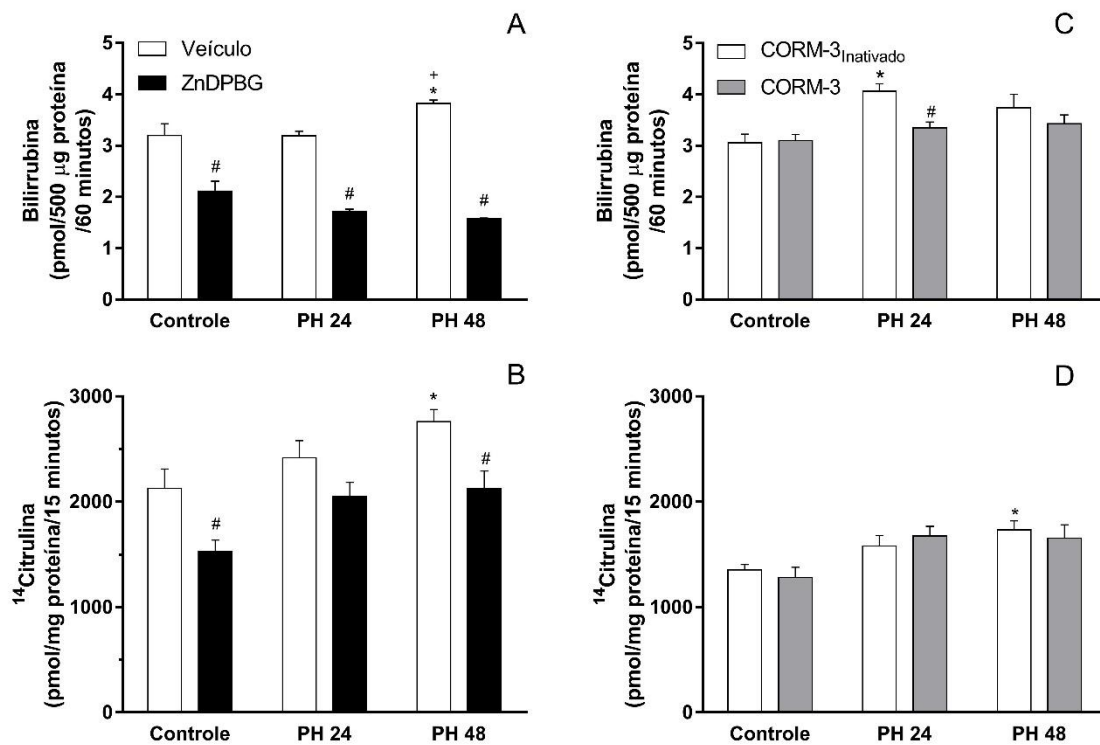
aumento induzido por esse estímulo ( $F_{1,41} = 5,43$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK). Já nos animais 48 horas, o tratamento icv com CORM-3 potencializou os efeitos desse estímulo sobre as concentrações plasmáticas de AVP ( $F_{1,63} = 4,63$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK) e OT (Estímulo\*Tratamento:  $F_{2,71} = 5,82$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK) enquanto reduziu o aumento de ANG II induzido por esse período de desidratação (Estímulo\*Tratamento:  $F_{2,40} = 4,62$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK).



**Figura 5.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de CORM-3 (100  $\mu\text{M}/4 \mu\text{L}$ ) ou veículo (CORM-3<sub>Inativado</sub> 100  $\mu\text{M}/4 \mu\text{L}$ ) sobre as concentrações plasmáticas de vasopressina (A), ocitocina (B), peptídeo natriurético atrial (C), corticosterona (D) e angiotensina II (E) de animais submetidos a 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas de privação hídrica ou euhidratados (grupo Controle). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo PH 24; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com veículo submetido ao mesmo estímulo. Análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

### 4.2.3 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre a atividade das enzimas HO e NOS hipotalâmicas induzidas por diferentes períodos de desidratação

Como pode ser observado na Figura 6A, a desidratação, de forma geral, aumenta a atividade das hemoxigenases ( $F_{2,88} = 17,01$ ;  $p < 0,05$ ) sendo esse efeito proeminente nas 48 horas ( $p < 0,05$ , SNK). Ainda, o tratamento com ZnDPBG reverteu não somente o aumento da atividade dessas enzimas induzido pela privação hídrica ( $F_{1,88} = 115,19$ ;  $p < 0,05$ ), como também reduziu a atividade basal da mesma ( $p < 0,05$ , SNK). No set experimental CORM-3 foi possível observar que a privação hídrica induz o aumento da atividade enzimática das HO ( $F_{1,34} = 7,72$ ;  $p < 0,05$ , figura 6C). Esse efeito foi reduzido pelo tratamento com o doador de CO ( $F_{1,34} = 5,3$ ;  $p < 0,05$ ) sendo esses resultados significativos no grupo de animais submetidos à privação hídrica de 24 horas ( $p < 0,05$ , SNK).



**Figura 6.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/4 µL) ou veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4 µL) (A e B) ou CORM-3 (100 µM/4 µL) ou veículo (CORM-3<sub>Inativado</sub> 100 µM/4 µL) (C e D) sobre as atividades das enzimas heme oxigenase (A e C) e óxido nítrico sintase (B e D) do hipotálamo médio basal de animais submetidos a 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas de privação hídrica ou euhidratados (grupo Controle). Valores estão expressos como média ± EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo PH 24; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com veículo submetido ao mesmo estímulo. Análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

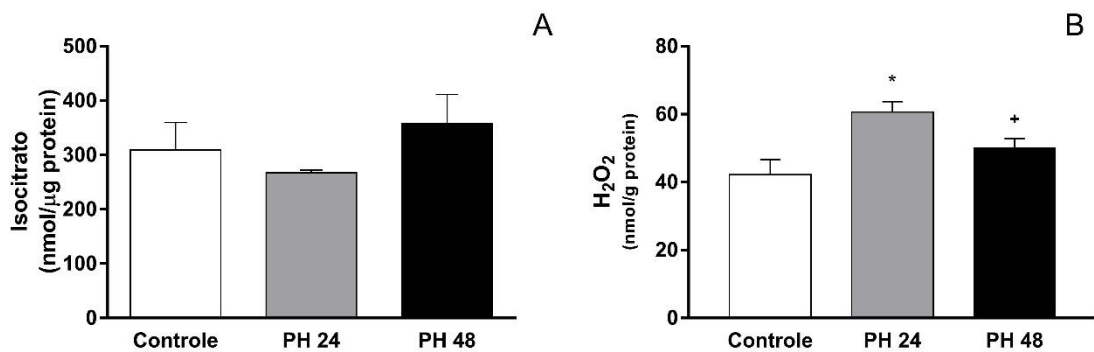


Ainda é possível observar que a privação hídrica de forma geral elevou a atividade das NOS ( $F_{2,34} = 21,09$ ;  $p < 0,05$ , Figura 6B), especialmente quando o animal foi submetido à PH 48 ( $p < 0,05$ , SNK) bem como, de maneira geral, o tratamento com ZnDPBG reverte esse efeito induzido pela desidratação ( $F_{1,34} = 20,42$ ;  $p < 0,05$ ), mais especificamente em condição basal ( $p < 0,05$ , SNK) e quando o animal foi submetido à desidratação prolongada ( $p < 0,05$ , SNK).

Em relação à atividade da óxido nítrico sintase nos grupos animais CORM-3 foi possível observar que a desidratação *per se* induziu aumento da atividade dessas enzimas ( $F_{2,27} = 7,29$ ;  $p < 0,05$ , figura 6D) e que esse aumento foi significativo quando o animal foi submetido à PH 48 ( $p < 0,05$ , SNK), no entanto, o tratamento com o CORM-3 não alterou o parâmetro avaliado.

#### 4.2.4 Efeito de diferentes períodos de privação hídrica sobre a atividade da aconitase e da produção de peróxido de hidrogênio hipotalâmicos

A privação hídrica, independente da duração, não alterou a atividade da aconitase hipotalâmica. Em contrapartida, houve o aumento da produção de peróxido de hidrogênio no hipotálamo médio basal ( $F_{2,30} = 6,98$ ;  $p < 0,05$ , figura 7B) no grupo PH 24 ( $p < 0,05$ , SNK), retornando ao nível do grupo controle quando os animais foram submetidos à PH 48 ( $p < 0,05$ , SNK).



**Figura 7.** Efeito da privação de 24 ou 48 horas sobre a atividade da aconitase (A) e produção de peróxido de hidrogênio (B). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo PH 24. Análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

#### 4.2.5 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre a expressão gênica de HO-1, nNOS, Nrf2, AT1R, Gss, Gclc e Gclm no SON induzida por diferentes períodos de desidratação

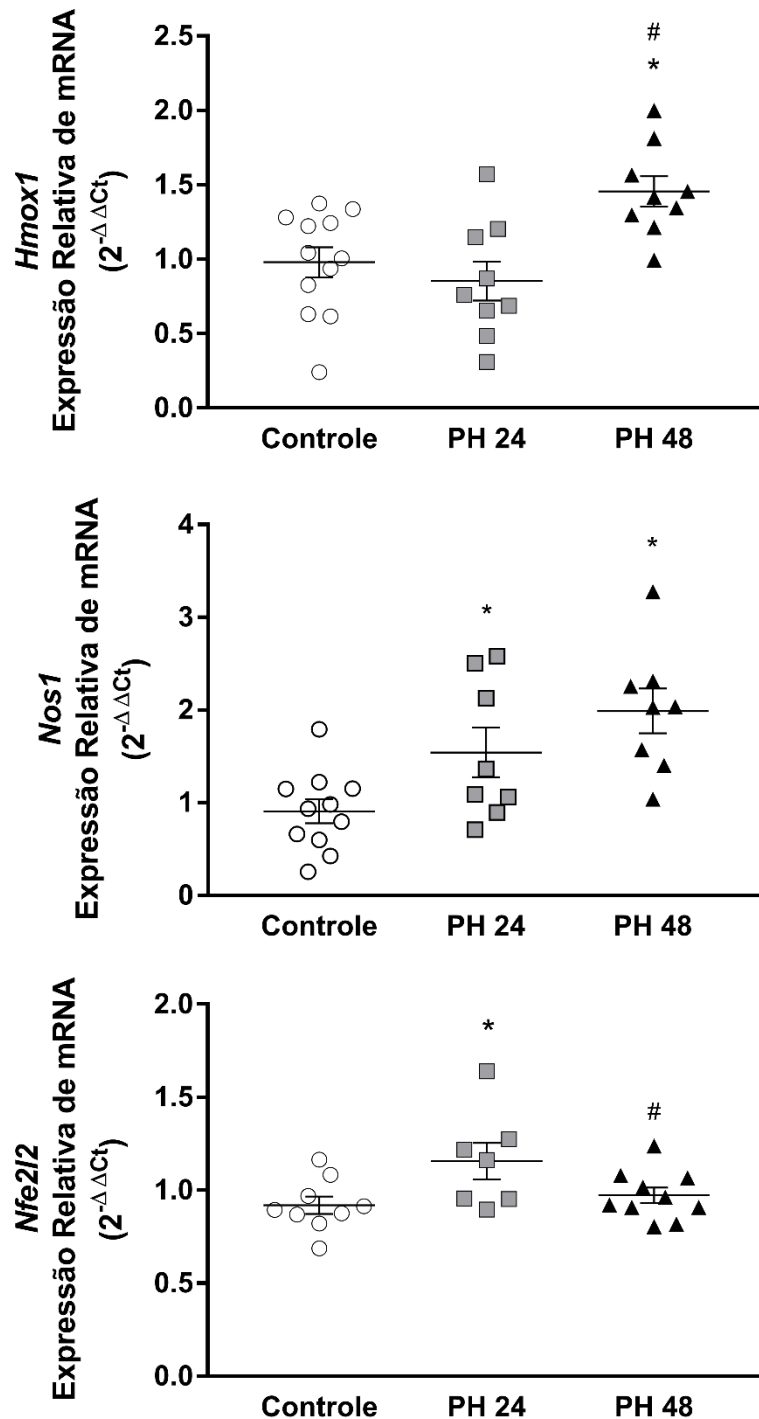
Foi observado que a privação hídrica aumentou a expressão de HO-1, nNOS e Nrf2 (HO-1:  $F_{2,27} = 7,54$ ;  $p < 0,05$ ; nNOS:  $F_{2,24} = 7,48$ ;  $p < 0,05$ ; Nrf2:  $F_{2,27} = 3,91$ ;  $p < 0,05$ ; figura 8). Em relação à expressão do gene *Hmox1* esse aumento foi específico em animais submetidos à privação hídrica de 48 horas ( $p < 0,05$  tanto em relação ao grupo controle, quanto ao grupo desidratado por 24 horas; figura 8A), enquanto o Nrf2 aumentou somente no grupo PH 24 ( $p < 0,05$ ; figura 8C). Já o mRNA da nNOS aumentou de maneira progressiva tanto na privação hídrica de 24 horas, quanto na de 48 horas ( $p$ 's  $< 0,05$ ; figura 8B).

Ao analisar, de maneira conjunta, os animais tratados com o doador (figura 9B; figura 9D; figura 9F), foi demonstrado que a droga induziu o aumento da expressão de Nrf2 em animais controles ( $F_{1,37} = 11,1$ ;  $p < 0,015$ ;  $p < 0,05$ , SNK; figura 9F) mas não apresentou efeito sobre os demais parâmetros analisados. Contudo, em relação aos animais tratados com o inibidor (figura 9A; figura 9C; figura 9E), a administração icv de ZnDPBG diminuiu a expressão de HO-1 (figura 9A), nNOS (figura 9C) e Nrf2 (figura 9E) no grupo PH 48 (HO-1:  $F_{1,42} = 21,06$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK; nNOS:  $F_{1,38} = 28,83$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK; Nrf2:  $F_{1,44} = 4,82$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , SNK).

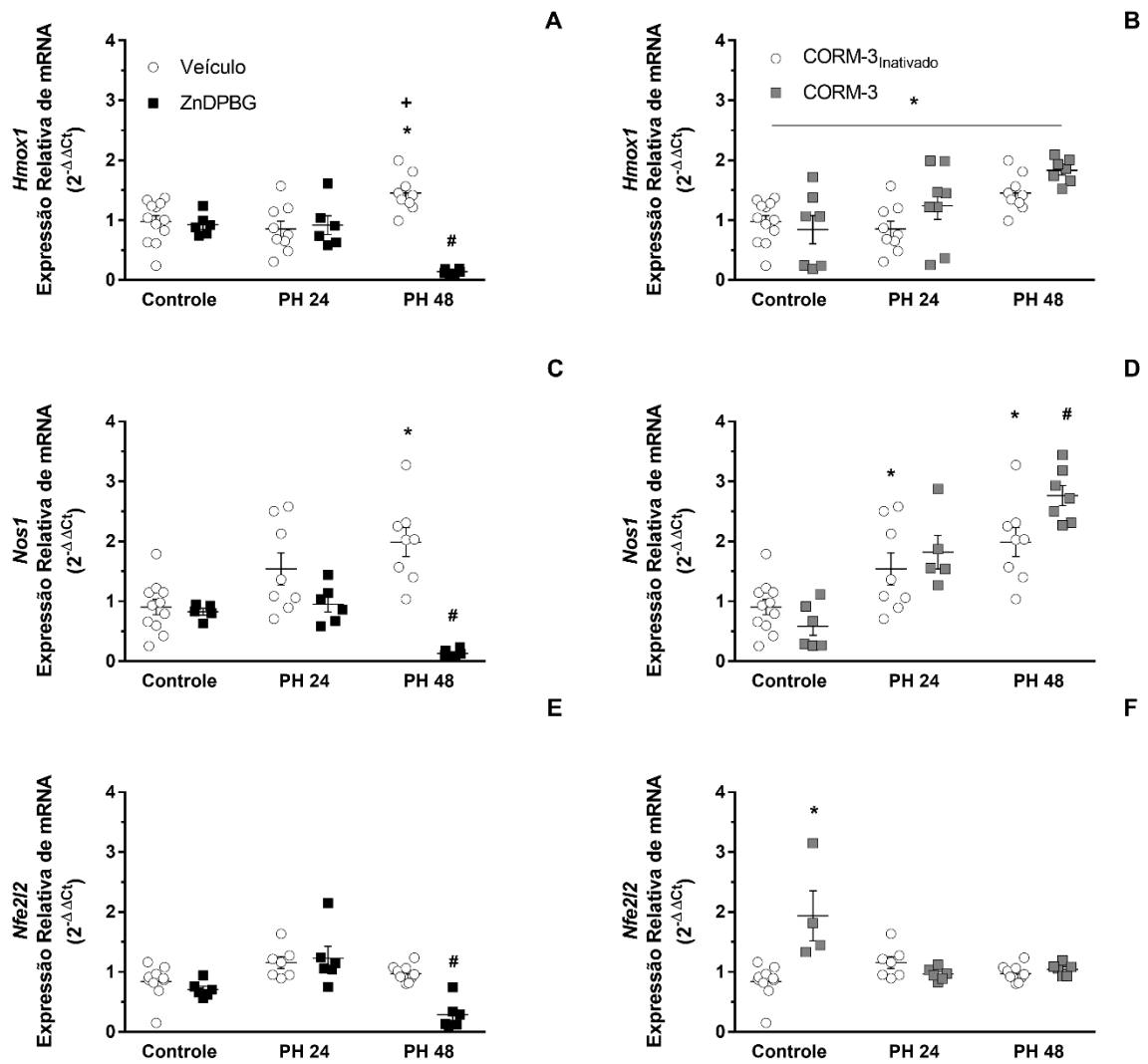
Ainda, ao estimar a correlação da expressão dos genes *Nos1* e *Nfe2l2* em função da expressão do gene *Hmox1*, observou-se que, independente do tratamento, há uma correlação direta com a expressão do mRNA da nNOS em todas as situações avaliadas (Controle:  $R^2 = 0,55$ ;  $F_{1,22} = 27,28$ ;  $p < 0,05$ ; figura 10A; ZnDPBG:  $R^2 = 0,82$ ;  $F_{1,15} = 68,57$ ;  $p < 0,05$ ; figura 10C; CORM-3:  $R^2 = 0,73$ ;  $F_{1,16} = 42,6$ ;  $p < 0,05$ ; figura 10E). Enquanto há uma correlação direta *Hmox1-Nfe2l2* somente em animais tratados com os veículos ( $R^2 = 0,34$ ;  $F_{1,20} = 10,45$ ;  $p < 0,05$ ; figura 10B).

A desidratação por 24 horas induziu o aumento na expressão dos genes que codificam o receptor de angiotensina do tipo 1 ( $F_{2,20} = 8,62$ ;  $p < 0,05$ ; figura 11A,  $p < 0,05$ , Tukey pós-teste), a glutatona sintetase ( $F_{2,25} = 13,66$ ;  $p < 0,05$ ; figura 11B,  $p < 0,05$ , Tukey pós-teste) e as subunidades catalítica ( $F_{2,25} = 3,74$ ;  $p < 0,05$ ; figura 11C,  $p < 0,05$ , Tukey pós-teste) e reguladora ( $F_{2,25} = 3,04$ ;  $p < 0,05$ ; figura 11D,  $p < 0,05$ , Tukey pós-teste) da enzima glutamato-cisteína ligase. Aparte a expressão de ATR1 que apresentou conteúdo similar aos animais controle, o conteúdo de mRNA dos genes avaliados permaneceram elevados quando

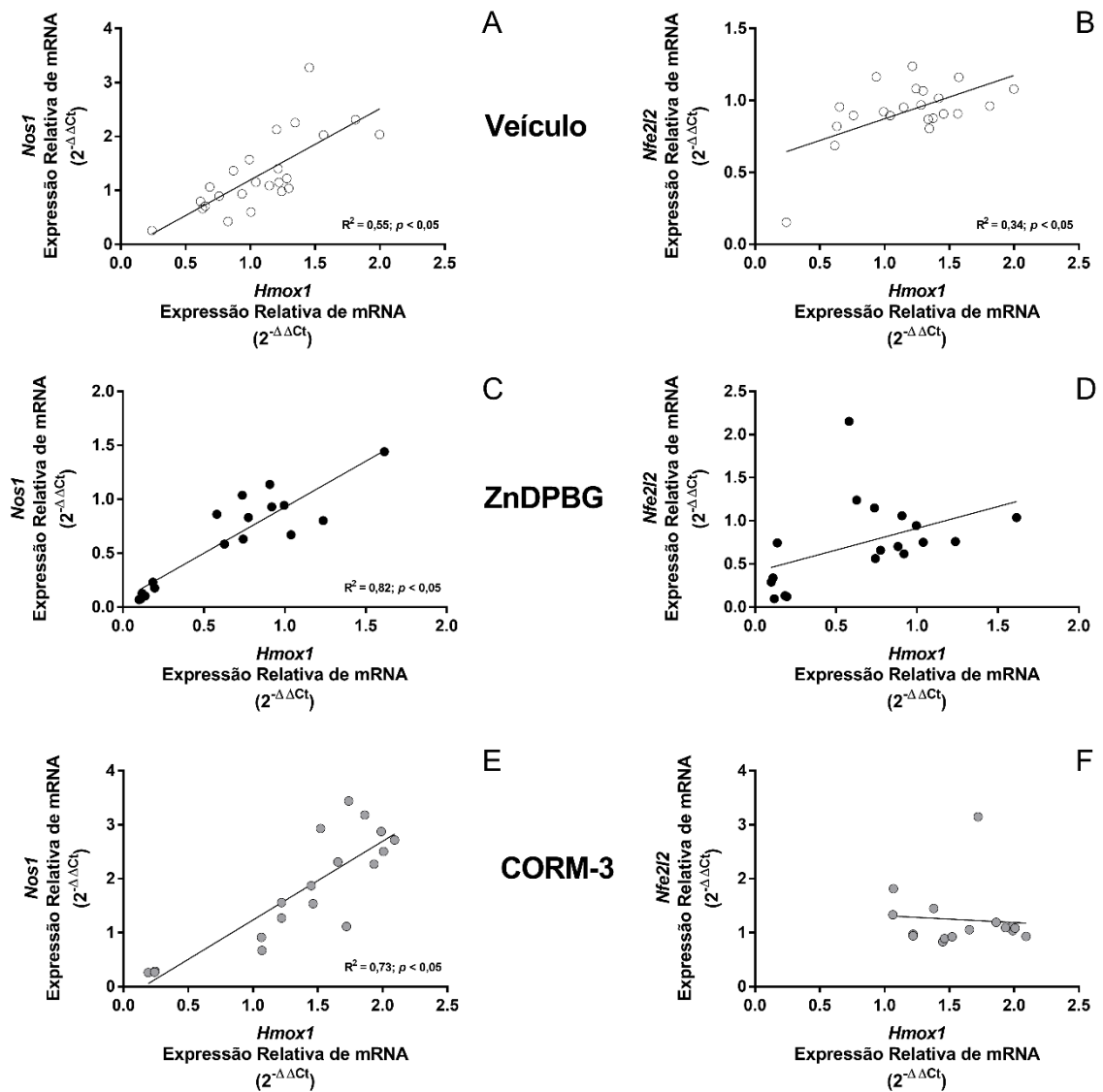
a privação hídrica foi mantida por 48 horas ( $p$ 's < 0,05, Tukey pós-teste) porém não foram maiores do que os observados em animais do grupo PH 24.



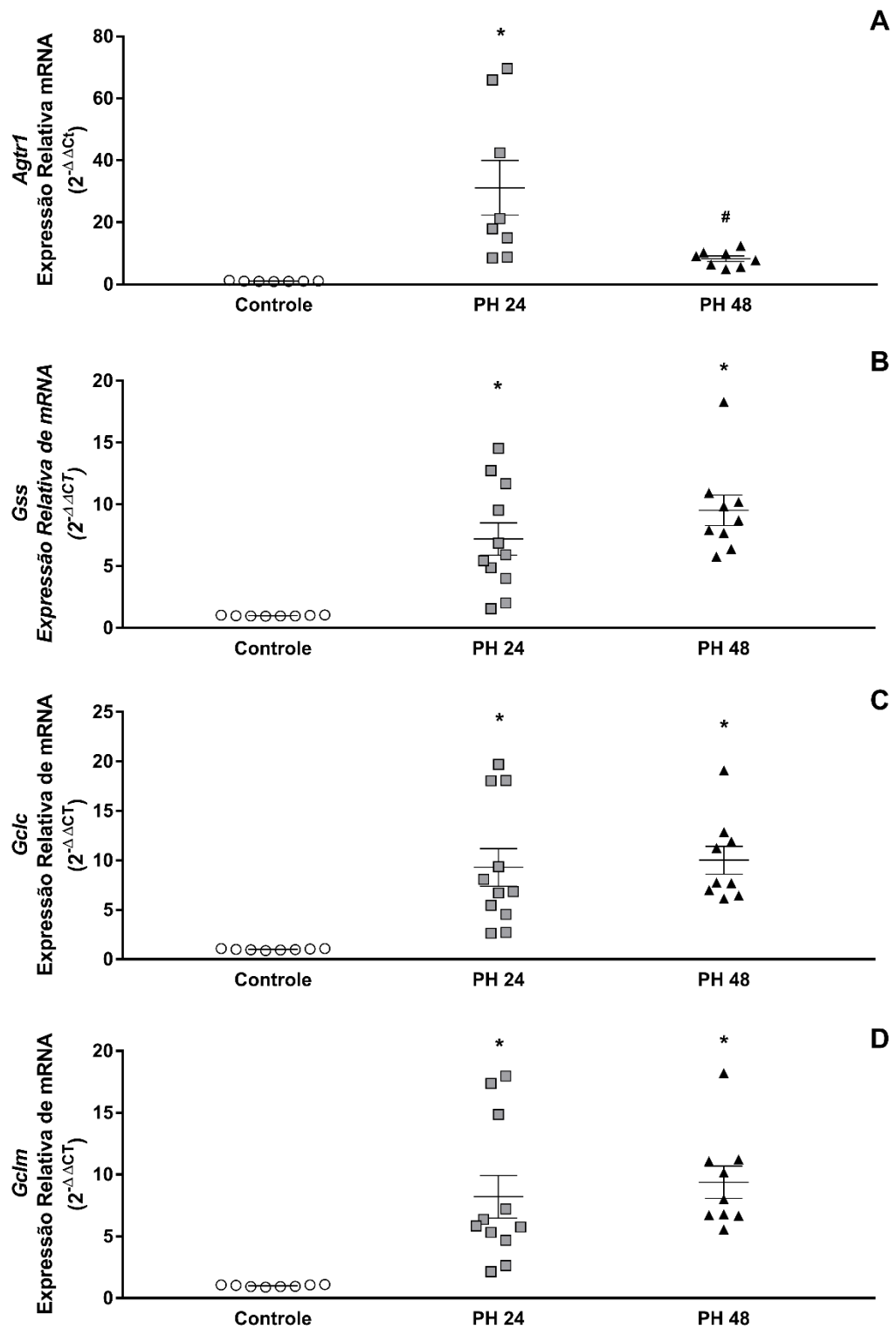
**Figura 8.** Expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *Hmox-1* (A), *Nos-1* (B) e *Nfe2l2* (C) no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p$  < 0,05 quando comparado aos animais controle; +  $p$  < 0,05 quando comparado aos animais submetidos à privação hídrica de 24 horas. Os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.



**Figura 9.** Efeito da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) (A; C; E) ou CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) ou seu veículo (CORM-3<sub>Inativado</sub> 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) (B; D; F) sobre a expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *Hmox-1* (A; B), *Nos-1* (C; D) e *Nfe2l2* (E; F) no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle tratado com veículo; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo sob mesmo estímulo tratado com veículo; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo submetido à privação hídrica de 24 horas tratado com veículo. Os resultados foram analisados via análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

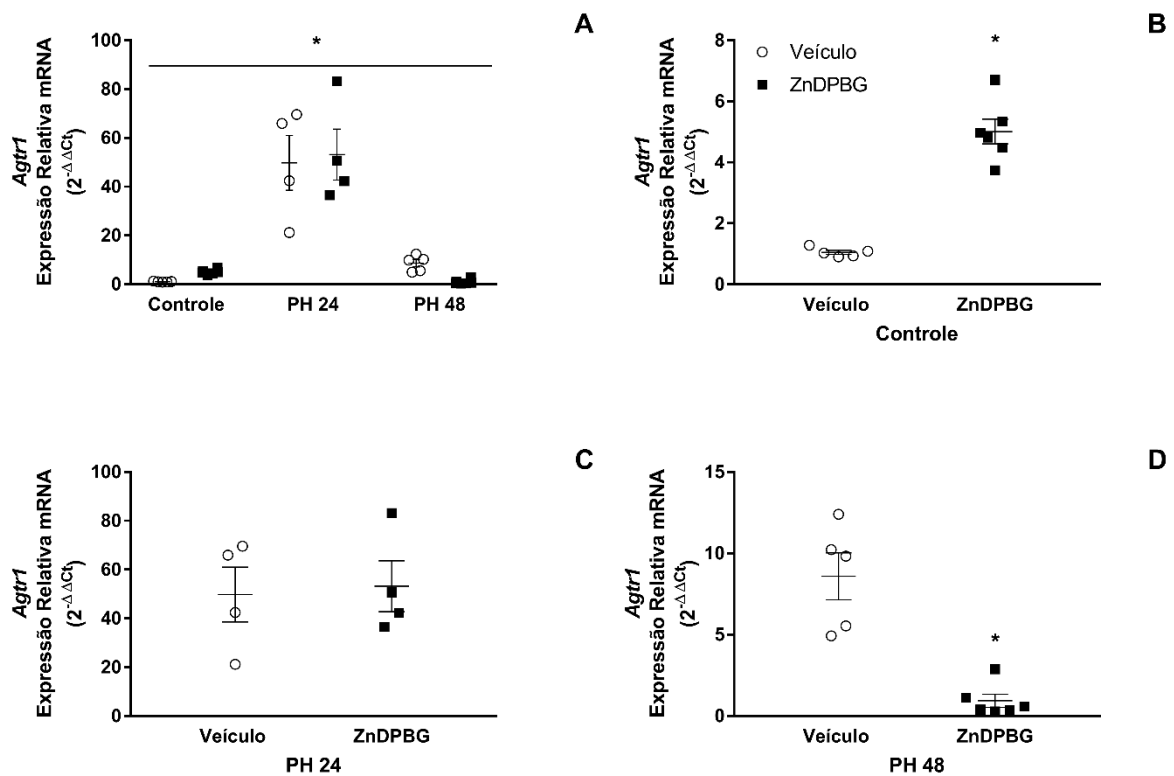


**Figura 10.** Efeito da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) (C; D) ou CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) ou seu veículo (CORM-3 Inativado 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) (E; F) sobre a correlação expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Hmox-1* com a expressão dos genes *Nos-1* (A; C; E) e *Nfe2l2* (B; D; F) no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Os resultados estão demonstrados em gráfico *scatter plot* e a correlação entre as variáveis foi analisada por regressão linear, o tamanho da associação está descrito por  $R^2$ .

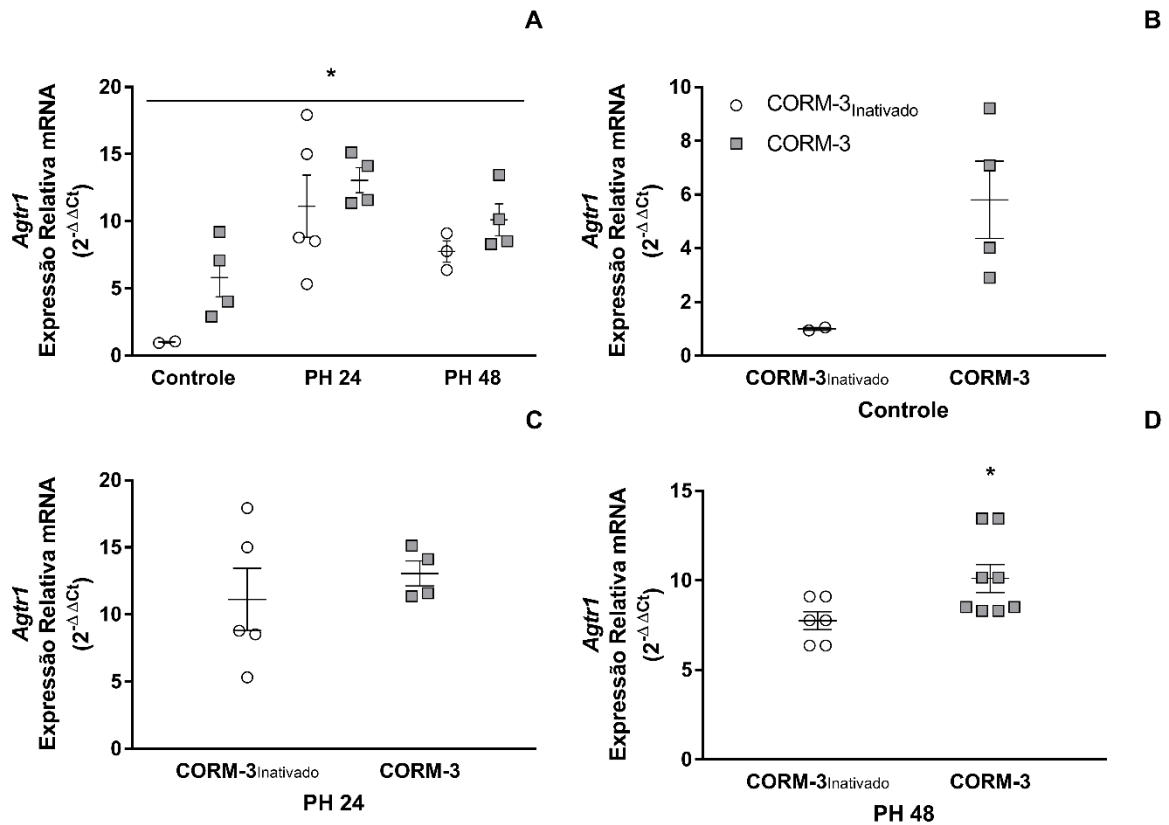


**Figura 11.** Expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *Agtr1* (A), *Gss* (B), *Gclc* (C) e *Gclm* (D) no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais controle; #  $p < 0,05$  quando comparado aos animais submetidos a PH 24. Os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Tukey.

O tratamento com ZnDPBG afetou a expressão de *Agtr1*, contudo a análise por Two-way ANOVA não foi capaz de indicar diferenças específicas entre os grupos tratados com veículo vs aqueles tratados com ZnDPBG. Por esse motivo, a análise foi realizada via Teste T de Student nas diferentes condições de hidratação, dessa forma, avaliou-se apenas se o tratamento com ZnDPBG alterou a expressão do gene-alvo (figura 12B, C e D) e não o efeito da desidratação sobre esse parâmetro (esse que foi analisado nas figuras 11A e 12A). Em animais hidratados o tratamento com ZnDPBG induziu o aumento de ATR1 mRNA ( $p < 0,05$ , Teste T), enquanto em animais restritos de água por 48 horas o ZnDPBG reduziu a expressão ( $p < 0,05$ , Teste T). A mesma forma de análise foi aplicada aos animais tratados com o doador de CO (figura 13). A injeção icv de CORM-3 aumentou a expressão de *Agtr1* no grupo de animais submetidos à privação hídrica de 48 horas ( $p < 0,05$ , Teste T).



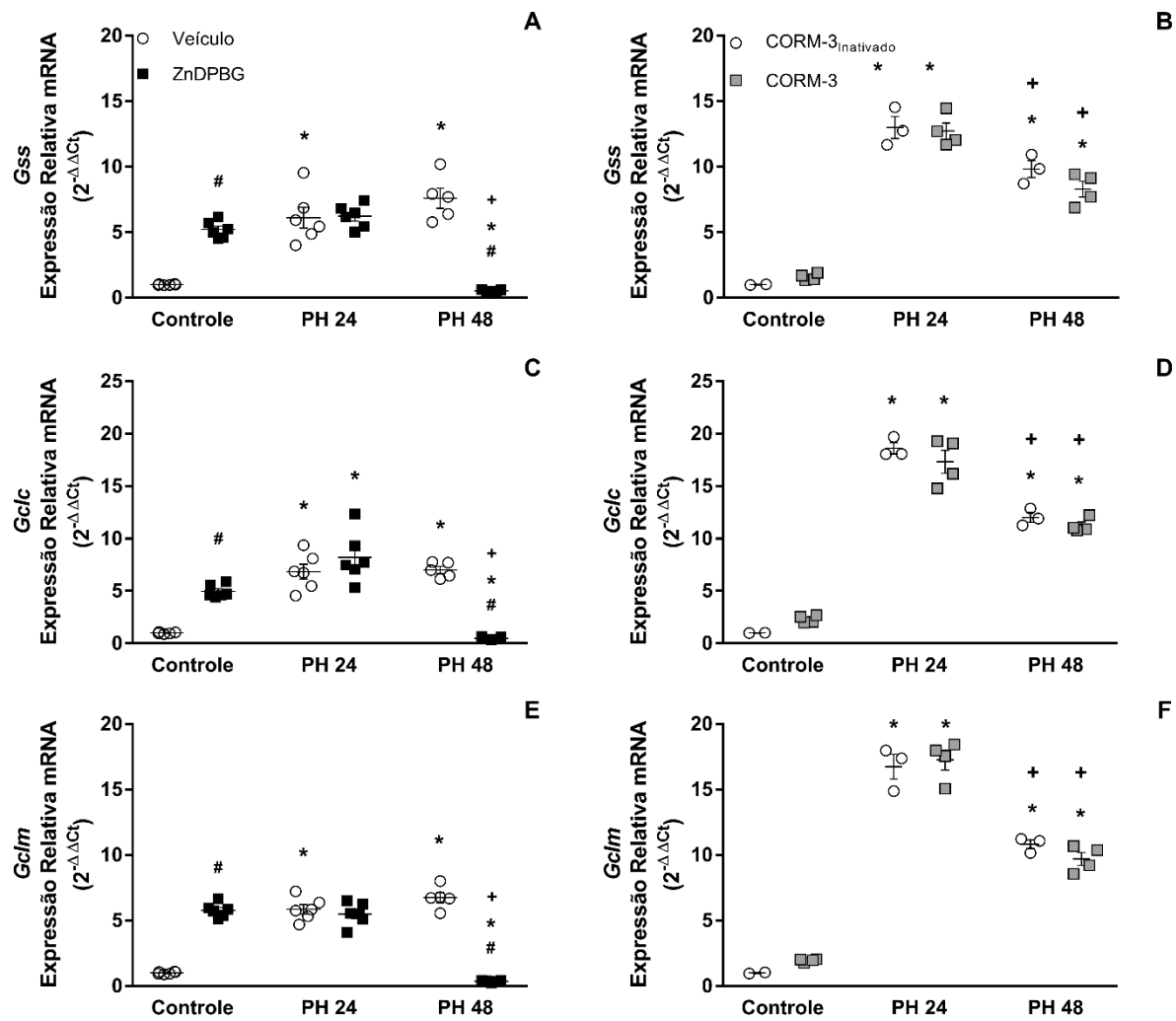
**Figure 12.** Efeito da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) na expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Agtr1* no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas (A); em animais hidratados (B); em animais submetidos à PH 24 (C) e em animais submetidos à PH 48 (D); Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  para o teste de análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) (A); \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais controle (B; C; D), os resultados foram analisados via teste T de Student.



**Figura 13.** Efeito da injeção intracerebroventricular de CORM-3 (100  $\mu\text{M}/4 \mu\text{L}$ ) ou seu veículo (CORM-3 Inativado 100  $\mu\text{M}/4 \mu\text{L}$ ) na expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Agtr1* no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas (A); em animais hidratados (B); em animais submetidos à PH 24 (C) e em animais submetidos à PH 48 (D). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  para o teste de análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) (A); \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais controle (B; C; D), os resultados foram analisados via teste T de Student.

Quanto aos genes relacionados ao sistema da glutathiona, o tratamento com ZnDPBG alterou a expressão de *Gss* ( $F_{1,28} = 5,42$ ;  $p < 0,05$ ; figura 14A), *Gclc* (Estímulo\*Tratamento:  $F_{2,28} = 46,05$ ;  $p < 0,05$ ; figura 14B) e *Gclm* ( $F_{1,28} = 8,43$ ;  $p < 0,05$ ; figura 14C) aumentando suas expressões em animais hidratados ( $p$ 's  $< 0,05$ , Tukey pós-teste) e reduzindo o aumento induzido pela privação de 48 horas ( $p$ 's  $< 0,05$ , Tukey pós-teste). O tratamento com CORM-3 não alterou esses parâmetros.



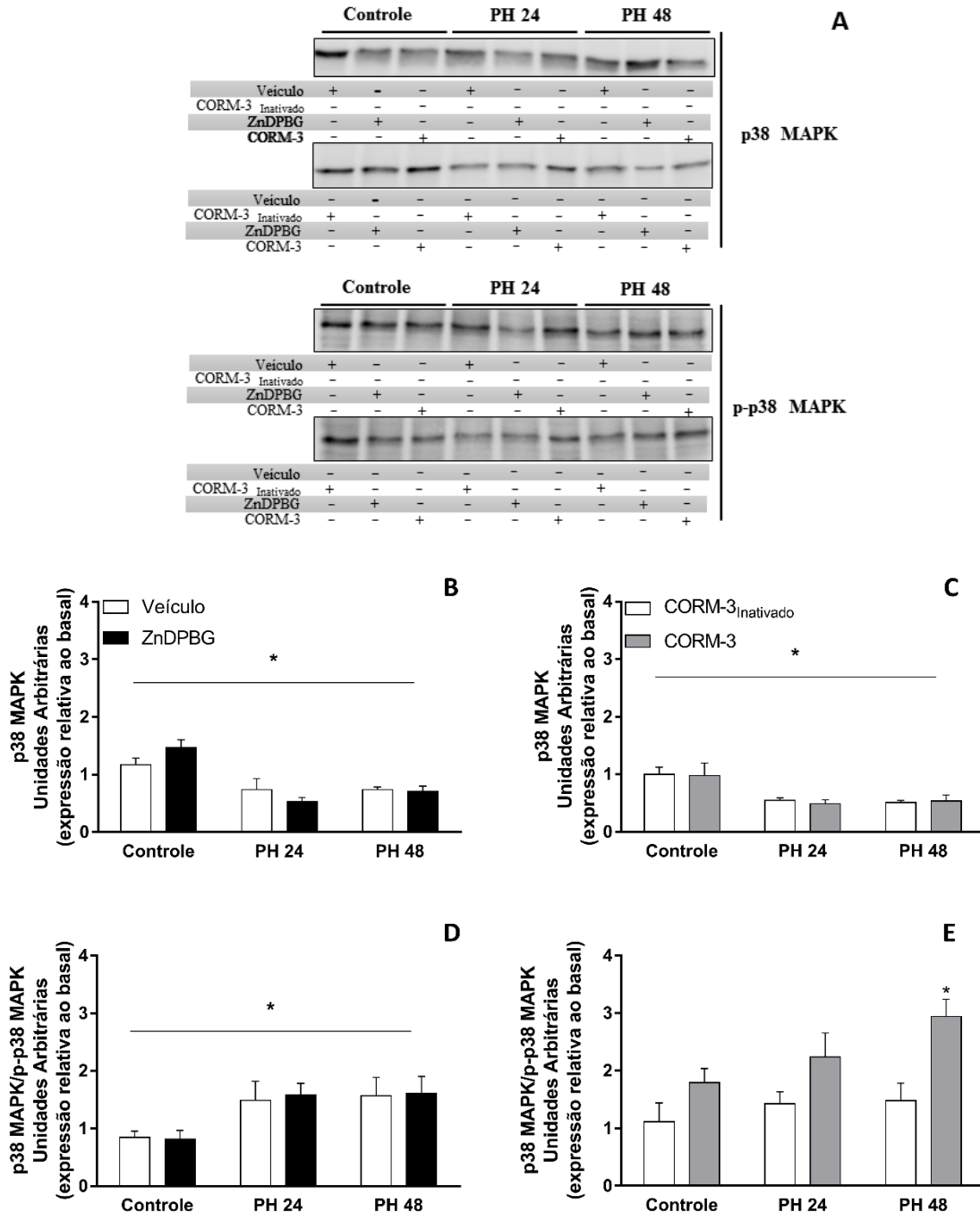


**Figura 14.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4μL) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4 μL) (A; C; E) ou CORM-3 (100 μM/4 μL) ou seu veículo (CORM-3 Inativado 100 μM/4 μL) (B; D; F) sobre a expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *Gss* (A; B), *Gclc* (C; D) e *Gclm* (E; F) no núcleo supraóptico de animais submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Valores estão expressos como média ± EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle com mesmo tratamento; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo sob mesmo estímulo tratado com veículo; +  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo submetido à privação hídrica de 24 horas com mesmo tratamento. Os resultados foram analisados via análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido pelo pós-teste Tukey.

#### 4.2.6 Efeito da doação de CO ou inibição da formação central de CO sobre a expressão proteica de p38 MAPK e p-p38 MAPK no SON induzida por diferentes períodos de desidratação

De acordo com os resultados obtidos nos protocolos de *western blotting*, foi possível observar que a desidratação reduziu o conteúdo total de p38 MAPK do SON (Zn:  $F_{2,21} = 18,9$ ;  $p < 0,05$ ; CORM-3:  $F_{2,20} = 7,41$ ;  $p < 0,05$ ; figura 15A e 15B). No entanto, a restrição hídrica também induziu aumento na proporção da forma fosforilada da proteína em relação a não

fosforilada (p-p38 MAPK/ p38 MAPK) (Zn:  $F_{2,21} = 5,2$ ;  $p < 0,05$ ; figura 15B). Em relação aos grupos do bloco experimental CORM-3, somente o tratamento aumentou a razão p-p38 MAPK/p38 MAPK ( $F_{1,20} = 12,60$ ;  $p < 0,01$ ; figura 15D) com um aumento pronunciado no grupo CORM-3 PH 48 ( $p < 0,05$ , SNK).

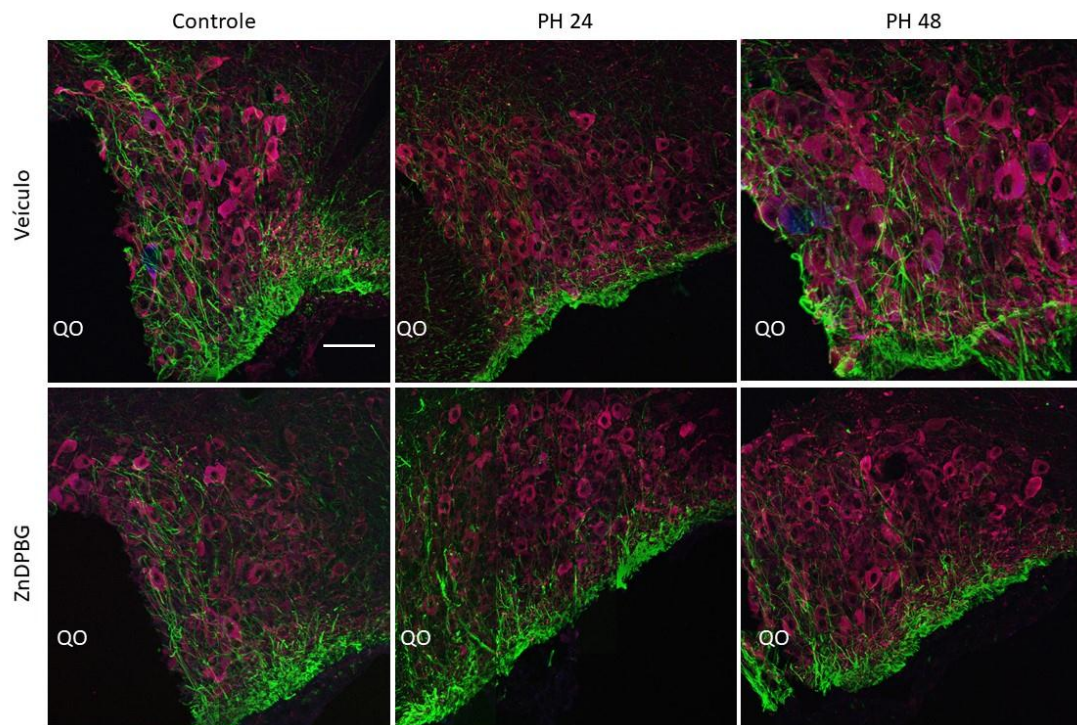


**Figura 15.** Efeitos da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) (B; D) ou CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) ou seu veículo (CORM-3 Inativado 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) (C; E) no conteúdo proteico de p38 MAPK (B; C) e p-p38 MAPK/ p38 MAPK (D; E) do núcleo supraóptico de animais submetidos à 24 (24 WD) ou 48 (48 WD) horas de privação hídrica. Em A estão demonstrados os *blots* representativos. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. Em B, C e D: \* $p < 0,05$  na análise de variância de duas vias; em D: \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais tratados com veículo. Os resultados foram

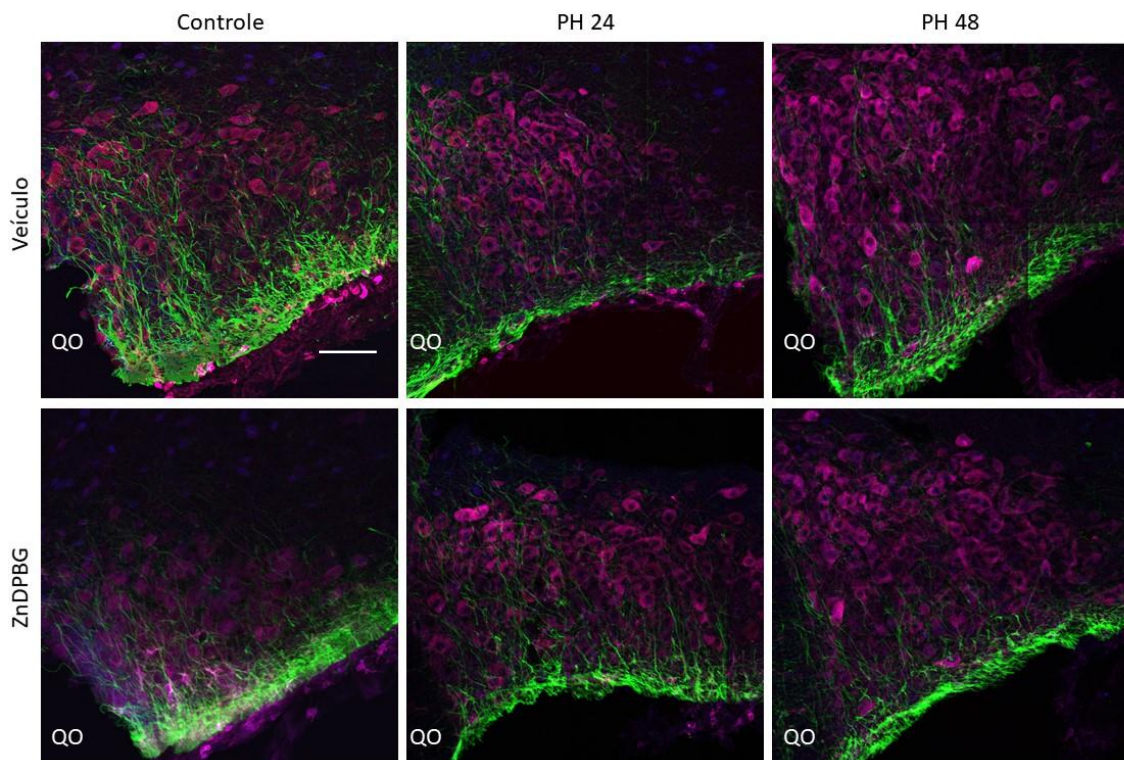
analisados via análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

#### **4.2.7 Efeito da inibição da formação central de CO sobre a expressão proteica de HO-1, nNOS e GFAP no SON induzida por diferentes períodos de desidratação**

A observação qualitativa das fotomicrografias de seções coronais contendo o SON sugere que os neurônios que compõem esse núcleo expressam ambos HO-1 (figura 16) e nNOS (figura 17) constitutivamente, e que essas proteínas estão presentes em células GFAP-negativas.



**Figura 16:** Efeito da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) sobre a imunorreatividade da HO-1 (vermelho) e GFAP (verde) no SON de animais hidratados (controle) ou submetidos a privação hídrica de 24 horas (PH24h). QO: quiasma óptico. Escala: 10  $\mu$ m.

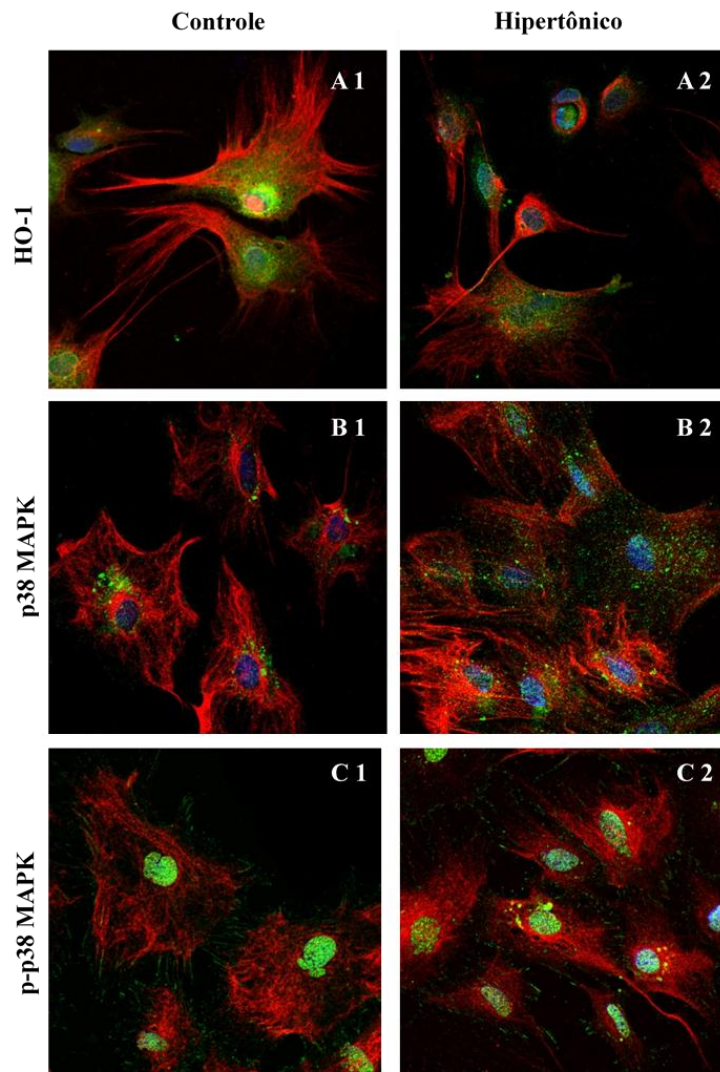


**Figura 17:** Efeito da injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) sobre a imunorreatividade da nNOS (vermelho) e GFAP (verde) no SON de animais hidratados (controle) ou submetidos a privação hídrica de 24 horas (PH24h). QO: quiasma óptico. Escala: 100  $\mu$ m

### 4.3 PROTOCOLO III. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO HIPERTÔNICA SOBRE O IMUNORREATIVIDADE DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS A P38 MAPK, P-P38 MAPK E HO-1 DE RATOS WISTAR NEONATOS

Na figura 18 foi possível observar que astrócitos submetidos a estímulo hipertônico (aumento de 21% na osmolalidade da meio de cultura) apresentaram a retração celular (sugerido pelo número de células visíveis por campo e morfologia – células menores).

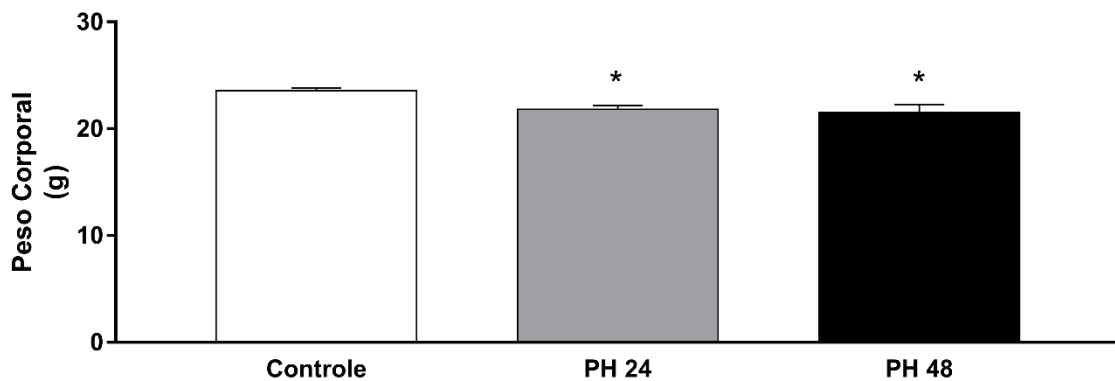
Aparentemente o hiperosmolalidade induziu a translocação da p38 MAPK do núcleo para o citoplasma, enquanto a isoforma fosforilada continuou localizada no núcleo das células no entanto, a distribuição aparentou ser menos uniforme (pontilhada) quando comparada ao grupo controle, além de se apresentar em grêmulos na região do retículo endoplasmático.



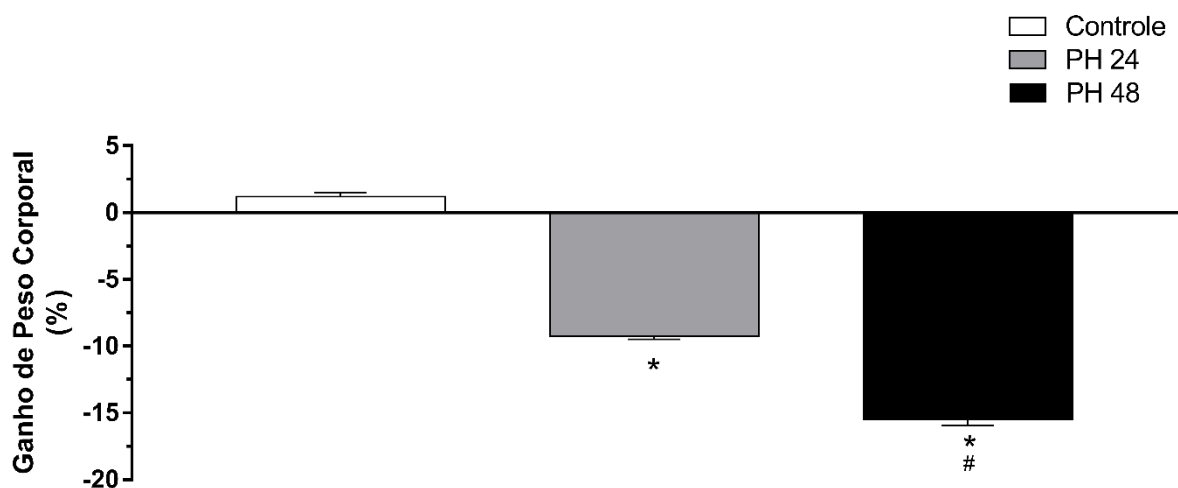
**Figura 18.** Fitomicrografias qualitativas de células astrocíticas hipotalâmicas obtidas a partir de cultura primária de HMB de ratos machos Wistar neonatos em situação controle (A1; B1 e C1) ou submetidas a 30 minutos de estímulo hiperosmótico (A2; B2; C2). Em azul está demonstrada a contracoloração com DAPI (marcação nuclear), em vermelho está demonstrada a imunorreatividade a proteína ácido fibrilar glial (GFAP) e em verde está demonstrada a imunomarcção para HO-1 (A1 e A2); p38 MAPK (B1 e B2) e p-p38 MAPK (C1 e C2).

#### 4.4 PROTOCOLO IV. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRIVAÇÃO HÍDRICA DE 24 E 48 HORAS EM CAMUNDONGOS SOB DELEÇÃO CONDICIONAL DE NRF2 NO NÚCLEO SUPRAÓPTICO

A privação hídrica induziu perda proporcional de peso em relação à duração da restrição hídrica ( $F_{2,63} = 8,71$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ , Tukey pós-teste, figura 19). Enquanto, a porcentagem de ganho de peso foi reduzida em cada período analisado durante os experimentos ( $F_{2,27} = 475,10$ ;  $p < 0,05$ ). Como demonstrado na figura 20, o grupo PH 24 perdeu  $9,3 \pm 0,2\%$  e o grupo PH 48 perdeu  $15,5 \pm 0,4\%$  de seu peso inicial



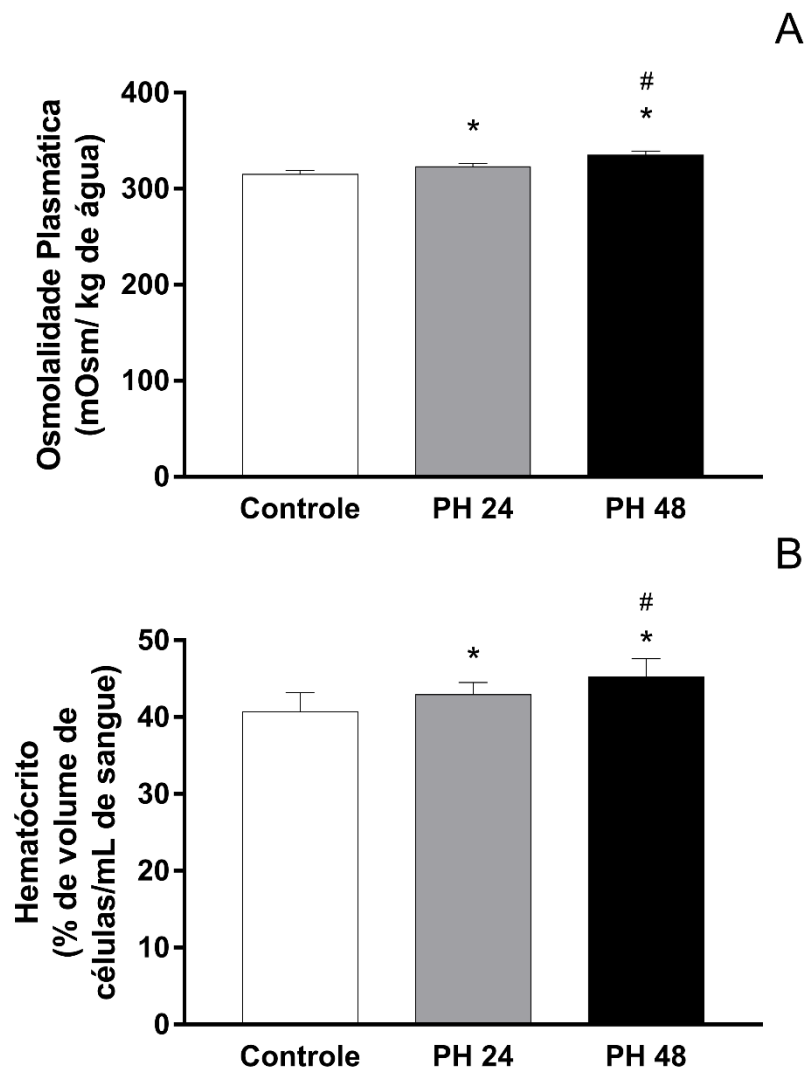
**Figura 19.** Peso corporal de camundongos C57BL/6J submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais controle. Os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.



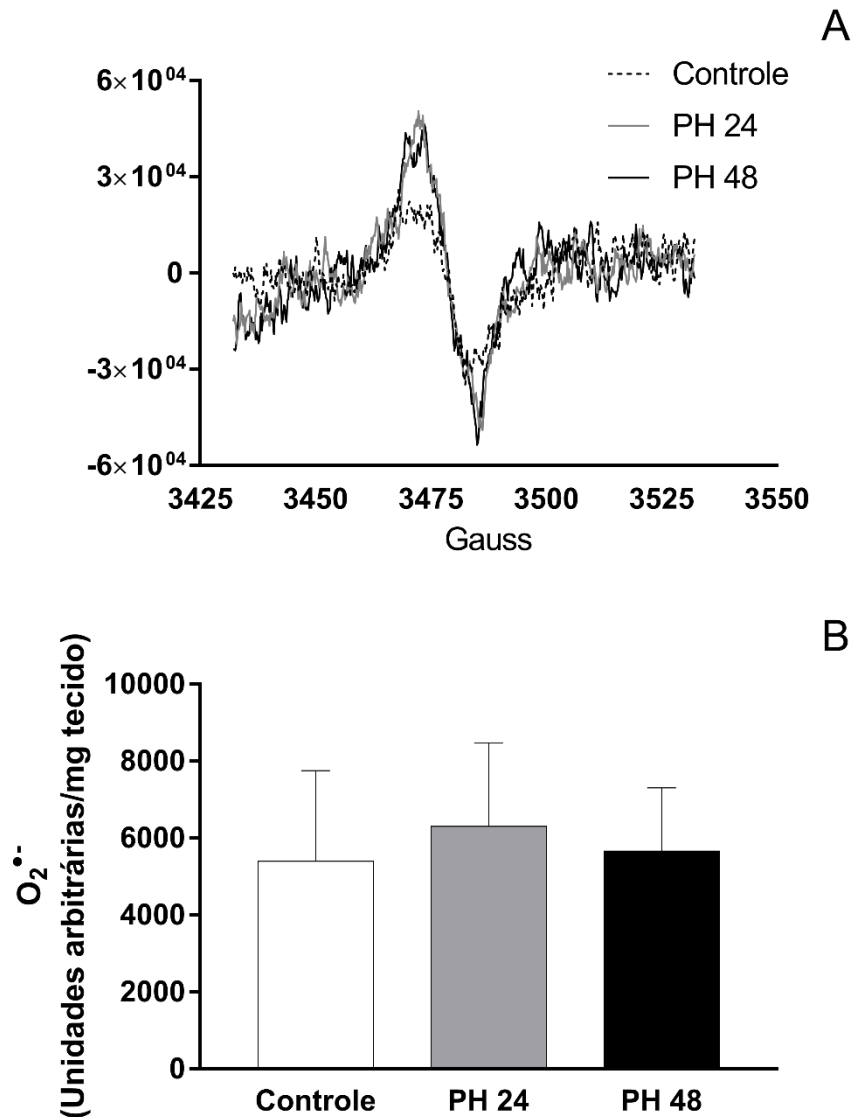
**Figura 20.** Ganho de peso corporal de camundongos C57BL/6J submetidos à privação hídrica de 24 (PH 24) ou 48 (PH 48) horas. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais controle; #  $p < 0,05$  quando comparado a animais submetidos a 24 horas de privação hídrica (PH 24). Os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

quanto ao hematócrito e osmolalidade plasmática, a restrição hídrica aumentou esses parâmetros de uma maneira hidratação-dependente, ou seja, o aumento observado no grupo PH 48 foi ainda superior ao obtido em camundongos do grupo PH 24 ( $p < 0,05$ , Tukey pós-teste) (Hematócrito:  $F_{2,31} = 12,15$ ;  $p < 0,05$ ; Osmolalidade:  $F_{2,30} = 71,74$ ;  $p < 0,05$ ; figura 21).

Em relação ao conteúdo de superóxido no SON, foi demonstrada a presença desse radical livre em todos os grupos analisados (Controle, PH 24 e PH 48) contudo, não fomos capazes de detectar diferenças entre os grupos experimentais (figura 22).



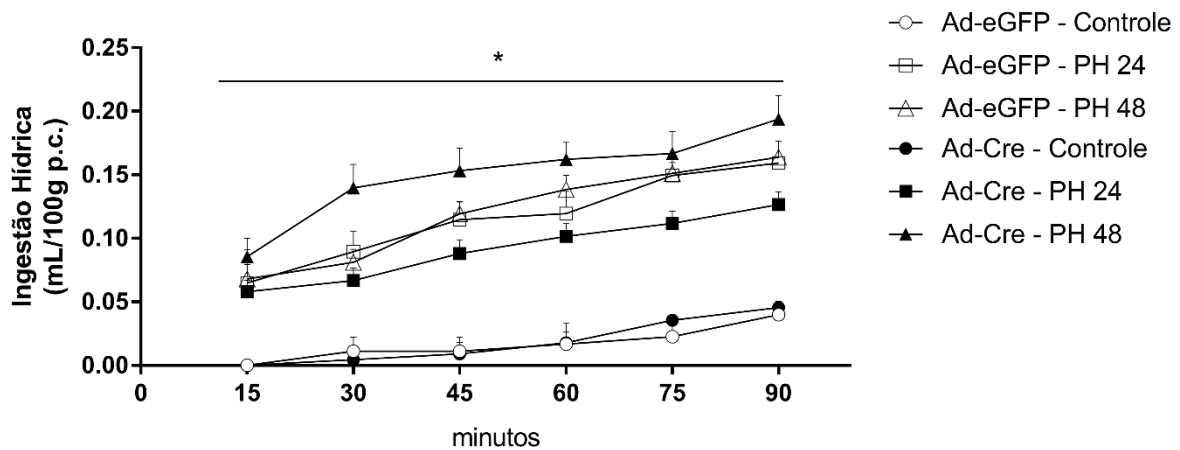
**Figura 21.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a osmolalidade plasmática (A) e o hematócrito de camundongos C57BL/6J. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos animais controle; #  $p < 0,05$  quando comparado a animais submetidos a 24 horas de privação hídrica (PH 24). Os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.



**Figura 22.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre o conteúdo de ânion superóxido no núcleo supraóptico de camundongos C57BL/6J. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. Estão demonstrados espectros representativos (A) e os dados totais (B). Os resultados foram analisados via análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls.

No grupo dos animais transgênicos, os camundongos com expressão ineficiente de Nrf2 apresentaram alterada ingestão de água induzida pela privação hídrica quando comparada aos animais que receberam a injeção do adenovírus controle (vetor carreando apenas eGFP) ( $F_{5,23} = 24,55$ ;  $p < 0,05$ , figura 23). Foi possível observar pelo teste de análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*Two-way Repeated Measures ANOVA*) que os animais deficientes de Nrf2 responderam de maneira anômala à privação hídrica, no entanto, não foi possível concluir qual foi essa diferença. Especulamos que nos animais PH 24, o silenciamento de Nrf2 reduziu a ingestão de água, enquanto nos animais PH 48, esse comportamento foi potencializado.





**Figura 23.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a ingestão de água de camundongos  $Nrf2^{lox/lox}$  injetados bilateralmente com vetor adenoviral indutor da co-expressão da enzima Cre e da proteína fluorescente eGFP (Ad-Cre) ou vetor adenoviral indutor da proteína fluorescente eGFP (Ad-eGFP). Ad-eGFP: símbolos brancos; Ad-Cre: símbolos pretos; Controle: círculos; PH 24: quadrados e PH 48: triângulos. Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  para o teste de análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*Two-way* RM ANOVA).

Os parâmetros sanguíneo e plasmático, hematócrito e osmolalidade, foram aumentados pela privação hídrica ( $F_{2,26} = 34,03$ ;  $p < 0,05$  e  $F_{2,35} = 43,86$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente; tabela 3), porém a ausência de  $Nrf2$  no SON não influenciou essas respostas.

Parâmetro Plasmático	Controle		PH 24		PH 48		Controle vs. Desidratação
	Ad-eGFP	Ad-Cre	Ad-eGFP	Ad-Cre	Ad-eGFP	Ad-Cre	
Osmolalidade (mOsm/kg $H_2O$ )	321 $\pm$ 3,14	317,6 $\pm$ 3,67	340,7 $\pm$ 2,33*	345,4 $\pm$ 3,88*	355,5 $\pm$ 3,86*	348,4 $\pm$ 2,56*	$F_{2,35} = 43,86$ ; $p < 0,05$
Hematócrito (%)	39,27 $\pm$ 0,78	38,51 $\pm$ 0,90	42,71 $\pm$ 0,57*	44,21 $\pm$ 0,51*	43,46 $\pm$ 0,72*	45,49 $\pm$ 0,44*	$F_{2,26} = 34,03$ ; $p < 0,05$

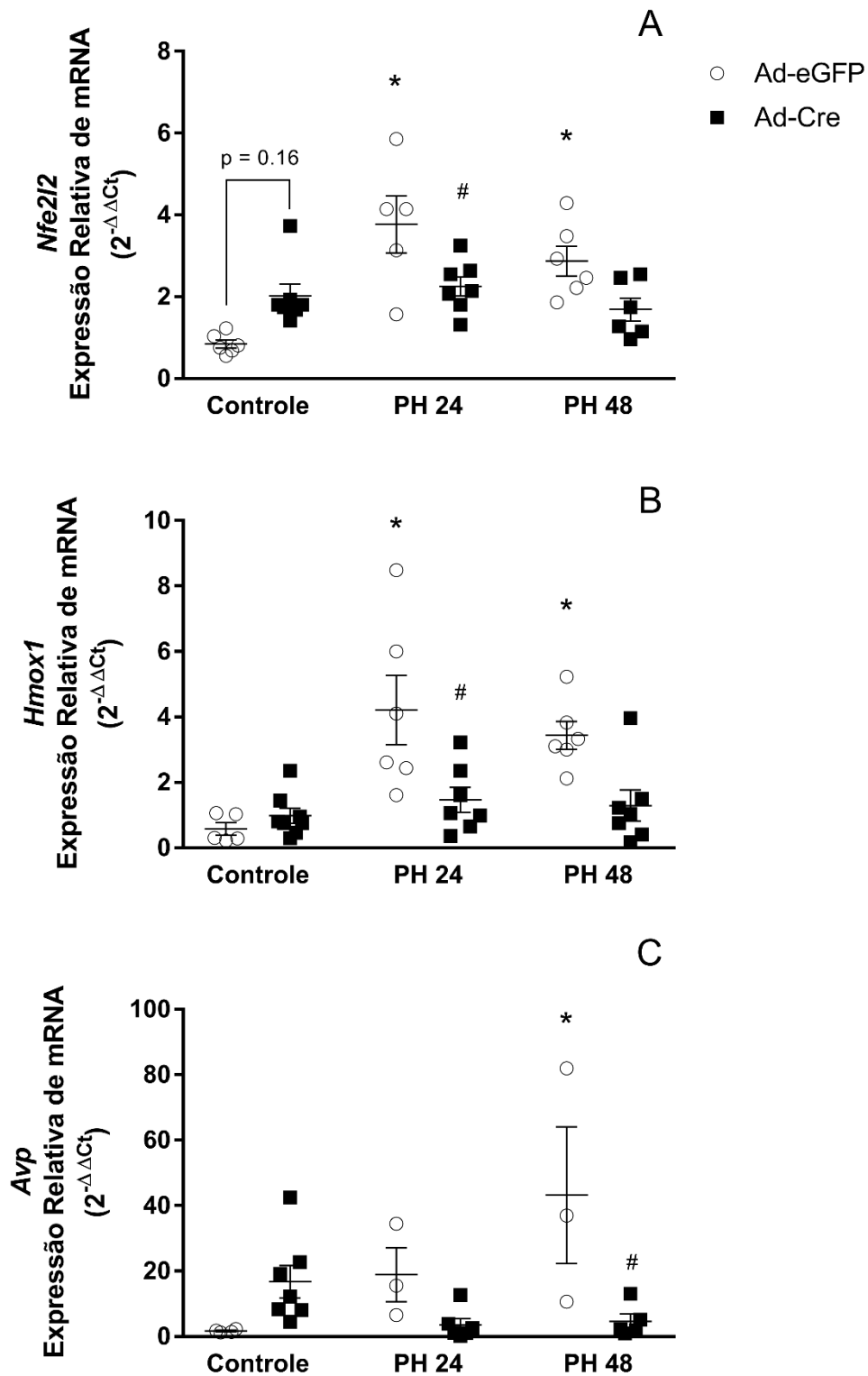
**Tabela 3.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a osmolalidade plasmática e hematócrito de camundongos  $Nrf2^{lox/lox}$  injetados bilateralmente com vetor adenoviral indutor da co-expressão da enzima Cre e da proteína fluorescente eGFP (Ad-Cre) ou vetor adenoviral indutor da proteína fluorescente eGFP (Ad-eGFP). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. Os resultados foram analisados pela análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

No que concerne os resultados obtidos através da avaliação da expressão gênica, o silenciamento de  $Nrf2$  no SON induziu a redução da expressão do mRNA de  $Nrf2$  (Estímulo\*Tratamento:  $F_{2,31} = 9,26$ ;  $p < 0,05$ ), HO-1 ( $F_{1,33} = 11,99$ ;  $p < 0,05$ ) e AVP ( $F_{1,22} = 5,46$ ;  $p < 0,05$ ) nesse núcleo, como apresentado na Figura 24. Essas reduções na expressão gênica foram específicas para  $Nfe2l2$  e  $Hmox1$  no grupo PH 24 ( $p < 0,05$ , Tukey pós-teste,

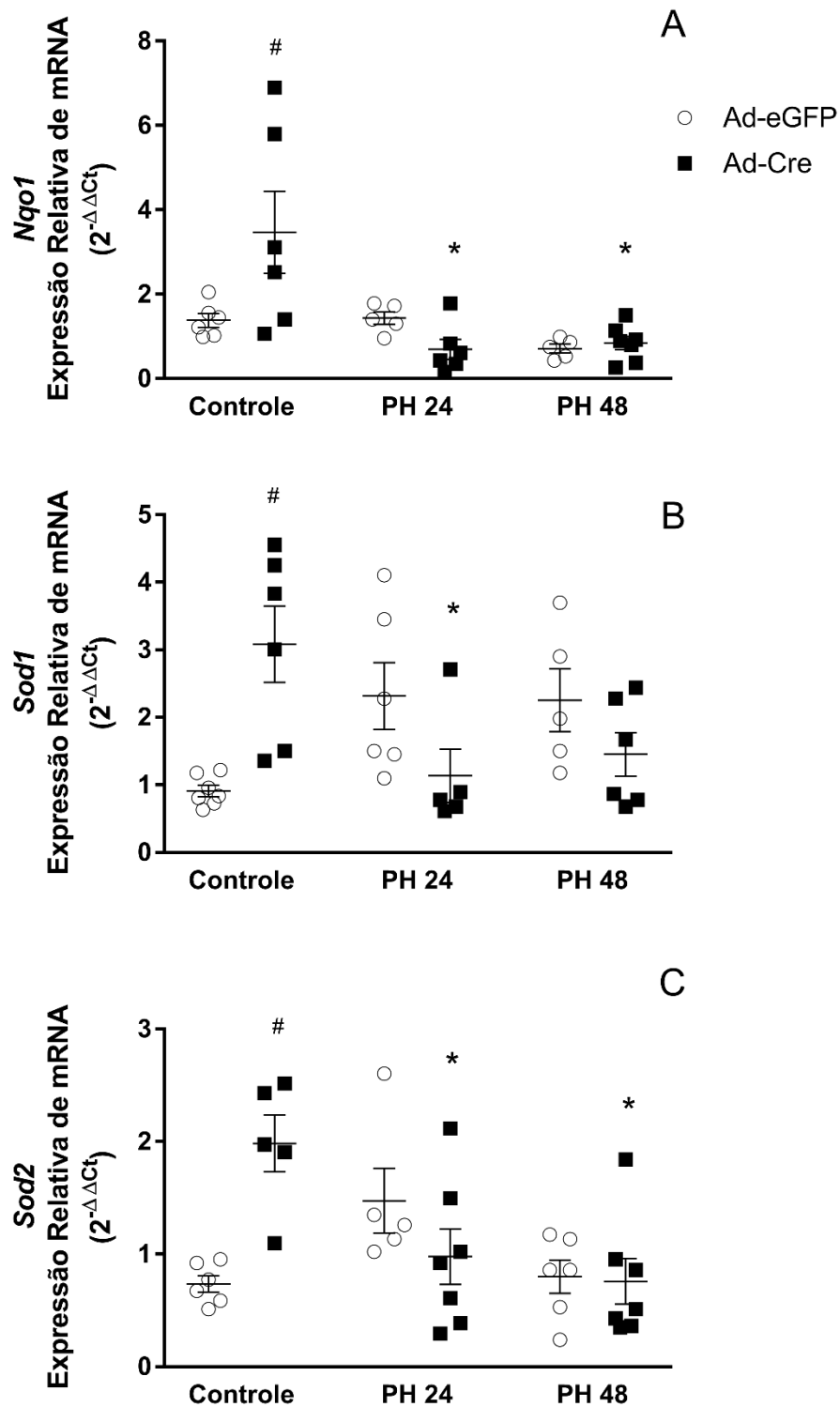
figura 24A e 24B respectivamente) e para *Avp* no grupo PH 48 ( $p < 0,05$ , Tukey pós-teste, figura 24C)

Outros genes relacionados à resposta antioxidante foram analisados, a restrição hídrica induziu a expressão de *Nqo1* ( $F_{2,29} = 8,14$ ;  $p < 0,05$ ), *Sod1* (Estímulo\*Tratamento:  $F_{2,29} = 10,71$ ;  $p < 0,05$ ), *Sod2* ( $F_{2,30} = 4,25$ ;  $p < 0,05$ ). A supressão da expressão de Nrf2 no SON reverteu os efeitos induzidos pela privação de água para *Nqo1* e *Sod2* ( $p$ 's  $< 0,05$ , Tukey pós-teste) em ambos períodos avaliados enquanto o mesmo efeito foi observado apenas em camundongos submetidos à privação hídrica por 24 horas para *Sod1* ( $p < 0,05$ , Tukey pós-teste), resultados exibidos como figura 25.

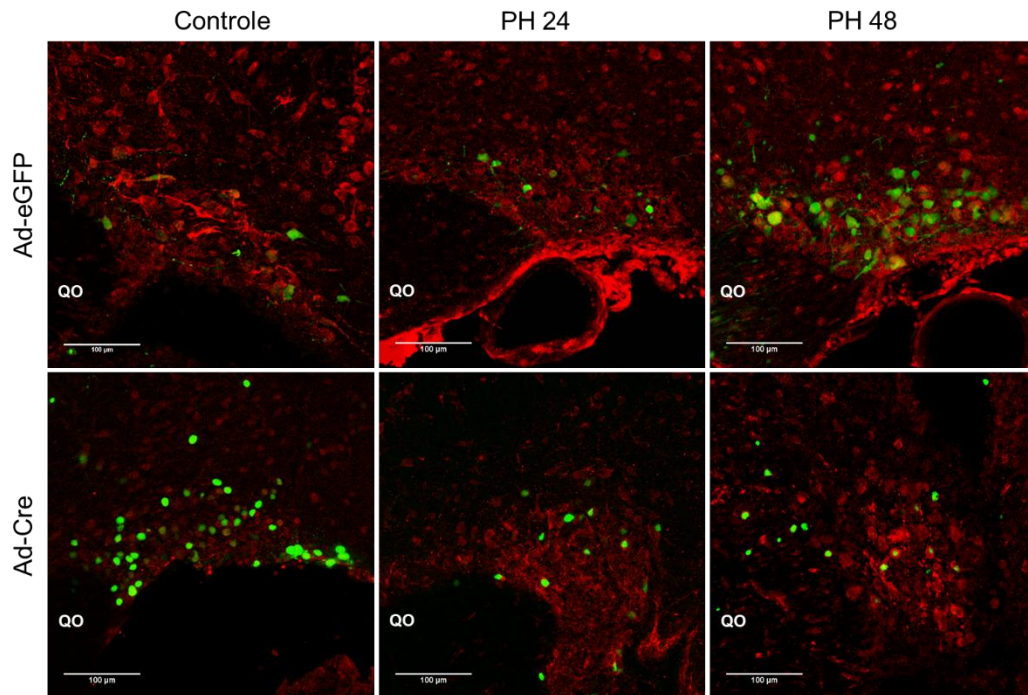
As imagens qualitativas demonstrando o padrão de expressão de Nrf2 e HO-1 no SON após a injeção bilateral de Ad-eGFP ou Ad-Cre sugerem que o silenciamento de Nrf2 reduziu a expressão de Nrf2 (figura 26), assim como a de HO-1 (figura 27). Além disso, as fotomicrografias sugerem aumento na expressão de ambos Nrf2 e HO-1 em camundongos submetidos a 48 horas de restrição hídrica.



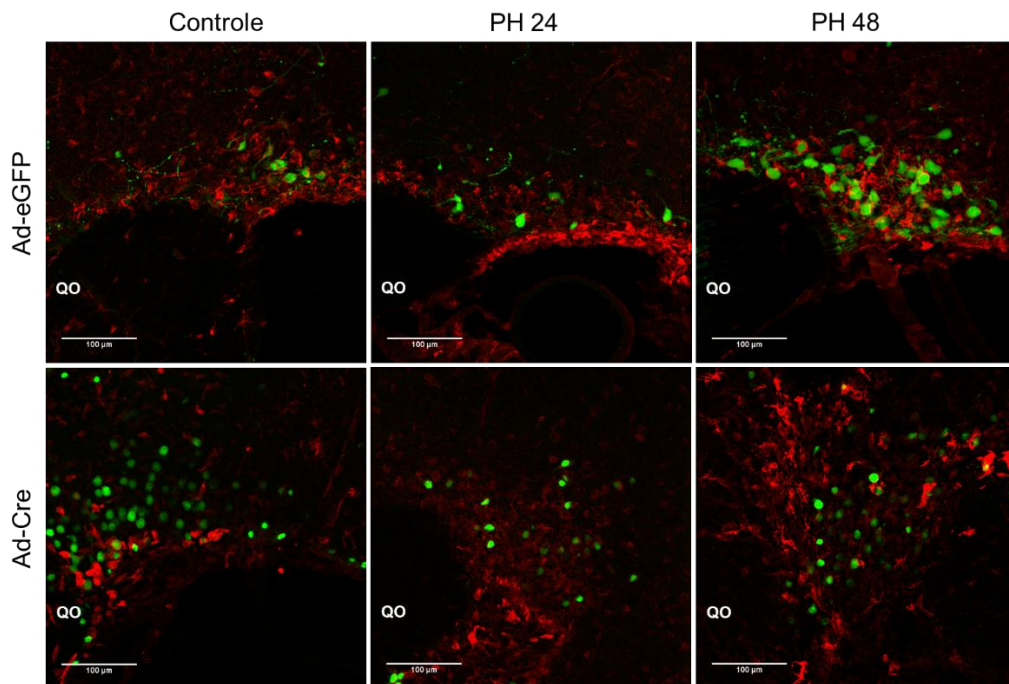
**Figura 24.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a expressão de mRNA de Nrf2 (gene *Nfe2l2*) (A), HO-1 (*Hmox1* gene) (B) e AVP (*Avp* gene) de camundongos *Nrf2*<sup>flox/flox</sup> injetados bilateralmente com vetor adenoviral indutor da co-expressão da enzima Cre e da proteína fluorescente eGFP (Ad-Cre) ou vetor adenoviral indutor da proteína fluorescente eGFP (Ad-eGFP). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Ad-eGFP sobre mesmo estímulo. Os resultados foram analisados pela análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey.



**Figura 25.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a expressão de mRNA de NAD(P)H desidrogenase NQO1 (gene *Nqo1*) (A), Cu/Zn-superóxido dismutase (*Sod1* gene) (B) e Mn-superóxido dismutase (*Sod2* gene) de camundongos *Nrf2*<sup>lox/lox</sup> injetados bilateralmente com vetor adenoviral indutor da co-expressão da enzima Cre e da proteína fluorescente eGFP (Ad-Cre) ou vetor adenoviral indutor da proteína fluorescente eGFP (Ad-eGFP). Valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Ad-eGFP sobre mesmo estímulo. Os resultados foram analisados pela análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) seguido do pós-teste de Tukey.



**Figura 26.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a expressão do fator de transcrição Nrf2 de camundongos  $Nrf2^{flox/flox}$  injetados bilateralmente com vetor adenoviral indutor da co-expressão da enzima Cre e da proteína fluorescente eGFP (Ad-Cre) ou vetor adenoviral indutor da proteína fluorescente eGFP (Ad-eGFP). Fotomicrografias representativas de seções coronais cerebrais contendo o núcleo supraóptico. Verde – eGFP (proteína verde fluorescente); Vermelho – Nrf2 (Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2). Magnificação de 20x. QO = quiasma óptico.



**Figura 27.** Efeitos da privação hídrica de 24 (PH 24) e 48 (PH 48) horas sobre a expressão de HO-1 de camundongos  $Nrf2^{flox/flox}$  injetados bilateralmente com vetor adenoviral indutor da co-expressão da enzima Cre e da proteína fluorescente eGFP (Ad-Cre) ou vetor adenoviral indutor da proteína fluorescente eGFP (Ad-eGFP). Fotomicrografias representativas de seções coronais cerebrais contendo o núcleo supraóptico. Verde – eGFP (proteína verde fluorescente); Vermelho – HO-1 (heme oxigenase 1). Magnificação de 20x. QO = quiasma óptico.

**DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Esse estudo demonstra pela primeira vez que a sensibilidade hipotalâmica ao monóxido de carbono é alterada dependendo do estado de hidratação do animal, sugerindo possíveis diferenças entre os protocolos de desidratação de 24 e 48 horas além de ação tempo-dependente do monóxido de carbono sobre as concentrações plasmáticas de AVP e OT. Relata-se pela primeira vez que os efeitos da inibição da atividade da HO e a doação de CO sobre a liberação hormonal de AVP e OT são opostos apenas em animais submetidos à privação hídrica de 48 horas, indicando a ação direta do CO sobre o eixo hipotálamo-neurohipófise nessa condição experimental, enquanto as alterações observadas em situação controle ou PH 24 de animais tratados com ZnDPBG podem ser resultados dos outros produtos da atividade da HO, bilirrubina e ferro.

Ainda, demonstramos que a inibição da formação de CO altera as propriedades passivas de membrana nos neurônios magnocelulares do SON em animais hidratados e a atividade de NOS tanto em animais controle quanto PH 48; enquanto a razão p-p38 MAPK/p38 MAPK foi afetada pela doação central de CO em ambas condições estudadas, tanto na hidratação, quanto na desidratação. No mais, demonstramos a presença de HO-1, p38 MAPK e p-p38 MAPK em astrócitos hipotalâmicos e sugerimos que a expressão dessas proteínas pode ser alterada pelo estímulo osmótico.

Em relação aos animais geneticamente modificados, nossos achados sugerem que a sinalização redox pode estar envolvida na resposta neuroendócrina do SON à privação hídrica. Apesar de não ter sido observado alteração no conteúdo de ânion superóxido no SON, a restrição hídrica aumentou a expressão dos genes avaliados, os quais estão envolvidos na resposta antioxidante. O silenciamento de Nrf2 no SON reduziu a expressão gênica de Nrf2 nesse núcleo de maneira generalizada e, especificamente, nos camundongos submetidos à privação hídrica de 24 horas. O *knockdown* de Nrf2 também alterou a ingestão hídrica em resposta à privação de água em ambos os intervalos de restrição avaliados, assim como influenciou a expressão de HO-1. O silenciamento ainda diminuiu o aumento induzido pela privação hídrica de 24 e 48 horas observado na expressão de *Nqo1* e *Sod2*, o que leva a crer que no período mais curto de restrição de água o sistema da HO pode modular a resposta neuroendócrina via sinalização redox.

O núcleo supraóptico hipotalâmico é uma área cerebral homogênea composta por neurônios magnocelulares que produzem os hormônios vasopressina e ocitocina, cujas

terminações nervosas desembocam na porção posterior da glândula hipofisária (Swanson & Sawchenko, 1983). Esse núcleo é acionado em diversas situações nas quais o organismo apresenta um desbalanço no equilíbrio hidrossalino, seja um distúrbio referente aos volumes intra- e extracelulares, seja à concentração eletrolítica dos mesmos (Oliet & Bourque, 1992; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). Quando, por exemplo, o animal é exposto à desidratação por 24 horas o aumento da osmolalidade plasmática é detectada por receptores periféricos (presentes na cavidade orofaríngea, no trato gastrointestinal, no mesentério esplênico, na veia porta hepática e no fígado) e centrais (presentes em órgãos circumventriculares tais como o órgão vascular da lâmina terminal – OVLT e órgão subfornicial – SFO) (Verbalis, 2007), ou ainda os próprios neurônios podem responder à hiperosmolalidade (Mason, 1980; Bourque, 2008).

No entanto, é sabido que o SON está sobre um controle tônico de sua atividade em situação basal, visto isso, os resultados eletrofisiológicos encontrados nesse estudo, demonstram que o CO parece estar envolvido nessa regulação, tendo em vista resultados obtidos em estudo prévio (Lima *et al.*, dados não publicados) no qual a injeção intracerebroventricular de ZnDPBG (inibidor da HO) em animais hidratados reduziu a concentração plasmática de OT, mas não de AVP. Hipotetizamos que os diferentes fenótipos responderiam diferentemente a manipulação do conteúdo de CO. Murphy e colaboradores em 2015 (Konopacka *et al.*, 2015) demonstraram que apenas o conteúdo de vasopressina foi alterado quando explantes hipotalâmicos foram submetidos a um meio hipertônico em presença de furosemida, enquanto na mesma condição experimental a ocitocina não foi afetada pelo tratamento com o diurético. Fénelon e colaboradores também observaram que o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos (uma proteína considerada marcadora de atividade neuronal) pode variar em relação ao fenótipo do neurônio magnocelular (Fénelon *et al.*, 1994). Os dados eletrofisiológicos apresentados nesse estudo sugerem que a manutenção da atividade da HO está envolvida no controle basal da atividade dos neurônios do SON uma vez que a inibição dessa enzima reduziu a resistência de entrada, excitabilidade e frequência dos neurônios desse núcleo, independente da presença de inibidores sinápticos, ou seja, os efeitos observados foram resultado da ação do ZnDPBG na própria célula. No entanto, a hipótese de que os diferentes fenótipos responderiam de maneira distinta à inibição da formação de CO foi descartada pois, os neurônios AVP e OT responderam de maneira similar ao tratamento, sugerindo ação direta e estimulatória desse gás mesmo em condições basais.

De fato, estudo prévio demonstrou que em animais submetidos a 48 horas de desidratação, a superfusão com 30  $\mu$ M de CrMP (crômio-mesoporfirina, inibidor inespecífico



da HO) reduziu a frequência e induziu a hiperpolarização dos neurônios magnocelulares do SON, enquanto nenhum efeito foi observado em animais controle (Reis *et al.*, 2012). Neste trabalho observamos esse efeito em animais hidratados o que poderia explicar a diminuída concentração de OT circulante em animais controle tratados com ZnDPBG. Ao superfundirmos os *slices* hipotalâmicos contendo o SON de animais controle com CORM-3 (molécula doadora de CO), nenhum efeito foi observado. Dessa maneira, sugerimos que, ao menos em situação controle, os efeitos da inibição da atividade da HO podem ser resultado da ação de um ou ambos demais produtos da atividade desse enzima, o ferro e a biliverdina, sobre os neurônios magnocelulares.

Nesse sentido, buscamos avaliar como o sistema HO/CO modularia as respostas hormonais quando o sistema neuroendócrino que controla o equilíbrio hidrossalino é recrutado, o modelo escolhido foi a privação hídrica. No presente trabalho avaliamos as respostas hormonais a dois períodos de restrição hídrica 24 e 48 horas.

Está bem estabelecido que na privação hídrica observa-se um quadro de sede absoluta, pois tanto o LIC, quanto o LEC estão diminuídos. Essa redução de volume circulante devido à ausência de fonte de fluidos leva à hiperosmolalidade do LEC e conseqüente aumento da pressão osmótica desse compartimento, o que resulta em retração do LIC. De forma geral, essa situação é refletida no aumento dos parâmetros hematócrito e proteína plasmática em conseqüência de: a) diminuição do volume extracelular, o que resulta no aumento da porcentagem de volume ocupado pelas células sanguíneas e b) aumento da concentração do LEC, o que resulta no aumento da osmolalidade plasmática (Hatton, 1971; Kutscher, 1971).

A retração do LIC em conseqüência da hiperosmolalidade do LEC resulta em alterações conformacionais em células corporais de maneira geral, porém ativa de maneira específica neurônios osmossensíveis localizados em regiões desprovidas de barreira hematoencefálica (Bourque, 2008), como a região AV3V (que compreende as estruturas SFO, OVLT e MnPO). Da região AV3V, principalmente do SFO e OVLT partem projeções diretas para o PVN, SON (ou indiretas via MnPO e desse núcleo para o PVN e SON) e desses, então, projeções direcionam-se para o tronco cerebral e por fim alcançam o tálamo, amígdala e regiões corticais, desencadeando, de forma conjunta, respostas efectoras como a busca por fluidos, a prevenção da perda de água e a excreção de Na<sup>+</sup> (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2007).

Entre as respostas neuroendócrinas desencadeadas pela desidratação está a secreção de AVP e OT. Já foi demonstrado que a OT, que apresenta importante ação como hormônio natriurético em roedores, tem sua secreção aumentada em animais privados (Huang, Lee,

Sjöquist, 1995), tendo como ação final de sua secreção a natriurese, a caliurese e a inibição da ingestão de sódio (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2005). Apesar da perda de volume, que tenderia a inibir a secreção de OT, a osmolalidade (que se encontra aumentada) se torna, neste contexto, o fator preponderante a ser corrigido, o presente estudo está em acordo com os dados publicados na literatura, uma vez que tanto em PH 24, quanto a PH 48 a concentração plasmática de OT encontra-se elevada.

Além da hiperosmolalidade, estímulo principal que culmina na secreção de AVP, a hipovolemia verificada nos animais privados também induz aumento adicional significativo na secreção de AVP (Share, 1988). Neste contexto, a liberação de AVP auxilia os rins a pouparem o máximo de água possível, prevenindo, assim, perda adicional de volume, bem como favorecendo a correção da concentração dos eletrólitos, ou seja, a concentração plasmática de AVP está aumentada em animais desidratados e os resultados obtidos nesse trabalho são corroborados pela literatura.

Diversas são as evidências da participação do monóxido de carbono (CO) sobre a secreção de AVP e OT. Gomes e colaboradores (2010) demonstraram que fatias hipotalâmicas submetidas à hiperosmolalidade liberavam maior quantidade de OT no meio de incubação, efeito revertido quando essas fatias eram pré-incubadas com zinco protoporfirina IX – ZnPP IX (um inibidor da heme-oxigenase). Além disso, Reis e colaboradores (2012) observaram que em ratos submetidos a PH 48 há aumento da expressão de HO-1, bem como aumento da co-localização de OT e AVP com essa enzima, tanto no SON, quanto no PVN. Estes autores também demonstraram, utilizando a técnica de *whole cell patch clamp*, que neurônios obtidos de animais desidratados por 48 horas apresentavam taxa de disparo diminuída quando expostos a um inibidor da heme-oxigenase, o CrMP. Alguns autores demonstraram que a adição de hemina (a níveis que levariam à produção máxima de CO pelo tecido), há reversão do aumento da concentração de AVP e OT no meio de incubação evocado por KCl (Kostoglou-Athanassiou *et al.*, 1996; Mancuso *et al.*, 1997). Este último grupo mostrou ainda que a adição de ZnPP IX ao meio de incubação de explantes hipotalâmicos não só revertia a queda na concentração de AVP estimulada por lipopolissacarídeo (LPS), como potencializava a liberação deste hormônio (Kostoglou-Athanassiou *et al.*, 1998). Experimentos *in vivo*, assim como os realizados por Kostoglou-athanassiou e cols. em 1998, realizados por Giusti-Paiva e colaboradores (2005) demonstraram que a administração icv de ZnDPBG (na mesma dose utilizada neste estudo) potencializava o aumento das concentrações de OT e AVP induzido pela administração periférica de LPS. Em conjunto, apesar de não apresentarem um consenso, esses dados

corroboram os achados desse estudo no sentido de que o CO apresenta efeito modulatório sobre a secreção desses hormônios em diferentes períodos de desidratação.

Como esperado, a concentração plasmática de ANP está reduzida nos grupos desidratados, para que o organismo possa lidar com a hipovolemia induzida pela desidratação (Zongazo *et al.*, 1992). O tratamento seja com o doador de CO ou com o inibidor da heme oxigenase não afetou esse parâmetro o que pode ser explicado pelo fato do ANP analisado ser um hormônio periférico regulado principalmente pela alteração de volume na câmara cardíaca e que, possivelmente, não sofre alterações em resposta à administração central de uma droga com ação local.

Quanto à secreção de CORT é indiscutível o fato desse hormônio ser o clássico indicador da ativação do eixo HPA (De Kloet *et al.*, 1990). Nesse sentido, os resultados mostraram que a privação hídrica atuou como agente estressor. De fato, a ativação do eixo HPA já foi demonstrada em resposta a alterações da homeostase hidrossalina. Kiss e Aguilera (Kiss & Aguilera, 1993) mostraram que 30 minutos após a injeção intraperitoneal (ip) de salina 1,5 % há aumento de aproximadamente vinte e seis vezes na concentração plasmática de corticosterona, bem como aumento da osmolalidade, AVP e hormônio adenocorticotrófico (ACTH) circulantes. Esses dados corroboram nossos achados, uma vez que a hipertonicidade induzida pela PH 24 resultou em aumento da concentração plasmática de corticosterona.

Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido que o CO exerça efeito predominantemente inibitório sobre os neurônios produtores de CRH. Pozzoli e colaboradores (1994) observaram que a adição de hemina (substrato da HO) ao meio de incubação de explantes de hipotálamo médio basal inibiu a liberação de CRH evocada por solução de KCl ou interleucina-1 $\beta$ . Contudo, em estudos desenvolvidos por Kostoglou-Athanassiou e colaboradores (1998), não foi observado efeito do ZnPP IX sobre a liberação de CRH induzida por endotoxina em explantes de hipotálamo. No entanto, de acordo com os dados obtidos pelo presente estudo, podemos propor que a administração de ZnDPBG parece exercer um efeito de ativação sobre o eixo HPA, mesmo em situação não estimulada, devido a supressão da inibição que parece ser exercida pelo CO sobre esse eixo. Além disso, em situação estimulada (PH 24), observa-se aumento da concentração periférica de ANG II em resposta ao tratamento com ZnDPBG (Lima *et al.*, dados ainda não publicados). Sabe-se que a ANG II, ao atingir os órgãos circunventriculares, pode ativar neurônios nessas áreas através da ligação ao seu receptor, estimulando vias angiotensinérgicas que culminam na secreção de CRH e conseqüente ativação do eixo HPA (Ganong, 2000). No entanto, na privação hídrica

de 48 horas o ZnDPBG parece ter efeito contrário ao observado na PH 24 em relação à concentração plasmática de CORT.

Então, para poder explicar esses resultados foram investigados os possíveis alvos, vias que poderiam ser alterados pela manipulação do conteúdo de CO nos neurônios magnocelulares, ou seja, por qual(is) mecanismo(s) o CO exerce seu efeito sobre a liberação hormonal. Nós avaliamos algumas possibilidades baseando-nos na literatura: interação CO/HO and NO/NOS, p38 MAPK e sinalização redox e tentamos usar diferentes estratégias para avaliar se essas vias seriam afetadas por diferentes tempos de desidratação e pela inibição da HO ou doação do CO.

Em relação ao sistema do NO, supõe-se que o óxido nítrico atua de maneira inibitória na liberação de hormônios neuro-hipofisários pela ativação da sGC ou pela S-nitrosilação de proteínas (Summy-Long *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2014). Em 1992 (White & Marletta, 1992) foi identificada inibição da atividade da NOS quando células HEK foram expostas a uma mistura de ar com alta concentração de CO (80% CO<sub>2</sub> / 20% O<sub>2</sub>). Alguns trabalhos realizados pelo nosso grupo sugerem que, pelo menos *in vitro*, o CO pode interagir com o sistema NO, inibindo sua atividade enzimática resultando na potencialização da secreção de OT e ANP pelo hipotálamo médio basal induzida pela hiperosmolaridade (Gomes *et al.*, 2004; Gomes, D. A. *et al.*, 2010). Reis e colaboradores (2012; 2015) mostraram que a expressão da HO-1 e da isoforma neuronal da NOS no SON e PVN está aumentada em neurônios magnocelulares tanto que expressam vasopressina, quanto ocitocina de ratos privados de água por 48 horas; além disso, observou-se que a frequência do potencial de ação é reduzida em ratos submetidos ao mesmo estímulo e, que este efeito foi potencializado pela inibição da heme oxigenase mas que o pré-tratamento com um inibidor da nNOS atenuou essa resposta.

No entanto, alguns resultados ainda não publicados (Lima *et al.*, dados não publicados) mostraram que a formação de CO central é necessária para respostas comportamentais, hormonais e neuronais adequadas em um tempo menor de desidratação (24 horas), mas nenhuma mudança foi observada na expressão gênica de HO-1 (dados replicados nesse estudo), enquanto a inibição da formação de CO não alterou a atividade de NOS e o teor de nitrato de HMB no grupo de PH 24, além de ter sido demonstrado um aumento na expressão de mRNA da nNOS do SON de ratos submetidos a 24 horas de restrição hídrica, enquanto o aumento de HO-1 foi observado apenas no grupo PH 48 e nenhuma elevação adicional foi observada na nNOS. Juntos, esses resultados sugerem que o CO poderia agir independentemente do sistema do NO durante as primeiras 24 horas de privação de água. Porém, não descartamos a possibilidade de que essa interação ocorra em um período maior de

desidratação (PH 48), o que já foi especulado na literatura (Kostoglou-Athanassiou *et al.*, 1998) proporcionando um possível perfil dependente de tempo para as interações CO-NO, aqui evidenciadas pelo aumento em suas atividades enzimáticas e pelo fato da inibição de HO diminuir a atividade de NOS induzida pela desidratação de 48 horas. Além disso, a inibição da atividade enzimática da HO diminuiu a expressão de nNOS, e o efeito contrário foi observado nos animais tratados com o doador de CO, apenas no grupo PH 48, indicando que os sistemas podem interagir nessa condição experimental. Essa redução na atividade da NOS, ao contrário do que está na literatura, pode ser devida ao delineamento experimental, uma vez que nossos dados são os primeiros a analisar esse parâmetro *in vivo*, ao invés de dados *ex vivo* ou *in vitro* em trabalhos anteriores.

Outro alvo potencial avaliado neste estudo foi a proteína p38 MAPK. A hipótese de que o choque osmótico poderia induzir aumento de p38 MAPK (Han *et al.*, 1994; Uhlik *et al.*, 2003) não está de acordo com nossos achados considerando que observamos o efeito oposto em nosso estudo. O que é possível pois quando a p38 MAPK é fosforilada migra para o núcleo onde atua como um fator de transcrição (Chi *et al.*, 2015). Como mencionado na seção de material e métodos, usamos o tampão Tris-HCl para lisar as amostras, esse tampão é próprio para proteínas citoplasmáticas (Abcam, 2018), corroborando nossos achados que diminuíram seu conteúdo no citoplasma.

A literatura já confirmou a relação entre CO e p38 MAPK em diversas condições experimentais envolvendo células pulmonares, hepáticas e endoteliais, e em todas essas situações o CO parece induzir a fosforilação da p38 MAPK proporcionando um efeito protetor em relação aos estímulos nocivos empregados nestes trabalhos (Amersi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Kohmoto *et al.*, 2007). Nossos achados estão de acordo com essas observações prévias, uma vez que demonstramos que, independentemente do estado de hidratação animal, o tratamento com CORM-3 favoreceu a razão de proteína fosforilada à não fosforilada, sendo esse efeito proeminente no grupo PH 48, sugerindo que, no período mais longo de restrição de água, o SON é mais sensível ao CO.

Além disso, tem sido discutida a participação de outras células neurais na regulação da atividade do sistema nervoso central, como os astrócitos. Essas células não são mais consideradas apenas células de suporte, elas realmente têm um papel crucial na regulação das sinapses e na atividade neuronal, e estão sendo nomeadas como o terceiro elemento sináptico (Araque *et al.*, 1999; Theodosis *et al.*, 2008). Trabalhos anteriores já demonstraram que a HO-2 é constitutivamente expressa em astrócitos (Scapagnini *et al.*, 2002) e também que a HO-1 pode ser induzida por diferentes estímulos nessas células (Dwyer *et al.*, 1995; Imuta *et al.*,

2007). Além disso, o CO produzido nos astrócitos poderia atuar sobre os neurônios a fim de prevenir a morte neuronal (Queiroga *et al.*, 2016); de fato, o CO produzido pelos astrócitos poderia atuar nos próprios astrócitos induzindo a fosforilação da p38 MAPK (Chi *et al.*, 2015) e, em última instância, alterar a expressão gênica nessas células. Assim, hipotetizamos que o estímulo hiperosmótico poderia induzir HO-1 em astrócitos e o CO produzido então poderia afetar a expressão de p38 MAPK, bem como induzir sua fosforilação nessas células. Observamos a presença de HO-1, MAPK p38 e MAPK p-p38 em astrócitos em condições basais e hiperosmóticas, também as células pareciam menores sob estímulo e a distribuição p38 MAPK e p-p38 MAPK pareceu mudar, mas nenhum dado conclusivo foi obtido desde que nós obtivemos somente resultados qualitativos.

Na tentativa de entender os resultados obtidos, nos deparamos com um fator comum entre todas as possíveis vias de ação do CO que avaliamos: a geração de espécies reativas de oxigênio. Nesse sentido, apesar de não observarmos alteração na formação de isocitrato, cuja queda indicaria um aumento da geração de ROS, a formação de peróxido de hidrogênio demonstrou-se aumentada em animais desidratados. Ainda, os componentes do sistema da glutathiona, tido como o mais importante sistema antioxidante do sistema nervoso central (Meister, 1994), teve sua expressão aumentada no SON de animais desidratados tanto por 24, quanto por 48 horas. Tanto a glutathiona sintetase, como as subunidades catalítica e modificadora da glutamato-cisteína ligase, bem como, a expressão do fator de transcrição que regula a resposta antioxidante, o Nrf2, estão com suas expressões gênicas aumentadas no SON dos animais PH 24 e, aparte o Nrf2, esse incremento no mRNA é mantido nos grupos PH 48. No mais, o tratamento com ZnDPBG ou CORM-3 resultam na perda da relação direta da expressão gênica de Nrf2 em função da expressão gênica da HO-1 no SON, ou seja, a manipulação do conteúdo de CO altera a relação CO e resposta antioxidante, o que não acontece quando se analisa a expressão gênica da nNOS, que se mantém a mesma frente às alterações do conteúdo central de CO, sendo esse mais um indício no sentido de que o CO poderia exercer sua função biológica via modulação da sinalização redox e não interagindo somente com o sistema do NO.

Comportamentos ingestivos, como a ingestão de água, são acionados e controlados por múltiplas áreas cerebrais. A ingestão de líquidos induzida pela desidratação começa pela ativação do órgão subfornicial (SFO) através da ANG II periférica, levando a um aumento no comportamento motivado da ingestão de água (Simpson & Routtenberg, 1973). Além disso, este desafio osmótico ativa a região AV3V que também estimula áreas cerebrais envolvidas com a função comportamental como tálamo, ínsula, córtex cingulado anterior e substância

cinza periaquedutal, bem como núcleos hipotalâmicos como SON, um componente neuroendócrino deste circuito (Bourque, 2008). O próprio SON é capaz de detectar flutuações na osmolalidade extra e intracelular, uma vez que os neurônios magnocelulares que compõem essa área do cérebro são descritos como osmosensitivos (Sharif Naeini *et al.*, 2006).

A ativação de AT1R pela ANG II, *per se*, aumenta a formação de superóxido no SFO (Zimmerman *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que a privação de água aumenta alguns componentes do sistema renina-angiotensina em áreas do cérebro como o hipotálamo (Barth & Gerstberger, 1999; Bourassa & Speth, 2010), que pode levar a um aumento do ambiente oxidativo em neurônios magnocelulares.

A estimulação do SON como consequência de 1) ativação da área AV3V induzida por hiperosmolalidade ou 2) diretamente osmosensação ou 3) um aumento no RAS local leva ao recrutamento de HO-2 através de uma via de sinalização PKC (aumentando o influxo de  $Ca^{2+}$ ) (Doré *et al.*, 1999) poderia levar à produção de CO como consequência do aumento da atividade de HO-2. Conforme discutido anteriormente, há um aumento na atividade de HO dentro do HBM de ratos desidratados, seguido por um aumento no mRNA de HO-1 em animais submetidos a um período mais longo de restrição de água (48 horas). A atividade de HO leva à formação de quantidades iguais de biliverdina, ferro e CO (Tenhunen *et al.*, 1968) e todos os três subprodutos da degradação do grupamento heme estão envolvidos no ambiente redox dentro das células (Bauer & Bauer, 2002). Uma consequência final do aumento da atividade HO é o aumento da produção de CO. O CO, por sua vez, induz a geração de ROS mitocondriais em níveis que ativam uma resposta de sinalização adaptativa (Zuckerbraun *et al.*, 2007), que acreditamos que aumentou a expressão de Nrf2 que observamos em ratos e camundongos desprovidos de água por 24 horas. Então, como consequência da ativação/expressão aumentada de Nrf2, foi observado um aumento na expressão de mRNA de HO-1 em ratos PH 48 e de camundongos desidratados.

Nrf2 é um indutor potente da expressão gênica de HO-1 (Alam *et al.*, 1999) e nossos resultados mostraram que camundongos sem Nrf2 no SON tiveram uma diminuição na expressão de mRNA de HO-1. Além disso, através de imunofluorescência qualitativa, observamos uma diminuição na proteína HO-1 no SON.

O CO diminui a taxa de respiração celular (D'amico *et al.*, 2006) provavelmente pela sua inibição da citocromo *c* oxidase (Complexo IV) da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias (Alonso *et al.*, 2003), retardando a transferência de elétrons levando à sua acumulação no complexo III e, depois, à formação de superóxido. Este aumento na formação de superóxido pode induzir a ativação de Nrf2 e também sua expressão. Embora não

tenhamos visto um aumento nos níveis de superóxido, observamos um aumento na expressão de Nrf2 em camundongos desidratados. Outra indicação de que a via de sinalização Nrf2 está envolvida na resposta SON à restrição hídrica é que a expressão de NAD (P) H quinona oxidoreductase 1, gene *Nqo1*, um gene cuja expressão é regulada pelo fator de transcrição Nrf2 (Nioi *et al.*, 2003), é reduzida pelo silenciamento condicional Nrf2 no SON.

Também foi sugerido que um aumento na osmolalidade plasmática induz a formação de SON ROS de maneira aguda (St-Louis *et al.*, 2012). Como tal, é tentador especular que não conseguimos observar uma mudança nos níveis de superóxido nos micropunches de SON devido ao tempo de estímulo que usamos, que foi de 24 ou 48 horas de restrição de água. Durante esses períodos, o maquinário responsável por lidar com um aumento na formação de ROS pode ter sido recrutado levando à normalização dos níveis de ROS. De fato, os dados obtidos mostraram um aumento na expressão do sistema de glutathione, um sistema antioxidante primário, dentro do SON de ratos submetidos a 24 e 48 horas de restrição hídrica. Além disso, as superóxido-dismutases são enzimas que convertem o superóxido em peróxido de hidrogênio e são consideradas a primeira etapa de defesa em caso de produção de superóxido exacerbada (Lindenau *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram que a capacidade de SON em lidar com o superóxido é comprometida em camundongos *knockdown* para Nrf2, uma vez que a expressão de mRNA das isoformas de superóxido dismutase mitocondrial (SOD2) e citoplasmática (SOD1) foi reduzida nesses animais durante a desidratação concomitante com aumento observado na produção de peróxido de hidrogênio de ratos desidratados. Isto sugere que na ausência de Nrf2 há uma redução da resposta antioxidante, particularmente ao superóxido que, em última instância, compromete a resposta neuroendócrina à privação de água.

Os efeitos da desidratação no hematócrito e na osmolalidade plasmática são bem descritos (Hatton, 1971; Kutscher, 1971), bem como suas alterações no peso corporal (Armstrong *et al.*, 1980). Esperávamos que o silenciamento condicional de Nrf2 no SON afetasse esses parâmetros como consequência de uma perturbação da concentração plasmática de AVP e OT. No entanto, esses fatores não foram afetados pela ausência de Nrf2 no SON. Os dados dos hormônios plasmáticos ajudarão a entender melhor esses resultados. Embora não tenhamos observado alterações desses parâmetros sanguíneos, o consumo de água, um efeito bem estabelecido da desidratação (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004), foi prejudicado em camundongos com Nrf2 inativado no SON, tanto submetidos à PH 24, quanto à PH 48.

Juntos, esses resultados sugerem diferenças entre os protocolos de privação de água de um e dois dias, já que os alvos analisados, foram alterados de maneiras antagônicas pelos



tratamentos com ZnDBPG ou CORM-3 nos grupos PH 48, sugerindo a ação direta desse gás nesse grupo experimental. Contudo, tanto os animais controle, quanto os submetidos à PH 24, apresentaram efeito da inibição da HO sobre a concentração plasmática de OT e/ou AVP, sendo assim, o sistema da HO pode agir de maneiras distintas nesses protocolos para alcançar a mesma resposta final, considerada a modulação da secreção hormonal.

Em conjunto, os resultados, tendo em vista as robustas evidências obtidas, comprovam o papel do CO na regulação fina do balanço hidroeletrólítica. Os meios pelos quais essa molécula exerce esse efeito dependem do estado de hidratação do animal e parecem envolver a sinalização redox e diferentes populações neurais.

**CONCLUSÃO**

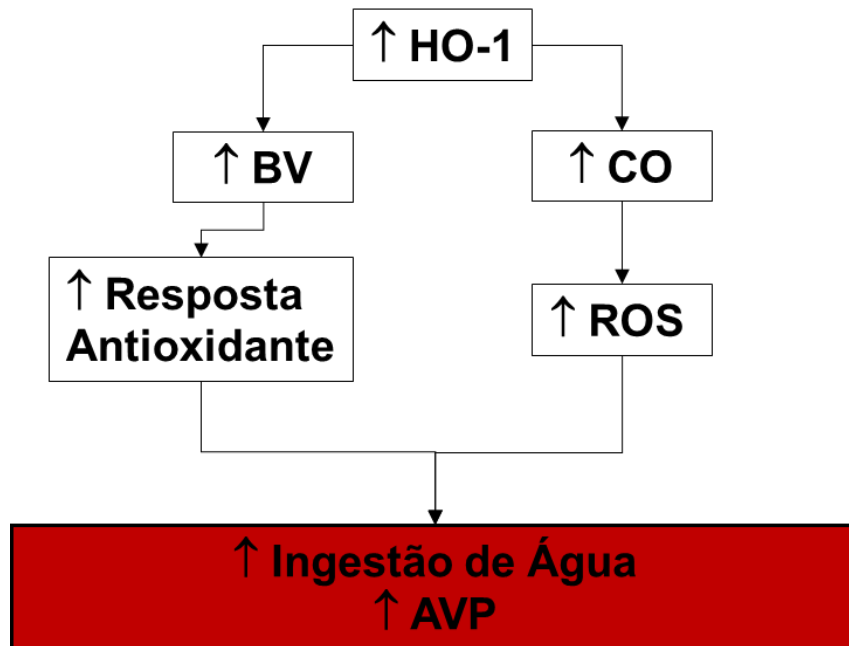
## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que:

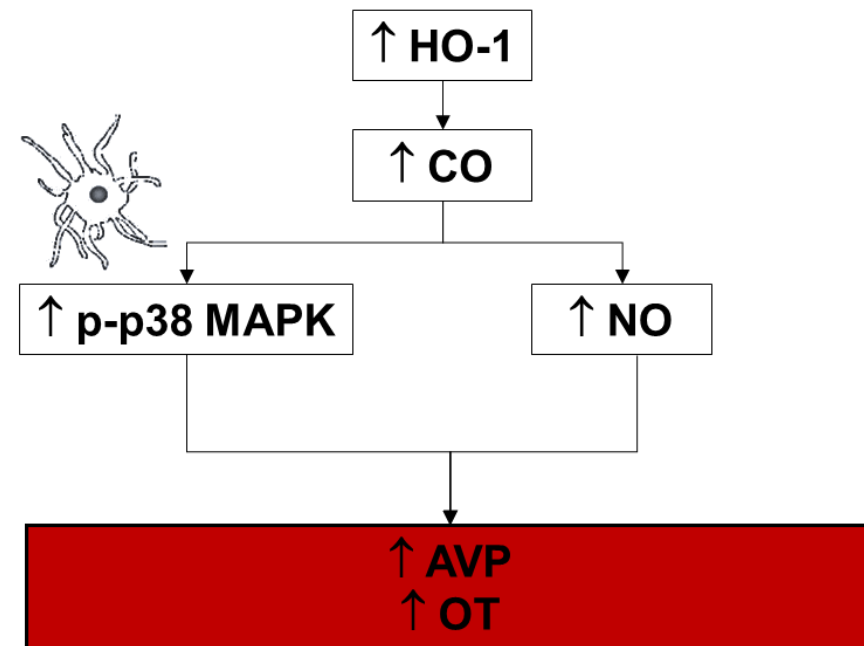
- tanto a privação hídrica de 24 horas, quanto a de 48 horas foram eficientes como estímulo desafiante do equilíbrio hidroeletrólítico;
- a inibição da formação de CO torna os neurônios magnocelulares menos excitáveis em animais hidratados;
- a inibição da produção de CO central foi capaz de inibir o aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT induzidas por diferentes durações de restrição hídrica;
- a doação central de CO foi capaz de potencializar o aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT induzidas pela privação hídrica de 48 horas;
- a manipulação do conteúdo de CO central apresentou efeitos distintos sobre as alterações nas concentrações plasmáticas de ANGII e CORT induzidas por diferentes estados de iritação dos animais;
- os sistemas enzimáticos de produção de CO e NO são sensíveis ao conteúdo central de CO;
- o funcionamento do sistema CO/HO é essencial para a integridade das respostas neuroendócrinas induzidas pela privações hídricas de 24 e 48 horas;
- a expressão gênica tanto das enzimas relacionadas ao sistema HO-CO e NO-NOS, quanto daquelas recrutadas na resposta antioxidante é afetada pela inibição da formação de CO;
- a via de sinalização da p38 MAPK pode ser recrutada na resposta do SON à desidratação;
- camundongos com a resposta antioxidante inibida no SON não respondem apropriadamente à desidratação, seja ela de 24 ou de 48 horas.

O mapeamento dos possíveis alvos do CO no neurônios magnocelulares do SON traz informações importantes à área de estudo, uma vez que a ativação do sistema que produz esse gás parece ser diferente entre os animais submetidos à privação hídrica de 24 horas e aqueles submetidos à privação hídrica de 48 horas. Não somente a sensibilidade hipotalâmica e do núcleo supraóptico ao CO é alterada nesses dois diferentes estímulos, como provavelmente também é alterada a via pela qual o CO modula a liberação de AVP e OT durante esses dois períodos de desidratação, podendo haver a participação da sinalização redox, do sistema do NO, da via de sinalização da p38 MAPK e recrutamento de células da glia.

### Desidratação 24h



### Desidratação 48h



**Diagrama 6.** Esquema das possíveis vias de ação do sistema da HO nos diferentes períodos de desidratação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCAM. Protocols - Sample preparation for Western blotting. p. <http://www.abcam.com>, 2018. Acesso em: 26 Setembro 2018.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALAM, J.; STEWART, D.; TOUCHARD, C.; BOINAPALLY, S.; CHOI, A. M.; COOK, J. L. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26071-8, Sep 10 1999.

ALLEN, A. M.; MOELLER, I.; JENKINS, T. A.; ZHUO, J.; ALDRED, G. P.; CHAI, S. Y.; MENDELSON, F. A. Angiotensin receptors in the nervous system. **Brain Res Bull**, v. 47, n. 1, p. 17-28, Sep 1 1998.

ALONSO, J. R.; CARDELLACH, F.; LOPEZ, S.; CASADEMONT, J.; MIRO, O. Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome c oxidase of human mitochondrial respiratory chain. **Pharmacol Toxicol**, v. 93, n. 3, p. 142-6, Sep 2003.

AMERSI, F.; SHEN, X. D.; ANSELMO, D.; MELINEK, J.; IYER, S.; SOUTHARD, D. J.; KATORI, M.; VOLK, H. D.; BUSUTTI, R. W.; BUELOW, R.; KUPIEC-WEGLINSKI, J. W. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 815-23, Apr 2002.

ANDERSON, R. D.; HASKELL, R. E.; XIA, H.; ROESSLER, B. J.; DAVIDSON, B. L. A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. **Gene Ther**, v. 7, n. 12, p. 1034-8, Jun 2000.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; PIKANÇO-DINIZ, D. L. W.; VALENÇA, M. M.; MCCANN, S. M. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L.; VALENÇA, M. M.; MCCANN, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, Jan 2004.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M. Water, sodium chloride, and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle of the rat brain. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 133, n. 4, p. 1464-70, Apr 1970.

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R. P.; HAYDON, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 208-15, May 1999.

ARMSTRONG, S.; COLEMAN, G.; SINGER, G. Food and water deprivation: changes in rat feeding, drinking, activity and body weight. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 4, n. 3, p. 377-402, Fall 1980.

BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R. Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 64, n. 2, p. 151-64, Feb 5 1999.

BAUER, M.; BAUER, I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 4, n. 5, p. 749-58, Oct 2002.

BERNARD, C. **Lecons Sur Les Effets des substances toxiques et medicamenteuses**. França: B.Bailliere et Fils, 1857.

BOURASSA, E. A.; SPETH, R. C. Water deprivation increases angiotensin-converting enzyme but not AT(1) receptor expression in brainstem and paraventricular nucleus of the hypothalamus of the rat. **Brain Res**, v. 1319, p. 83-91, Mar 10 2010.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 519-31, Jul 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 22, p. 9030-3, Nov 1989.

BRÜNE, B.; SCHMIDT, K. U.; ULLRICH, V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. **Eur J Biochem**, v. 192, n. 3, p. 683-8, Sep 1990.

CHI, P. L.; LIN, C. C.; CHEN, Y. W.; HSIAO, L. D.; YANG, C. M. CO Induces Nrf2-Dependent Heme Oxygenase-1 Transcription by Cooperating with Sp1 and c-Jun in Rat Brain Astrocytes. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 1, p. 277-92, Aug 2015.

CHRIGUER, R. S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; FRANCI, C. R. Atrial natriuretic peptide mediates oxytocin secretion induced by osmotic stimulus. **Brain Res Bull**, v. 59, n. 6, p. 505-11, Feb 2003.

COBLE, J. P.; CASSELL, M. D.; DAVIS, D. R.; GROBE, J. L.; SIGMUND, C. D.

Activation of the renin-angiotensin system, specifically in the subfornical organ is sufficient to induce fluid intake. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 307, n. 4, p. R376-86, Aug 2014.

CRUSE, I.; MAINES, M. D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. **J Biol Chem**, v. 263, n. 7, p. 3348-53, Mar 1988.

CUNNINGHAM, J. T.; PENNY, M. L.; MURPHY, D. Cardiovascular regulation of supraoptic neurons in the rat: synaptic inputs and cellular signals. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 84, n. 2-3, p. 183-96, 2004 Feb-Apr 2004.

D'AMICO, G.; LAM, F.; HAGEN, T.; MONCADA, S. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 11, p. 2291-8, Jun 1 2006.

DE KLOET, E. R.; REUL, J. M.; SUTANTO, W. Corticosteroids and the brain. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 3, p. 387-94, Nov 1990.

DE LUCA, L. A., JR.; VENDRAMINI, R. C.; PEREIRA, D. T.; COLOMBARI, D. A.; DAVID, R. B.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V. Water deprivation and the double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 5, p. 707-12, May 2007.

DENTON, D. A.; MCKINLEY, M. J.; WEISINGER, R. S. Hypothalamic integration of body fluid regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 14, p. 7397-404, Jul 1996.

DIKALOV, S. I.; NAZAREWICZ, R. R. Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 10, p. 1085-94, Oct 2013.

DORÉ, S.; TAKAHASHI, M.; FERRIS, C. D.; ZAKHARY, R.; HESTER, L. D.; GUASTELLA, D.; SNYDER, S. H. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2445-50, Mar 1999.

DWYER, B. E.; NISHIMURA, R. N.; LU, S. Y. Differential expression of heme oxygenase-1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody. Response to oxidative stress. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 30, n. 1, p. 37-47, May 1995.

ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, P. C.; MOREIRA, A. C. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial

natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 4, p. 1243-7, Apr 1997.

EWING, J. F.; MAINES, M. D. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2. **Mol Cell Neurosci**, v. 3, n. 6, p. 559-70, Dec 1992.

FÉNELON, V. S.; THEODOSIS, D. T.; POULAIN, D. A. Fos synthesis in identified magnocellular neurons varies with phenotype, stimulus, location in the hypothalamus and reproductive state. **Brain Res**, v. 662, n. 1-2, p. 165-77, Oct 1994.

FITZSIMONS, J. T. The physiology of thirst and sodium appetite. **Monogr Physiol Soc**, n. 35, p. 1-572, 1979.

\_\_\_\_\_. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, p. 583-686, Jul 1998.

FORESTI, R.; SARATHCHANDRA, P.; CLARK, J. E.; GREEN, C. J.; MOTTERLINI, R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. **Biochem J**, v. 339 ( Pt 3), p. 729-36, May 1999.

GANONG, W. F. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 5-6, p. 422-7, 2000 May-Jun 2000.

GHATTA, S.; NIMMAGADDA, D.; XU, X.; O'ROURKE, S. T. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. **Pharmacol Ther**, v. 110, n. 1, p. 103-16, Apr 2006.

GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neurosci Lett**, v. 381, n. 3, p. 320-4, Jun 2005.

GLASGOW, E.; MURASE, T.; ZHANG, B.; VERBALIS, J. G.; GAINER, H. Gene expression in the rat supraoptic nucleus induced by chronic hyperosmolality versus hyposmolality. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 4, p. R1239-50, Oct 2000.

GODINO, A.; GIUSTI-PAIVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. **Neuroscience**, v. 133, n. 2, p. 493-505, 2005.



GOMES, D. A.; GIUSTI-PAIVA, A.; VENTURA, R. R.; ELIAS, L. L.; CUNHA, F. Q.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. **Biosci Rep**, v. 30, n. 5, p. 351-7, Jun 2010.

GOMES, DAYANE A.; GIUSTI- PAIVA, A.; VENTURA, RENATO R.; ELIAS, LUCILA LEICO K.; CUNHA, FERNANDO Q.; ANTUNES- RODRIGUES, J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 5, p. 351-357, 2010.

GOMES, D. A.; REIS, W. L.; VENTURA, R. R.; GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L. L.; CUNHA, F. Q.; ANTUNES-RODRIGUES, J. The role of carbon monoxide and nitric oxide in hyperosmolality-induced atrial natriuretic peptide release by hypothalamus in vitro. **Brain Res**, v. 1016, n. 1, p. 33-9, Jul 2004.

GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; MILNE, R. W.; JANUSZEWICZ, P.; SCHILLER, P. W.; CANTIN, M.; GENEST, J. Radioimmunoassay of atrial natriuretic factor (ANF) in rat atria. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 176, n. 2, p. 105-8, Jun 1984.

HAACK, D.; VECSEI, P.; LICHTWALD, K.; VIELHAUER, W. Corticosteroid and corticosteroid metabolite levels in animals immunized against corticosteroids. **J Steroid Biochem**, v. 11, n. 1c, p. 971-80, Jul 1979.

HAANWINCKEL, M. A.; ELIAS, L. K.; FAVARETTO, A. L.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7902-6, Aug 15 1995.

HALDANE, J. The Relation of the Action of Carbonic Oxide to Oxygen Tension. **J Physiol**, v. 18, n. 3, p. 201-17, Jul 1895.

HAN, J.; LEE, J. D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R. J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 265, n. 5173, p. 808-11, Aug 1994.

HARRIS, G. W. Neural control of the pituitary gland. I. The neurohypophysis. **Br Med J**, v. 2, n. 4731, p. 559-64, Sep 1951.

HATTON, G. I. Time course of blood changes during acute water deprivation in rats. **Physiol Behav**, v. 7, n. 1, p. 35-8, Jul 1971.

HUANG, W.; LEE, S. L.; SJOQUIST, M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. **Am J Physiol**, v. 268, n. 3 Pt 2, p. R634-40, Mar 1995.

HUANG, W.; LEE, S. L.; SJÖQUIST, M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. **Am J Physiol**, v. 268, n. 3 Pt 2, p. R634-40, Mar 1995.

IMUTA, N.; HORI, O.; KITAO, Y.; TABATA, Y.; YOSHIMOTO, T.; MATSUYAMA, T.; OGAWA, S. Hypoxia-mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 5, p. 543-52, May 2007.

IWAI, N.; INAGAMI, T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. **FEBS Lett**, v. 298, n. 2-3, p. 257-60, Feb 1992.

JAGGAR, J. H.; LI, A.; PARFENOVA, H.; LIU, J.; UMSTOT, E. S.; DOPICO, A. M.; LEFFLER, C. W. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. **Circ Res**, v. 97, n. 8, p. 805-12, Oct 2005.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 3, p. 292-353, Jul 1997.

KHARITONOV, V. G.; SHARMA, V. S.; PILZ, R. B.; MAGDE, D.; KOESLING, D. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 7, p. 2568-71, Mar 1995.

KIM, H. P.; RYTER, S. W.; CHOI, A. M. CO as a cellular signaling molecule. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p. 411-49, 2006.

KISS, A.; AGUILERA, G. Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress: responses to repeated intraperitoneal hypertonic saline injection. **Brain Res**, v. 630, n. 1-2, p. 262-70, Dec 1993.

KOBAYASHI, A.; KANG, M. I.; OKAWA, H.; OHTSUJI, M.; ZENKE, Y.; CHIBA, T.; IGARASHI, K.; YAMAMOTO, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 16, p. 7130-9, Aug 2004.

KOHMOTO, J.; NAKAO, A.; STOLZ, D. B.; KAIZU, T.; TSUNG, A.; IKEDA, A.; SHIMIZU, H.; TAKAHASHI, T.; TOMIYAMA, K.; SUGIMOTO, R.; CHOI, A. M.; BILLIAR, T. R.; MURASE, N.; MCCURRY, K. R. Carbon monoxide protects rat lung transplants from ischemia-reperfusion injury via a mechanism involving p38 MAPK pathway. **Am J Transplant**, v. 7, n. 10, p. 2279-90, Oct 2007.

KONOPACKA, A.; QIU, J.; YAO, S. T.; GREENWOOD, M. P.; GREENWOOD, M.; LANCASTER, T.; INOUE, W.; MECAWI, A. S.; VECHIATO, F. M.; DE LIMA, J. B.; COLETTI, R.; HOE, S. Z.; MARTIN, A.; LEE, J.; JOSEPH, M.; HINDMARCH, C.; PATON, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BAINS, J.; MURPHY, D. Osmoregulation requires brain expression of the renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. **J Neurosci**, v. 35, n. 13, p. 5144-55, Apr 2015.

KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I.; COSTA, A.; NAVARRA, P.; NAPPI, G.; FORSLING, M. L.; GROSSMAN, A. B. Endotoxin stimulates an endogenous pathway regulating corticotropin-releasing hormone and vasopressin release involving the generation of nitric oxide and carbon monoxide. **J Neuroimmunol**, v. 86, n. 1, p. 104-9, Jun 1998.

KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I.; FORSLING, M. L.; NAVARRA, P.; GROSSMAN, A. B. Oxytocin release is inhibited by the generation of carbon monoxide from the rat hypothalamus--further evidence for carbon monoxide as a neuromodulator. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 42, n. 2, p. 301-6, Dec 1996.

KUTSCHER, C. L. Hematocrit, plasma osmolality, and plasma protein concentration as estimators of plasma volume in hooded rats during food and water deprivation. **Physiol Behav**, v. 7, n. 2, p. 283-5, Aug 1971.

KUTTY, R. K.; MAINES, M. D. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 256, n. 8, p. 3956-62, Apr 1981.

LINDENAU, J.; NOACK, H.; POSSEL, H.; ASAYAMA, K.; WOLF, G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. **Glia**, v. 29, n. 1, p. 25-34, Jan 1 2000.

MA, X.; SAYED, N.; BEUVE, A.; VAN DEN AKKER, F. NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. **EMBO J**, v. 26, n. 2, p. 578-88, Jan 2007.

MAINES, M. D. Carbon Monoxide: An Emerging Regulator of cGMP in the Brain. **Mol Cell Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 389-97, Oct 1993.

\_\_\_\_\_. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 517-54, 1997.

MANCUSO, C.; KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I.; FORSLING, M. L.; GROSSMAN, A. B.; PREZIOSI, P.; NAVARRA, P.; MINOTTI, G. Activation of heme oxygenase and consequent carbon monoxide formation inhibits the release of arginine vasopressin from rat hypothalamic explants. Molecular linkage between heme catabolism and neuroendocrine function. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 50, n. 1-2, p. 267-76, Oct 1997.

MASON, W. T. Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. **Nature**, v. 287, n. 5778, p. 154-7, Sep 1980.

MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; JANKOWSKI, M.; GUTKOWSKA, J. Oxytocin, vasopressin and atrial natriuretic peptide control body fluid homeostasis by action on their receptors in brain, cardiovascular system and kidney. **Prog Brain Res**, v. 139, p. 309-28, 2002.

MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 165-81, Feb 2003.

MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J.; FRANCI, C. R.; FAVARETTO, A. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Hypothalamic control of water and salt intake and excretion. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 4, p. 865-84, Apr 1994.

MCCARTHY, K. D.; DE VELLIS, J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. **J Cell Biol**, v. 85, n. 3, p. 890-902, Jun 1980.

MCCOUBREY, W. K.; HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem**, v. 247, n. 2, p. 725-32, Jul 1997.

MCKINLEY, M. J.; HARDS, D. K.; OLDFIELD, B. J. Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. **Brain Res**, v. 653, n. 1-2, p. 305-14, Aug 1994.

MCNALLY, S. J.; ROSS, J. A.; JAMES GARDEN, O.; WIGMORE, S. J. Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity. **Anal Biochem**, v. 332, n. 2, p. 398-400, Sep 2004.

MECAWI, A. S.; ARAUJO, I. G.; ROCHA, F. F.; COIMBRA, T. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; REIS, L. C. Ontogenetic role of angiotensin-converting enzyme in rats: thirst and sodium appetite evaluation. **Physiol Behav**, v. 99, n. 1, p. 118-24, Jan 2010.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J Biol Chem**, v. 269, n. 13, p. 9397-400, Apr 1994.

MORRIS, M.; LI, P.; CALLAHAN, M. F.; OLIVERIO, M. I.; COFFMAN, T. M.; BOSCH, S. M.; DIZ, D. I. Neuroendocrine effects of dehydration in mice lacking the angiotensin AT1a receptor. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 482-6, Jan 1999.

MORRIS, M.; MEANS, S.; OLIVERIO, M. I.; COFFMAN, T. M. Enhanced central response to dehydration in mice lacking angiotensin AT(1a) receptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 4, p. R1177-84, Apr 2001.

MOTTERLINI, R.; OTTERBEIN, L. E. The therapeutic potential of carbon monoxide. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 9, p. 728-43, Sep 2010.

NIOI, P.; MCMAHON, M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; HAYES, J. D. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. **Biochem J**, v. 374, n. Pt 2, p. 337-48, Sep 1 2003.

NODA, M. Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. **Exp Physiol**, v. 92, n. 3, p. 513-22, May 2007.

OLIET, S. H.; BOURQUE, C. W. Properties of supraoptic magnocellular neurones isolated from the adult rat. **J Physiol**, v. 455, p. 291-306, Sep 1992.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, 1987 Jun 11-17 1987.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Estados Unidos: Academic Press, 1997.

POSS, K. D.; TONEGAWA, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 20, p. 10925-30, Sep 30 1997.

POZZOLI, G.; MANCUSO, C.; MIRTELLA, A.; PREZIOSI, P.; GROSSMAN, A. B.; NAVARRA, P. Carbon monoxide as a novel neuroendocrine modulator: inhibition of stimulated corticotropin-releasing hormone release from acute rat hypothalamic explants. **Endocrinology**, v. 135, n. 6, p. 2314-7, Dec 1994.

QUEIROGA, C. S.; ALVES, R. M.; CONDE, S. V.; ALVES, P. M.; VIEIRA, H. L. Paracrine effect of carbon monoxide - astrocytes promote neuroprotection through purinergic signaling in mice. **J Cell Sci**, v. 129, n. 16, p. 3178-88, 08 2016.

RAUB, J. A.; MATHIEU-NOLF, M.; HAMPSON, N. B.; THOM, S. R. Carbon monoxide poisoning--a public health perspective. **Toxicology**, v. 145, n. 1, p. 1-14, Apr 2000.

REIS, W. L.; BIANCARDI, V. C.; SON, S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; STERN, J. E. Enhanced expression of heme oxygenase-1 and carbon monoxide excitatory effects in

oxytocin and vasopressin neurones during water deprivation. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 4, p. 653-63, Apr 2012.

\_\_\_\_\_. Carbon monoxide and nitric oxide interactions in magnocellular neurosecretory neurones during water deprivation. **J Neuroendocrinol**, v. 27, n. 2, p. 111-22, Feb 2015.

ROBERTSON, G. **The Kidney: Physiology and Patophysiology**. Regulation of vasopressin release. Nova Iorque: Raven Press: 1595-1613 p. 1992.

RODGERS, P. A.; VREMAN, H. J.; DENNERY, P. A.; STEVENSON, D. K. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. **Semin Perinatol**, v. 18, n. 1, p. 2-10, Feb 1994.

RUGINSK, S. G.; MECAWI, A. S.; DA SILVA, M. P.; REIS, W. L.; COLETTI, R.; DE LIMA, J. B.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Gaseous modulators in the control of the hypothalamic neurohypophyseal system. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 2, p. 127-38, Mar 2015.

SASAMURA, H.; HEIN, L.; KRIEGER, J. E.; PRATT, R. E.; KOBILKA, B. K.; DZAU, V. J. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 185, n. 1, p. 253-9, May 1992.

SCAPAGNINI, G.; D'AGATA, V.; CALABRESE, V.; PASCALE, A.; COLOMBRITA, C.; ALKON, D.; CAVALLARO, S. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. **Brain Res**, v. 954, n. 1, p. 51-9, Nov 2002.

SHARE, L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. **Physiol Rev**, v. 68, n. 4, p. 1248-84, Oct 1988.

SHARIF NAEINI, R.; WITTY, M. F.; SEGUELA, P.; BOURQUE, C. W. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. **Nat Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 93-8, Jan 2006.

SILVA, M. P.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; VARANDA, W. A. Effects of nitric oxide on magnocellular neurons of the supraoptic nucleus involve multiple mechanisms. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 2, p. 90-100, Feb 2014.

SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. **Science**, v. 181, n. 4105, p. 1172-5, Sep 21 1973.

ST-LOUIS, R.; PARMENTIER, C.; RAISON, D.; GRANGE-MESSENT, V.; HARDIN-POUZET, H. Reactive oxygen species are required for the hypothalamic osmoregulatory response. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1317-29, Mar 2012.

STERN, J. E.; LUDWIG, M. NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 6, p. R1815-22, Jun 2001.

STUART, G.; SAKMANN, B. Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1065-76, Nov 1995.

SUMMY-LONG, J. Y.; BUI, V.; MANTZ, S.; KOEHLER, E.; WEISZ, J.; KADEKARO, M. Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration. **Neurosci Lett**, v. 152, n. 1-2, p. 190-3, Apr 1993.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu Rev Neurosci**, v. 6, p. 269-324, 1983.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 61, n. 2, p. 748-55, Oct 1968.

THEODOSIS, D. T.; POULAIN, D. A.; OLIET, S. H. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. **Physiol Rev**, v. 88, n. 3, p. 983-1008, Jul 2008.

TRUDEL, E.; BOURQUE, C. W. A rat brain slice preserving synaptic connections between neurons of the suprachiasmatic nucleus, organum vasculosum lamina terminalis and supraoptic nucleus. **J Neurosci Methods**, v. 128, n. 1-2, p. 67-77, Sep 2003.

TURNBULL, A. V.; KIM, C. K.; LEE, S.; RIVIER, C. L. Influence of carbon monoxide, and its interaction with nitric oxide, on the adrenocorticotropin hormone response of the normal rat to a physico-emotional stress. **J Neuroendocrinol**, v. 10, n. 10, p. 793-802, Oct 1998.

UHLIK, M. T.; ABELL, A. N.; JOHNSON, N. L.; SUN, W.; CUEVAS, B. D.; LOBEL-RICE, K. E.; HORNE, E. A.; DELL'ACQUA, M. L.; JOHNSON, G. L. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 12, p. 1104-10, Dec 2003.

VERBALIS, J. G. How does the brain sense osmolality? **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 12, p. 3056-9, Dec 2007.

VERMA, A.; HIRSCH, D. J.; GLATT, C. E.; RONNETT, G. V.; SNYDER, S. H. Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science**, v. 259, n. 5093, p. 381-4, Jan 15 1993.

VINCENT, S. R.; DAS, S.; MAINES, M. D. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 223-31, Nov 1994.

VREMAN, H. J.; WONG, R. J.; STEVENSON, D. K. Phototherapy: current methods and future directions. **Semin Perinatol**, v. 28, n. 5, p. 326-33, Oct 2004.

WANG, B.; CAO, W.; BISWAL, S.; DORE, S. Carbon monoxide-activated Nrf2 pathway leads to protection against permanent focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 42, n. 9, p. 2605-10, Sep 2011.

WANG, R.; WANG, Z.; WU, L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 5, p. 927-34, Jul 1997.

WANG, R.; WU, L.; WANG, Z. The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. **Pflugers Arch**, v. 434, n. 3, p. 285-91, Jul 1997.

WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. **Biochemistry**, v. 31, n. 29, p. 6627-31, Jul 1992.

WILKINSON, W. J.; KEMP, P. J. The carbon monoxide donor, CORM-2, is an antagonist of ATP-gated, human P2X4 receptors. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 1, p. 57-64, Mar 2011.

WOLFF, D. G. The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 73, n. 4, p. 850-7, Dec 1976.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 18, n. 1, p. 21-53, 1994.

WU, L.; WANG, R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 585-630, Dec 2005.

ZAKHARY, R.; GAINE, S. P.; DINERMAN, J. L.; RUAT, M.; FLAVAHAN, N. A.; SNYDER, S. H. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 2, p. 795-8, Jan 1996.

ZHANG, M.; AN, C.; GAO, Y.; LEAK, R. K.; CHEN, J.; ZHANG, F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v. 100, p. 30-47, Jan 2013.



ZHANG, X.; SHAN, P.; ALAM, J.; FU, X. Y.; LEE, P. J. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. **J Biol Chem**, v. 280, n. 10, p. 8714-21, Mar 2005.

ZIMMERMAN, M. C.; LAZARTIGUES, E.; LANG, J. A.; SINNAYAH, P.; AHMAD, I. M.; SPITZ, D. R.; DAVISSON, R. L. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. **Circ Res**, v. 91, n. 11, p. 1038-45, Nov 29 2002.

ZONGAZO, M. A.; CARAYON, A.; MASSON, F.; ISNARD, R.; EURIN, J.; MAISTRE, G.; BARTHÉLEMY, C.; PROST, A. C.; LEGRAND, J. C. Atrial natriuretic peptide during water deprivation or hemorrhage in rats. Relationship with arginine vasopressin and osmolarity. **J Physiol Paris**, v. 86, n. 4, p. 167-75, 1992.

ZUCKERBRAUN, B. S.; CHIN, B. Y.; BILBAN, M.; D'AVILA, J. C.; RAO, J.; BILLIAR, T. R.; OTTERBEIN, L. E. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. **Faseb j**, v. 21, n. 4, p. 1099-106, Apr 2007.



## **Carbon Monoxide time-dependent action on water-deprived rats' neuroendocrine responses: participation of nitric oxide and p38 MAPK signaling**

Lima, J. B. M.<sup>1</sup>; Coletti, R.<sup>1</sup>; Vechiato, F. M. V.<sup>1</sup>; Lucio-Oliveira, F.<sup>2</sup>; Elias, L. L. K.<sup>1</sup>; Antunes-Rodrigues, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil;*

<sup>2</sup>*Southern Minas Gerais Federal Institute of Education, Sciences and Technology, Muzambinho, Brazil.*

### **Abstract**

Carbon monoxide plays important roles in animal physiology including synaptic plasticity, learning and memory processes, inflammation and hypothalamic neuropeptide release. Recently it has been demonstrated that the AVP and OT release in response to changes in hydromineral balance can be modulated by this gaseous neuromodulator; however, the mechanisms by which this modulation occurs need to be elucidated. In order to answer this questioning, we evaluated the CO effect on neuroendocrine responses, SON magnocellular neurons passive membrane properties, p38 MAPK signaling, NO/NOS system and astrocytes participation in rats during control or 24/48 WD conditions. We observed that CO formation inhibition reduced the water deprivation-induced increase in plasma AVP and OT concentration and NOS activity in basal and 48 WD groups; while p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio was increased by central CO donation in both euhydrated and dehydrated conditions. Furthermore, we demonstrated HO-1, p38 MAPK and p-p38 MAPK expression in MBH astrocytes. These data indicate the CO role as neuromodulatory molecule in neuroendocrine responses to dehydration where it might play its biological functions through p38 MAPK phosphorylation and NOS activity in a water restriction longer period.

### **Introduction**

The regulation of hydromineral balance involves structures of several systems among them the neuroendocrine (Antunes-Rodrigues, 2004). In a moment-to-moment manner the dynamic changes in osmolality and body volume are conveyed to specific areas of the central nervous system (CNS) (Cunningham, 2004) creating an integrated response that, among

others, stimulates the secretion of arginine vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) by neurohypophysis and atrial natriuretic peptide (ANP) from the heart (McCann, 1994; Bastos, 2001; McCann 2003). The AVP and OT secretion by magnocellular neurons (MNCs) of the supraoptic (SON) and paraventricular nuclei (PVN) is controlled by different neurotransmitters and neuromodulators such as glutamate, catecholamines, amino acids and cytokines (Robertson, 1992; Stern and Ludwig, 2001). However, in the recent past, some participation evidence of a new class of neuromodulators in this regulation has raised in the literature: the gaseous molecules, whose the main effect and their targets in central nervous system remains under discussion.

The endogenous production of carbon monoxide (CO), a colorless, odorless, diatomic and stable gas, by the action of heme oxygenase enzymes (HO) has been demonstrated (Maines, 1997). HO cleaves the heme group, arising from any cell source, in equimolar amounts of CO, biliverdin and iron. This enzyme has been described in three isoforms: HO-1, HO-2, HO-3 (Kutty & Maines, 1981; Maines, 1997). HO-1 is the inducible isoform, while HO-2 and HO-3 are constitutively expressed; between them, HO-2 is responsive to corticosterone (CORT) whereas HO-3 remains to be further investigated (Wu & Wang, 2005). HO-1 and HO-2 isoforms are ubiquitously expressed in several tissues including CNS areas involved in the regulation of fluid and electrolyte homeostasis, such as SON (Verma, 1993; Vincent, 1994).

The most studied function of CO in the central nervous system is its effect of stimulation on the soluble guanylate cyclase (sGC), which promotes the increase in production of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) (Barinaga, 1993) which, in turn, mediates the specific biological action in different physiological systems, yet there are other ways by which CO could act on biological systems (Raub, 2000).

It is already known that this gas can direct and indirectly modulate other targets besides sGC, such as other gaseous systems like nitric oxide (NO) (White & Marletta, 1992; Ruginsk, 2015), signaling cascade proteins, such as p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) (Takeda & Ichijo, 2002), and ion channels (Wilkinson & Kemp, 2011). Beyond that, the presence of HO isoforms has been described in astrocytes and other glial cells (Scapagnini, 2002; Li Volti, 2004) and it is known that the astrocyte-produced CO can act on neuronal cells, in a paracrine way (Queiroga, 2016).

Regarding p38 MAPK, it is a protein from MAPK super family that is responsive to osmolality changes (Han, 1994; Arima, 2003), it is constitutively expressed in hypothalamic areas involved in neuroendocrine responses to hydroelectrolytic balance disruption, it is

localized in both neuronal and glial cells (Bu, 2007; Wei, 2009) and has previously been characterized as a stimulus- and site-specific CO intracellular target (Takeda & Ichijo, 2002); however, its involvement in CO-mediated dehydration neuroendocrine responses has not yet been evaluated.

In concern with NO system, NO synthase neuronal isoform (nNOS) is expressed in PVN and SON (Bredt, 1990; Vincent & Kimura, 1992) and this system is involved in AVP and OT responses to salt loading and water deprivation (Kadowaki, 1994; Villar, 1994) which can be modulated by CO. It has already been demonstrated *ex vivo* that CO may interact with NOS decreasing its activity, which leads to an increase in the release of AVP and OT by the medial basal hypothalamus (MBH) (Gomes, 2004; Gomes, 2010); corroborating these findings, Reis and coworkers (2015) also demonstrated that during 48-hour water deprivation interactions of NOS and CO take place. Nevertheless, data obtained by our group (Lima, unpublished data) has shown that the hypothalamic CO is necessary to the integrity of neuroendocrine responses to 24-hour water deprivation even though there have been observed changes neither in the content of nitrates nor in NOS activity.

Therefore, this study aims to clarify the CO action on neuroendocrine system in the face of 24- and 48-hour water deprivation protocols while it searches for its targets looking specifically at its interaction with NO/NOS system, its influence on p38 MAPK pathway, screening the SON electrophysiological status and observing the presence of HO-1 in astrocytes.

## **Material and Methods**

### **Animals**

Male Wistar rats were used in all protocols performed in this study. They were housed in cages under controlled conditions of temperature ( $23 \pm 2$  °C) and lighting (lights on from 0600 to 1800 h), with free access to standard chow and tap water. With regard to experiments involving electrophysiological techniques, animals weighing between 80-100 g were used, while for the protocols involving primary cultures of rat astrocytes, hypothalami were obtained from 1-to-2-day-old rat pups; for the other protocols, rats weighing between 250-280 g were used. All rats were obtained from the Central Animal Facility of the Campus of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo. All of the experimental procedures occurred in the morning (from 0700 to 1100 h) and were in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publication No. 85-23, revised 1996); every experimental

protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Use of Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (Protocol #006/2014-1).

### **Drugs**

Two drugs were used: Zn(II) deuteroporphyrin IX 2,4-bis-ethylene glycol (ZnDPBG; Frontier Scientific, #ZnD630-9) was used as a HO inhibitor and freshly dissolved in 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> right before injection; tricarbonylchloro(glycinato)ruthenium (II) (CORM-3; Sigma-Aldrich, #SML0496) was used as a CO donor, an aliquot of CORM-3 was dissolved one day before the experiment to be used as a vehicle, while the one to be used as a CO donor was freshly dissolved in pyrogen-free 0.9% saline right before the experiment. In some of the electrophysiological experiments, synaptic blockers were used: 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX; Sigma-Aldrich, #D0540, 30 μM, non-NMDA glutamate receptor antagonist), D(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5; Sigma-Aldrich, #A8054, 10 μM, NMDA glutamate receptor antagonist) and Picrotoxin (PICRO; Sigma-Aldrich, #P1675, 30 μM, GABA receptor antagonist).

### **In vivo protocols**

Animals were subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation with free access to standard chow. Thirty minutes prior to the euthanasia, each animal group was injected with ZnDPBG or CORM-3 (or their respective vehicles). Then the plasma hormone and protein concentrations, and hematocrit were obtained from trunk blood; HO and NOS activities were analyzed from medial basal hypothalamus, and western blotting analysis was performed from SON samples.

### **Surgery for cannula implantation into cerebral lateral ventricle**

After four days of acclimatization, the rats were subjected to surgery as described by Coletti (2015). The rats were anesthetized with ketamine (60 mg/kg body weight, Ceva Santé Animale) and xylazine (7.5mg/kg b.w., Ceva Santé Animale), and were submitted to stereotaxic surgery for stainless steel cannula implantation (12-mm length, 0.4-mm i.d. and 0.7-mm o.d.) into the cerebral right lateral ventricle through stereotaxic instrument (Kopf 900) using the following coordinates (relative to the bregma): 0.5 mm posterior, 1.4 mm lateral and 3.6 mm vertical (Paxinos & Watson, 2004). After surgery, the rats were treated with a prophylactic dose of pentabiotic (0.1 mL/100 g of b.w., i.m., Fort Dodge) and were handled

daily and allowed to recover for 5 days. The confirmation of the cannula position was given by administration (4  $\mu$ L) of 2% Evans blue dye at the end of each experiment.

#### **Determination of hematocrit, plasma protein and hormone concentrations**

After decapitation, the trunk blood was collected into heparinized (50  $\mu$ L/mL) plastic tubes for the determination of osmolality, hormone and protein concentrations, or into heparinized capillaries for hematocrit, which were then centrifuged (2500 rpm, 25 °C, 5 min) and read against a volumetric scale whose results were expressed as percentage. For plasma protein dosage, 10  $\mu$ L of plasma were diluted (1:200) and pipetted in duplicate in a 96-well microplate. The measurement was done in a spectrophotometer (Bradford, 1976), and results were expressed as mg/dL. Plasma hormone concentrations performed by RIA are described below. AVP, OT and ANP results are expressed in pg/mL.

#### **Determination of plasma hormone concentrations**

Briefly, for determination of vasopressin and oxytocin concentrations, plasma samples (1 mL) were extracted using acetone and petroleum ether (Haanwinckel, 1995), while ANP was extracted from 1 mL of plasma through Sep-Pak C-18 cartridges (Waters Corporation, Milford, MA, USA). RIA for AVP, OT and ANP was conducted as described by Hussain (1973), Haanwinckel (1995), and Gutkowska (1984) respectively. The assay sensitivities and intra-assay coefficient of variation were 0.1 pg/mL, 5.9% for AVP; 0.1 pg/mL, 1.9% for OT; and 0.8 pg/mL, 6.9% for ANP.

#### **Western Blotting**

The supraoptic nuclei were dissected out (thickness: 1.5 mm). Total SON protein was extracted using 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 1% halt protease and phosphatase inhibitor Single-Use Cocktail, EDTA-Free (Thermo Scientific, 78443), 1% Triton-X 100, pH 7.2 at 4°C and 15,000 g for 50 min. Aliquots of the lysates containing 17.1  $\mu$ g of protein were denatured in Laemmli sample buffer [6% sodium dodecyl sulfate, 30% glycerol, 0.02% bromophenol blue, 200 mM Tris·HCl (pH 6.8), and 250 mM mercaptoethanol] at 95°C for 5 min. The samples were blotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was prevented by immersing the membranes in blocking solution [5% Bovine Serum Albumine in Tris-Buffered Saline-Tween 20 (TBS-T)] for 1 h at room temperature. The membranes were then exposed overnight (at least for 16 hours) to the primary antibody [anti- $\beta$ -Actin (rabbit, 1:80K, Cell-Signalling #4967) or anti-p38 MAPK (rabbit, 1:1000, Cell Signalling #9212) or

anti-p-p38 MAPK (rabbit, 1:1000, Cell Signalling #9211)] in blocking solution. Then, the blots were rinsed 5 times with TBS-T and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit-IgG antibody [1:5000 for  $\beta$ -Actin and 1:2500 for p38 MAPK and p-p38 MAPK (Cell Signaling #7074)] in blocking solution for 1 h at room temperature. Antibody-antigen complexes were visualized by chemiluminescence using an ECL detection system (Amersham Biosciences) and digital images were analyzed with *Image Studio Lite 5.2* software (LI-COR Biosciences).

### **Ex vivo protocols**

#### **Electrophysiology**

##### **Hypothalamic slices preparation**

Hypothalamic slices from male Wistar rats (25–30 days old and 80-100 g) were prepared as described previously (da Silva et al., 2013). In short, following decapitation, the brain was quickly removed from the cranial vault and submerged in cooled (0-4 °C), oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) artificial cerebro-spinal fluid solution (ACSF) containing 121 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM glucose, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub> which was saturated with carbogen [pH 7.4 and osmolality 310 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O (Fiske Mark 3 Osmometer, Norwood, USA)]. Next, 230- $\mu$ m thick coronal slices containing the supraoptic nuclei were obtained using a Leica vibratome (model VT 1200 S, Heidelberg, Germany). They were incubated for at least 1 h at 36 °C in a modified ACSF containing 121 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose and 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (constantly gassed with carbogen, at pH 7.4 and osmolality 295 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) for metabolic reestablishment.

##### **Neuronal activity recording**

Magnocellular neurons of the supraoptic nuclei were visualized by infrared differential contrast optics with images captured through a CCD digital camera (SensiCam qe, The Cooke Corporation, Romulus, MI, USA). Anatomical and morphological characteristics were used for their identification (Paxinos & Watson, 2004). For electrophysiological recordings, the current-clamp mode in the whole-cell configuration of the patch clamp technique was used. Micropipettes were made from borosilicate glass capillaries and had resistance ranging from 4 to 6 M $\Omega$  when filled with the following pipette solution: 140 mM potassium



gluconate ( $C_6H_{11}O_7K$ ), 10 mM KCl, 0.3 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1 mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 2 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate (Na-ATP) and 0.25 mM Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate (Na-GTP) (pH 7.3, and osmolality ranging from 285 to 295 mOsm/Kg  $H_2O$ ). Ultrapure water was treated overnight with diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) and used to prepare pipette solutions. Recordings were performed using an Axon 200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA, USA), and signals were low-pass filtered at 2 KHz and digitized at 10 KHz using a Digidata 1440A (Molecular Devices) controlled by Clampex (Molecular Devices). Recordings started 3 min after achieving the whole-cell configuration, and the membrane capacitance and series resistance were compensated (40–60%) using the amplifier settings. The recordings were firstly made under a control condition for 5 min, then in the presence or not of synaptic blockers (DNQX, D-AP5 and Picrotoxin) for 5 min, and finally with 30  $\mu$ M ZnDPBG or 30  $\mu$ M CORM-3 for 10 min. The analysis of input resistance and neuronal excitability were made in a group of cells.

The SON magnocellular neurons excitability was assessed by recording the number of action potentials (in current-clamp configuration) in response to 5 pA current steps (2 s), which were applied from -5 to -40 pA with 1 s interval. This protocol was applied 5, 10 and 15 min after breaking into the cell. Still, the SON magnocellular neurons input resistance was measured by the voltage-current relation slope obtained through recording the  $V_m$  (in current-clamp configuration) in response to 5 pA current steps (2 s), which were applied from -5 to -60 pA with 1 s interval. This protocol was applied 5, 10 and 15 min after breaking into the cell.

Then, 5 min were recorded as control condition and 10 minutes were recorded under 30  $\mu$ M ZnDPBG or 30  $\mu$ M CORM-3 superfusion, or, before exposure to HO inhibitor/CO donor, 5 min were recorded under synaptic blockers superfusion (DNQX, D-AP5 and PICRO). Also, in this last experiment, some cells were submitted to input resistance and excitability protocols in all experimental conditions.

Intrinsic activity (action potential frequency) was obtained through a gap-free protocol, the record consisted in measure the firing rate for 10 min under ZnDPBG or CORM-3 superfusion with or without the presence of synaptic blockers, whereas the  $V_m$  was considered, in the analysis of voltage histogram, the voltage in which the cell remains for the longer period.

The liquid junction potential,  $-15$  mV between the pipette and bath solutions, was calculated using Clampex, and the values presented here were corrected accordingly. All data were analyzed using Clampfit (Molecular Devices).

### **Molecular identification of neuronal phenotypes**

Subsequently to the electrophysiological recordings, the cytoplasm of each cell was collected into the recording pipette and transferred to a reaction tube containing reverse transcription master mix in DEPC-treated water (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The reverse transcription was performed immediately after the recording in a thermocycler (Master Cycler, Eppendorf, Hamburg, Germany) using the protocol recommended by the manufacturer.

### **cDNA pre-amplification reaction**

Since the amount of cDNA obtained from a single cell is very small, a pre-amplification step was performed using TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Life Technologies Corporation) with the following probes: Rn00564446\_g1 (oxytocin), Rn00566449\_m1 (vasopressin) and Rn00691548\_m1 ( $\beta$ -actin). All reagents were obtained from Life Technologies Corporation and were used in accordance with the kit instructions. Afterwards, cDNA samples were stored at  $-20$  °C until they were used in real-time PCR reaction.

### **Real-time PCR**

qPCR was performed in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies Corporation). Reactions were conducted in single-plex and in triplicate for each gene with the same probes described before and using the kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corporation). The mean amplification efficiencies obtained by calibration curves based on serial dilutions of a cDNA pool from all the samples were 75.5% for vasopressin and 70% for oxytocin.

### **Analysis of RT-qPCR results.**

The relative expression of the two genes of interest, oxytocin and vasopressin, was determined based on the calculation published by Da Silva and coworkers (2015), using their assumptions it was possible to determine if a recorded neuron had a vasopressinergic or oxytocinergic phenotype.

### **Immunofluorescence in a single neuron**

For this purpose, we added an intracellular tracer, biocytin (Life Technologies Corporation), into the patch pipette solution (final concentration = 0.2%). Subsequently to the electrophysiological measurements, the cytoplasm of each cell was collected for single-cell qPCR following the same steps described previously. After these procedures, the slice was fixed overnight with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (0.01 M PBS) and then dehydrated in 30% sucrose. Both steps were conducted at 4°C. After dehydration, the slices were blocked and permeabilized in PBS containing 10% normal horse serum and 0.1% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Then, the slices were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: guinea pig anti-OT (1:2000, cat. no. T-5021 Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA) and rabbit anti-VP (1:2000, cat. no. 4563, Peninsula Laboratories). Subsequently, the slices were washed using 0.01 M PBS and incubated with secondary antibodies: donkey anti-rabbit conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) for AVP and donkey anti-guinea pig conjugated to Cy5 for OT (Jackson Immuno Research Lab, West Grove, PA, USA, both diluted 1:250). At the same time, the biocytin-labeled recorded neurons were revealed by reaction with streptavidin (Alexa Fluor 405 conjugate, Life Technologies Corporation), which was diluted 1:500. The slices were then washed three times in PBS and mounted onto glass slides with Fluoromount (Sigma Chemical Corporation). Fluorescence images were acquired sequentially (0.3- $\mu$ m interval) in a confocal microscope (TCS SP5, Leica), and images were analyzed using the software ImageJ (W.S. Rasband/National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). For each slice, the biocytin-positive neuron was identified, and vertical (Z) projections were collected sequentially to analyze the colocalization.

### **Enzymatic Activity Assays**

#### **Medial basal hypothalamus (MBH) collection**

After decapitation and removal of the brains from the animals, MBH was promptly dissected. MBH preparation comprises the anterior and medial basal portion of the hypothalamus, comprehending from the anterior portion of the optic chiasm to the anterior portion of the mammillary nuclei; therefore, including the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), supraoptic nuclei (SON), ventromedial nuclei, paraventricular nuclei (PVN), arcuate nuclei, suprachiasmatic nuclei and periventricular areas. Two longitudinal

sections were bilaterally performed at 1 mm from the midline, delimiting the tissue block area. The fragment depth was about 2 mm (Gomes, 2004, 2010).

### **Activity of Nitric Oxide Synthase (NOS)**

The activity of NOS was determined by the method described by Bredt and Snyder (1989). In summary, after collection, tissues were homogenized in ice-cold homogenization buffer, which contains 50 mM Tris at pH 7.4, 3.2 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 µg of soy trypsin inhibitor, 2 µg/mL aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. Forty microliters of supernatants were added to 100 µL of assay buffer, which contains 20 mM HEPES, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM BH<sub>4</sub>, 120 µM NADPH and 80,000 cpm <sup>14</sup>C-L-arginine. Samples were then incubated at 37 °C for 15 min. After that, the reaction was stopped by adding 1 mL of ice-cold Dowex, an ionic exchange resin, previously activated with NaOH and diluted in 100 mM HEPES, 10 mM EDTA, at pH 5.5. The resin was removed by 10,000-g centrifugation for 10 min at 4 °C, and 400 µL of supernatant was added to a tube containing 3 mL of scintillation liquid. The amount of <sup>14</sup>C-citrulline was evaluated by β counter. Ten-microliter aliquots of homogenized samples were used to quantify the amount of protein by Bradford's technique (1976).

### **Activity of Heme Oxygenase (HO)**

This technique was standardized in our laboratory according to McNally (2004) and Kutty & Maines (1981). MBH samples were homogenized in buffer containing 50 mM Tris, 20 mM NaCl, 10 mM KCl, 100 µM DTT, 1 mM EDTA, 1% SDS, at pH 7.4. Reaction was performed in 400 µL of reaction buffer, which contains 50 µM hemin, 800 µM NADPH, 2 mM sodium glucose-6-phosphate, 0.2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase and 1 mg of hepatic cytosol [obtained from 1:1 (v/v) homogenization of fresh rat liver in 0.1 M sodium citrate, 10% glycerol, at pH 5, followed by centrifugation at 105,000 g for 20 min. at 4 °C], all of them dissolved in 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 2 mM MgCl<sub>2</sub>, at pH 7.4. Samples were incubated for 1h in the dark at 37 °C and the reaction was stopped by adding 400 µL of trichloromethane. The generated bilirubin was measured in spectrophotometer (A460nm – A530nm) and corrected by the total amount of protein.

### **In vitro protocol**

### **Preparation of primary cultures of hypothalamic astrocytes**

Primary cultures of hypothalamic astrocytes were prepared using a protocol adapted from McCarthy & Vellis (1980) and Gosselin (2010). Briefly, 1-to-2-day-old rat pups were euthanized by rapid decapitation. MBH were dissected from the meninges and collected into sterile plastic plate containing 2 mL of modified Hanks' balanced salt solution (HBSS, without calcium and magnesium [SLBG2926, SAFC]). Tissues were transferred into a tube (C tube, gentleMACS) and dissociated by enzymatic and mechanical processes interspersed three times during 15 min each one. It was used enzymatic mixes from kit neural tissue dissociation [Miltenyi Biotec] and homogenized through gentleMACS dissociator. Tissues were maintained at 37 °C under agitation (Dubnoff shaker, 30 cycles/min; 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Finally, the tissue homogenate was filtered (40 µm, Milipore) with 10 mL of DMEM and centrifuged (1000 rpm, 10 min, 25 °C), the supernatant was discarded and the precipitate resuspended with 2 mL of complete DMEN: supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. The cell suspension was plated onto flasks (T-75) and kept in a 5% CO<sub>2</sub> and 5% H<sub>2</sub>O incubator at 37 °C. Past thirty minutes, these suspended cells were re-plated onto new flasks, this procedure was repeated twice as suggested by Couchman (1983) for fibroblasts removal. Complete medium was changed by half every 2 days, and after 7 or 9 days the astrocyte culture reached a confluent state. Then, flasks were shaken for 2 hours at 200 rpm, at 37 °C to detach microglial, oligodendrocytes and neuronal cells so that astrocytes were split. Adherent astrocytes were rinsed once with phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized in incubator for 15 min. Cells were centrifuged (1000 rpm, 5 min, 25 °C) and the precipitate was resuspended. To determine the number of viable cells present in a cell suspension, it has been used a dye exclusion test such as trypan blue and the cell was counted with a Neubauer chamber. Then, cells were seeded on 6-, 12-, 24- or 96-well plates according to each experiment which generally took place 2 days after the splitting. The enrichment in astrocytes was confirmed by a GFAP (astrocytic marker) immunolabeling > 95% and absent staining for Iba-1(microglial marker) and NeuN (neuronal nuclei marker) (data not shown).

### **Immunolabeling for GFAP and HO-1 or p38 MAPK or p-p38 MAPK**

Astrocytes were seeded at  $5 \cdot 10^4$  cells in 0.5 mL complete DMEN on cell-tak-coated-coverslips 24-well microplates. Before reaching 80% of confluence, the protocol was begun what allowed morphologic observations. The medium was replaced by isotonic or hypertonic DMEN (supplemented with mannitol – 380 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) for 30 min. Astrocytes were

rinsed with Tris-Buffered Saline (TBS) (200 mM Trizma base, 1.37 M NaCl, pH 7.6) and fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Astrocytes were rinsed twice with TBS and incubated with 0.1 M glycine for 5 min, to decrease background staining. Then they were rinsed twice and incubated for 1 h in blocker solution (TBS with 5% normal horse serum [NHS] and 0.3% Triton). Cells were then incubated with solution containing the primary antibodies anti-GFAP (mouse, 1:1000, Sigma #G3893) in combination with anti-HO-1 (rabbit, 1:500, StressGen, #SPA-895) or anti-p38 MAPK (rabbit, 1:50, Cell Signaling #9212) or anti-p-p38 MAPK (rabbit, 1:200, Cell Signaling #9211) in 5% NHS and 0.3% Triton in TBS for 1 hour at room temperature. Astrocytes were rinsed three times with TBS and then a secondary antibody incubation with Alexa-Fluor 594 anti-mouse (donkey, 1:400, Jackson ImmunoResearch, 711-585-152) and Alexa-Fluor 488 anti-rabbit (donkey, 1:400, Molecular Probes, A11055) followed in blocker solution for 1 h at room temperature. The coverslips were rinsed three times with TBS and cells' nuclei were countercolored with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylendole, 15 mM, 1:12500) for 2 min. Next, they were rinsed again and mounted onto glass slides with Vectashield (Vector Laboratories). All images were visualized and photographed under an inverted fluorescent multiphoton microscope (LSM 780 – AxioObserver – ZEISS). Fluorescent images were taken at 40 $\times$  magnification and assembled using ImageJ image-editing software to represent more accurately microscope displays. Although only qualitative images have been shown, five images from three independent cultures (n = 15) were analyzed.

### **Statistical analysis**

The results are expressed as means  $\pm$  standard error (SEM) and were analyzed using Statistica software (StatSoft, USA). Excitability was analyzed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post-hoc test considering the voltage-current slope as the dependent variable and the drug (control, synaptic blockers and synaptic blockers + ZnDPBG or synaptic blockers + CORM-3) and current pulse as the independent variables.  $V_m$ , input resistance and action potential frequency were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test, the measurements were considered dependent variables and the treatments (control, synaptic blockers and synaptic blockers + Zn or synaptic blockers + CORM-3) were considered independent variables. All the other results were analyzed by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test. The measurements were considered dependent

variables, the stimuli (control, 24- or 48-hour water deprivation) and treatments (ZnDPBG, CORM-3 or their vehicles) were considered independent variables. Post-hoc comparisons using the SNK test were only performed when the  $F$ -value showed a significant effect for a single independent variable and/or interaction. The level of significance was set at 5%.

## Results

### **Effects of CO donation or inhibition of central CO formation on hematocrit and plasma protein concentration induced by different periods of water deprivation**

Dehydration induced an increase in hematocrit ( $F_{2,31} = 37.96$ ,  $p < 0.0001$ ) and plasma protein concentration ( $F_{2,32} = 24.38$ ,  $p < 0.0001$ ) of experimental groups submitted to HO inhibition (table 1), this increase was punctually observed in 24- and 48-hour ( $p$ 's  $< 0.01$ ) water-deprived groups for hematocrit and only in 48 WD for plasma protein concentration ( $p < 0.01$ ) which was even higher than that one in animals submitted to the shortest period of dehydration ( $p < 0.05$ ). ZnDPBG treatment had no effect on these parameters.

Concerning CORM-3-treated animals (table 2), both parameters were increased by dehydration (hematocrit:  $F_{2,79} = 46.39$ ,  $p < 0.0001$ ; and, protein:  $F_{2,32} = 24.38$ ,  $p < 0.0001$ ). This increase was significant in the 24 WD ( $p < 0.0001$ , hematocrit;  $p < 0.01$ , protein) and in the 48 WD ( $p < 0.0001$ , hematocrit;  $p < 0.01$ , protein) groups. Concerning the comparison of the two periods of water deprivation, a higher increase was observed in 48 WD hematocrit in comparison to the 24 WD group ( $p < 0.01$ ), but CO donation had no effect on these parameters.

### **Effects of CO donation or inhibition of central CO formation on SON magnocellular neurons passive membrane properties**

The synaptic blockers superfusion had no effect on any passive membrane property analyzed; while, in association with ZnDPBG, it reduced the intrinsic activity ( $F_{2,12} = 7.491$ ,  $p < 0.01$ ) in comparison with control ( $p < 0.05$ ) and synaptic blockers superfusion only ( $p < 0.01$ ) (Figure 1B and 1B1), as well as it reduced both input resistance ( $F_{2,14} = 3.867$ ,  $p < 0.05$ ) in comparison with control superfusion ( $p < 0.05$ ; Figure 1C) and excitability (Treatment\*Current:  $F_{14,83} = 4.448$ ,  $p < 0.0001$ ) in the steps “-35 pA” and “-40 pA” ( $p$ 's  $< 0.05$ ; Figure 1D) and did not alter the membrane resting potential (Figure 1A). Among the

ZnDPBG-treated cells analyzed and phenotyped, we recorded a proportional amount of AVP and OT neurons in accordance with qPCR and immunofluorescence protocols (Figure 3). Regarding CORM-3 treatment, the cells showed no alteration in any parameter analyzed (Figure 2) and they were not phenotyped.

### **Effects of CO donation or inhibition of central CO formation on plasma hormone concentration induced by different periods of water deprivation**

Independently of the animal's water deprivation period, dehydration induced an increment in plasma AVP (ZnDPBG:  $F_{2,84} = 25.27$ ,  $p < 0.0001$ , Figure 4A; CORM-3:  $F_{2,63} = 28.57$ ,  $p < 0.0001$ , Figure 5A) and OT (ZnDPBG:  $F_{2,85} = 12.21$ ,  $p < 0.0001$ , Figure 4B; CORM-3:  $F_{2,71} = 18.51$ ,  $p < 0.0001$ , Figure 5B) while it reduced ANP (Zn:  $F_{2,40} = 20.84$ ,  $p < 0.0001$ , Figure 4C; CORM-3:  $F_{2,29} = 7.199$ ,  $p < 0.01$ , Figure 5C) in both sets of experimental groups. Regarding ZnDPBG experimental groups set, the same increase was observed for AVP and OT in both 24 WD and 48 WD groups ( $p$ 's  $< 0.0001$ ); although 48 WD seemed to be more important to decrease plasma ANP ( $p < 0.001$ ) in comparison to 24 WD ( $p < 0.01$ ), no difference between the groups was observed. In respect of CORM-3 experimental groups set, the same profile described before was observed: both 24 WD and 48 WD groups presented an increase in plasma AVP ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively) and OT ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  respectively) and a decrease in ANP ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively).

Under basal condition, ZnDPBG treatment reduced only plasma OT ( $F_{1,85} = 78.71$ ,  $p < 0.0001$ ), while HO inhibition reduced the water deprivation-induced increase in plasma AVP ( $F_{1,84} = 63.05$ ,  $p < 0.0001$ ) and OT in both 24 WD ( $p$ 's  $< 0.0001$ ) and 48 WD ( $p$ 's  $< 0.0001$ ) groups and showed no effect on ANP.

In control condition, CO donor administration reduced plasma ANP ( $F_{1,29} = 22.14$ ,  $p < 0.0001$ ). On the other hand, CORM-3 injection showed greater effects on 48 WD groups potentiating the increase in both AVP ( $F_{1,63} = 4.626$ ,  $p < 0.05$ ) and OT (Stimulus\*Treatment:  $F_{2,71} = 5.817$ ,  $p < 0.01$ ) induced by water deprivation.

### **Effects of CO donation or inhibition of central CO formation on MBH HO and NOS enzymatic activity induced by different periods of water deprivation**

In general, water restriction induced an increase in HO activity of both sets of experiments (Zn:  $F_{2,34} = 7.718$ ,  $p < 0.01$ ; CORM-3:  $F_{1,34} = 5.3$ ,  $p < 0.05$ ; Figure 6A and



6C) with punctual increases of Zn-48 WD group ( $p < 0.001$  in relation to control and 24-hour dehydrated groups) and CORM-3-24 WD ( $p < 0.05$  in comparison with basal condition). The central inhibition of heme oxygenase induced a decline in the enzymatic activity of every experimental condition ( $p$ 's  $< 0.0001$ ), while CO donation reduced the 24-hour-induced increase in HO activity ( $p < 0.05$ ).

The same profile was observed when it comes to NOS activity, water restriction increased its activity (Zn:  $F_{2,41} = 8.785$ ,  $p < 0.0001$ ; CORM-3:  $F_{2,25} = 9.579$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 6B and 6D) and this increase was evidenced in 48 WD groups of both sets of experiments ( $p$ 's  $< 0.05$ ). ZnDPBG administration decreased NOS activity ( $F_{1, 41} = 19.74$ ,  $p < 0.0001$ ) in both control ( $p < 0.01$ ) and 48-hour dehydration ( $p < 0.05$ ) conditions whereas CORM-3 did not affect this parameter.

#### **Effects of CO donation or inhibition of central CO formation on SON p38 MAPK and p-p38 MAPK content induced by different periods of water deprivation**

In concern with western blotting results, it is possible to observe that dehydration diminished the total SON p38 MAPK amount (Zn:  $F_{2,21} = 18.9$ ,  $p < 0.0001$ ; CORM-3:  $F_{2,20} = 7.41$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 7A and 7B). However, dehydration also induced an increase in the protein phosphorylation proportion of ZnDPBG experimental set ( $F_{2,21} = 5.2$ ,  $p < 0.05$ ; Figure 7B). Regarding CORM-3 experimental set, only treatment increased p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio ( $F_{1,20} = 12.6$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 7D) with an evidenced increase of CORM-3-48 WD group ( $p < 0.05$ ).

#### **Effects of hyperosmolality on GFAP, HO-1, p38 MAPK and p-38 MAPK immunolabeling in hypothalamic astrocytes**

About astrocyte immunolabeling, only qualitative data were obtained from this protocol, showing that 30-minute hyperosmolality stimulus induced an apparent reduction in cell size evidenced by a higher number of astrocytes per analyzed area (Figures 9-A2, 9-B2 and 9-C2). Concerning the target proteins HO-1, p38 MAPK and p-p38 MAPK, the possible alteration is due to the fact that the total p38 MAPK content gets widely spread over the whole astrocyte cytoplasm when these cells are submitted to a higher sodium concentration medium (Figure 9B2).

## Discussion

This study demonstrates for the first time that depending on animal hydration status the hypothalamic sensitivity to carbon monoxide changes, suggesting a possible difference between 24- and 48-hour dehydration protocols and a carbon monoxide time-dependent action indicated by the carbon monoxide content manipulation effects on plasma AVP and OT levels. Moreover, we have shown that the inhibition of CO formation induces alterations on SON magnocellular neurons passive membrane properties in basal situation and on NOS activity in basal and 48 WD; while p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio could be affected by central CO donation in both euhydrated and dehydrated conditions. Furthermore, this report has shown the presence of HO-1, p38 MAPK and its phosphorylated form in MBH astrocytes and also suggests that these proteins could be altered by osmotic stimulus.

SON are homogeneous brain areas composed by vasopressin- and oxytocin-containing magnocellular neurons whose synaptic terminals end in the posterior pituitary. These nuclei are activated in several situations that put the organism in a hydromineral disbalance in consequence of fluid volume and/or composition alterations (Oliet & Bourque, 1992; Antunes-Rodrigues, 2004). When, for example, the animal is exposed to 24-hour dehydration the plasma osmolality increase is detected by peripheral and central (circumventricular organs such as organum vasculosum lamina terminalis – OVLT – and subfornical organ – SFO) receptors (Verbalis, 2007), or, still, by magnocellular neurons themselves (Bourque, 2008).

The electrophysiological data obtained in this study demonstrate that CO is involved in the basal control of SON neurons activity since the inhibition of CO production induced a decrease in input resistance, excitability and action potential frequency (firing rate) independently of the presence of synaptic blockers, suggesting a direct stimulatory role for this gas in these neurons under control conditions. Indeed, a study has already demonstrated that in animals submitted to 48-hour dehydration the superfusion with 30  $\mu$ M CrMP (HO inhibitor) induced a decrease in firing rate, and magnocellular neurons hyperpolarization whereas no effect was observed in control animals (Reis, 2012). We have observed this effect in hydrated animals which could explain the plasma OT concentration of ZnDBPG-treated control group.

Since we have found only a plasma OT decrease in ZnDPBG-treated euhydrated animals, we proposed a possible phenotype-dependent action of carbon monoxide in this condition inasmuch as it is already proposed that AVP- and OT-containing neurons can respond differently to the same condition (Roberts, 1993; Konopacka, 2015). To evaluate that,

we phenotyped the recorded neurons and obtained proportional amounts of recorded vasopressinergic and oxytocinergic neurons that showed the same response profile which, in turn, denies this hypothesis.

Regarding hormonal data obtained, it is already known that in water deprivation, it is observed an absolute thirst state which means that both extra- (ECF) and intracellular (ICF) fluids are diminished. In general, this situation is reflected in the hematocrit and plasma protein levels showed in this study as a result of decreased extracellular volume leading to a higher volume percentage occupied by blood cells and a higher amount of protein in a same volume of plasma (Kutscher, 1971; Coletti, 2015).

Among endocrine responses triggered by dehydration, it is the central AVP and OT secretion by neurohypophysis, and peripherally, ANP by heart. It is already been discussed in literature that oxytocin, which has a potent natriuretic effect in rodent, has its secretion augmented during exposition to water restriction (Huang, Lee, Sjoquist, 1995), and plays a role in inducing natriuresis and kaliuresis whereas inhibiting sodium intake (Antunes-Rodrigues, 2005). Despite volume loss, which should inhibit OT secretion, the fluid hyperosmolality in this situation is the preponderant factor to be corrected. In this way, this study is in accordance with previous works since both 24- and 48-hour water deprivation increased plasma OT. Besides hyperosmolality, the main stimulus to induce AVP secretion; hypovolemia settled in dehydrated animals induces additional increase in the release of this anti-diuretic hormone (Dunn, 1973). The levels of AVP demonstrated in this study are corroborated by literature. Still, as expected, plasma ANP concentration is reduced in order to cope the water deprivation-induced hypovolemia (Zongazo, 1992) in both 24-h and 48-h water restriction groups, while central CO donation or heme-oxygenase inhibition had no effect on this parameter which is plausible since the plasma ANP measured is a peripheral hormone and must be not affected by a central drug administration that has a local action.

Some evidences about CO modulation on AVP and OT has emerged, Gomes and coworkers (2010) demonstrated that, in hypothalamic explants exposed to hyperosmolality, the medium OT concentration is increased, which is reversed by the addition of an HO inhibitor to the pre-incubation medium. Moreover, Reis and coworkers (2012) observed that in rats submitted to 48 hours of water restriction there is a rise in HO-1 expression as well as in its co-localization with OT and AVP in both SON and PVN. Some other authors showed that hemin addition (CO precursor) to the incubation medium reversed the KCl-induced AVP and OT increase (Kostoglou-Athanassiou, 1996; Mancuso, 1997). Still, the addition of ZnPP IX (another inespecific HO inhibitor) to the hypothalamic explants incubation medium

increased LPS-decreased AVP secretion (Kostoglou-Athanassiou,1998). In vivo experiments also showed that icv administration of ZnDPBG (in the same dose used in this current report) potentialized LPS-induced increase in plasma OT and AVP (Giusti-Paiva, 2005). Together, these data rise more questions since, due to many different protocols, approaches and techniques used to explore the effect of CO content manipulation on neuroendocrine responses, the proper modulation of this gas over OT and AVP release remains to be determined but, one thing is stated: CO has a modulatory effect on both control and dehydrated animals' plasma AVP and OT concentration.

Thus, one way to solve this deadlock was to investigate the CO possible targets in these magnocellular neurons, that is, by which pathway CO content manipulation is affecting the hormone release. To that, we looked at two possible ways already described in literature: interaction of CO/HO and NO/NOS systems and p38 MAPK intracellular pathway signalling and tried to observe how these pathways were affected by different times of water deprivation and central CO content manipulation.

Regarding NO system, it is already supposed that nitric oxide plays as inhibitory action in neurohypophysial hormones release by activating sGC or by protein S-nitrosylation (Summy-Long, 1993; Da Silva, 2014). White and Marletta (1992) identified inhibition of NOS activity when HEK cells were exposed a CO high-concentrated air mixture (80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub>). Some works performed by our group suggest that, at least in vitro, CO may interacts with NO system, inhibiting its enzymatic activity resulting in the potentialization of hyperosmolarity-induced OT and ANP secretion by medial basal hypothalamus (MBH) (Gomes, 2004; Gomes, 2010). Reis and coworkers (2012; 2015) showed that HO-1 and neuronal isoform of NOS (nNOS) expression in SON and PVN is increased in vasopressin and oxytocin magnocellular neurons of 48-hour water-deprived rats; furthermore, it was observed that action potential frequency is reduced in rats submitted to the same stimulus and this effect was potentiated by heme oxygenase inhibition and the pre-treatment with a nNOS inhibitor blunted this response.

However, some unpublished results (Lima, unpublished data) showed that central CO formation is necessary to proper behavioral, hormonal and neuronal responses in a dehydration shorter time (24 hours) but no change was observed in HO-1 expression (regarding neither the protein nor mRNA) while the inhibition of CO formation did not alter NOS activity and MBH nitrate content in 24 WD group, besides it was demonstrated a rise in SON nNOS mRNA expression of rats submitted to 24 hours of water restriction, whereas the increase in HO-1 mRNA was observed only in 48 WD group and no further elevation was

observed on nNOS. Together these findings suggest CO could act independently of NO system during 24-hour water deprivation as long as we do not discard the possibility that this interaction occurs in a dehydration-extended period which has already been speculated in the literature (Kostoglou-Athanassiou, 1998) providing a possible time-dependent profile to CO-NO interactions here evidenced by the increase in their enzymatic activities and by the fact the HO inhibition diminished the 48-hour dehydration-induced NOS activity. This reduction in NOS activity, on the contrary to what is on literature, may be due to the experimental design since our data are the first ones to analyze this parameter *in vivo*, instead of *ex vivo* or *in vitro* data from previous works.

Another potential target evaluated in this study was p38 MAPK protein. The hypothesis that osmotic shock could induce p38 MAPK increase (Han, 1994; Uhlik; 2003) is not in accordance with our findings considering that we observed the opposite effect in our study, which is possible since, when p38 MAPK is phosphorylated, it forms a complex that goes to the nucleus where it acts as a transcription factor (Chi, 2015). As mentioned in material and methods section, we used Tris-HCl buffer to lyse the samples which is proper to cytoplasmatic proteins (Abcam, 2016) corroborating our findings that decreased their contents.

Literature has already confirmed the relation between CO and p38 MAPK in several experimental conditions involving lung, liver and endothelial cells research, and in all of these situations CO seems to induce p38 MAPK phosphorylation providing a protective effect in relation to the stimulus on these works (Amersi, 2002; Zhang, 2005; Kohmoto, 2007), our findings are in agreement with these previous observations since we have demonstrated that independently of animal hydration state the treatment with CORM-3 favored the protein phosphorylation ratio with a prominent effect in 48 WD group which suggests that in the longest period of water restriction the SON is more sensitive to CO.

Furthermore, it has been discussed the participation of other neural cells in the regulation of central nervous system activity, such as astrocytes. These cells are no longer considered just support cells, they actually have a crucial role in synapsis regulation and neuronal activity, and they are being nominated as the third synaptic element (Araque, 1999; Theodosis, 2008). Previous work has already demonstrated that HO-2 is constitutively expressed in astrocytes (Scapagnini, 2002) and also that the HO-1 can be induced by different stimuli in these cells (Dwyer, 1995; Imuta, 2007). Moreover, CO produced in astrocytes could act on neurons in order to prevent neuronal death (Queiroga, 2016); in fact, the astrocyte-produced CO could act in the astrocytes themselves inducing the phosphorylation of p38

MAPK (Chi, 2015) and, in last instance alter the gene expression in these cells. So, we hypothesized that hyperosmotic stimulus could induce HO-1 in astrocytes and the CO produced then could affect the expression of p38 MAPK as well as induces its phosphorylation in these cells. We observed the presence of HO-1, p38 MAPK and p-p38 MAPK in astrocytes in both basal and hyperosmotic conditions, also the cells looked smaller under stimulus and the p38 MAPK and p-p38 MAPK distribution seemed to change but no conclusive data were obtained since we had only qualitative results.

Together these results suggest differences between one- and two-day water deprivation protocols since the targets that we analyzed, NOS activity and p38 MAPK, were changed by ZnDBPG or CORM-3 in 48 WD groups, however the final response to dehydration, which we can consider the plasma hormone concentration, is altered by the HO inhibition even in the 24 WD group, so it seems that CO can act in distinct ways in these protocols to reach the same final response. Also, we observed that CO donation had no opposite effect to HO inhibition as it would be expected; in this manner, we need to look at others byproducts of HO enzymatic activity, such as ferric iron which immediately binds to ferritin and biliverdin which is promptly converted into bilirubin (Mancuso, 2006), which could act on these responses observed in this study; so, more investigation into CO/HO system is required to elucidate the processes that are acting in SON magnocellular neurons during distinct hydration status.

In conclusion, the results reiterates the CO role as regulatory molecule in the hydromineral balance where it could maybe act by p38 MAPK phosphorylation and NOS activity in a water restriction longer period, while the pathways that are involved in a shorter period of dehydration or control conditions remains to be elucidated as well.

#### References

1. Abcam: Protocols - Sample preparation for western blotting. c1998–2017. Abcam plc; [accessed 2016 Dec 14]. <http://www.abcam.com>
2. Amersi, F.; Shen, X.D.; Anselmo, D.; Melinek, J.; Iyer, S.; Southard, D.J.; Katori, M., Volk, H.D.; Busuttill, R.W.; Buelow, R.; Kupiec-Weglinski, J.W. Ex Vivo Exposure to Carbon Monoxide Prevents Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury Through p38 MAP Kinase Pathway. **Hepatology**, v. 35, p. 815-823, 2002.
3. Antunes-Rodrigues, J.; De Castro, M.; Elias, L.L.; Valenca, M.M.; Mccann, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, jan. 2004.

4. Antunes-Rodrigues, J.; Picanço-Diniz, D.L.W.; Valença, M.M.; Mccan, S.M. Controle Neuroendócrino da Homeostase dos Fluidos Corporais. In: Antunes-Rodrigues, J.; Moreira, A.C.; Elias, L.L.K.; Castro, M. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 81-115, 2005.
5. Araque, A.; Parpura, V.; Sanzgiri, R.P.; Haydon, P.G.; Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**.v. 22, n. 5, p. 208-215, 1999.
6. Arima, H.; Yamamoto, N.; Sobue, K.; Umenishi, F.; Tada, T.; Katsuya, H.; Asai, K. Hyperosmolar Mannitol Stimulates Expression of Aquaporins 4 and 9 through a p38 Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway in Rat Astrocytes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 45,p. 44525–44534, 2003.
7. Barinaga, M. Carbon monoxide: killer to brain messenger in one step. **Science**, v. 259, n. 5093, p. 309, 1993.
8. Bastos, R.; Favaretto, A.L.; Gutkowska, J.; McCann, S.M.; Antunes-Rodrigues, J. Alpha-adrenergic agonists inhibit the dipsogenic effect of angiotensin II by their stimulation of atrial natriureti peptide release. **Brain Res**, v. 895, n. 1-2, p. 80-8, 2001.
9. Bourque, C.W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008.
10. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
11. Bredt, D.S.; Snyder, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 22, p. 9030-9033, 1989.
12. Bredt, D.S.; Hwang, P.M.; Snyder, S.H. Localization of Nitric Oxide Synthase Indicating a Neural Role for Nitric Oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-70, 1990.
13. Bu, X.; Huang, P.; Qi, Z.; Zhang, N.; Han, S.; Fang, L.; Li, J. Cell type-specific activation of p38 MAPK in the brain regions of hypoxic preconditioned mice. **Neurochem Int**, v.51, p. 459–66, 2007.
14. Chi, Pei-Ling; Lin, Chih-Chung; Chen, Yu-Wen; Hsiao, Li-Der; Yang, Chuen-Mao. CO Induces Nrf2-Dependent Heme Oxygenase-1 Transcription by Cooperating with Sp1 and c-Jun in Rat Brain Astrocytes. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 1, p. 277-292, ago 2015.

15. Coletti, R.; Almeida-Pereira, G.; Elias, L.L.K.; Antunes-Rodrigues, J. Effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on water intake and vasopressin and oxytocin secretion induced by fluid deprivation. **Horm Behav**, v. 67, p. 12-20, 2015.
16. Couchman, J.R.; Höök, M.; Rees, D.A.; Timpl, R., 1983. Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. **J Cell Biol**, v. 96, n. 1, p. 177-83, 1983
17. Cunningham, J. T.; Penny, M. L.; Murphy, D. Cardiovascular regulation of supraoptic neurons in the rat: synaptic inputs and cellular signals. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 84, n. 2-3, p. 183-96, 2004.
18. Da Silva, M.P.; Cedraz-Mercez, P.L.; Varanda, W.A. Effects of nitric oxide on magnocellular neurons of the supraoptic nucleus involve multiple mechanisms. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 2, p. 90-100, 2014.
19. Da Silva, M.P.; Merino, R.M.; Mecawi, A.S.; Moraes, D.J.; Varanda, W.A. In vitro differentiation between oxytocin- and vasopressin-secreting magnocellular neurons requires more than one experimental criterion. **Mol Cell Endocrinol**, v. 400, p. 102-11, 2015.
20. Dunn, F.L.; Brennan, T.J.; Nelson, A.E.; Robertson, G.L. The Role of Blood Osmolality and Volume in Regulating Vasopressin Secretion in the Rat. **J Clin Invest**, v. 52, p. 3212-19, 1973.
21. Dwyer, B.E.; Nishimura, R.N.; Lu, Shi-Yi. Differential expression of heme oxygenase-1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody. Response to oxidative stress. **Mol Brain Res**, v. 30, p. 37-47, 1995
22. Giusti-Paiva, A.; Elias, L. L.; Antunes-Rodrigues, J. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neurosci Lett**, v. 381, n. 3, p. 320-324, 2005.
23. Gomes, D. A.; Reis, W. L.; Ventura, R. R.; Giusti-Paiva, A.; Elias, L. L.; Cunha, F. Q.; Antunes-Rodrigues, J. The role of carbon monoxide and nitric oxide in hyperosmolality-induced atrial natriuretic peptide release by hypothalamus in vitro. **Brain Res**, v. 1016, n. 1, p. 33-39, 2004.
24. Gomes, Dayane A.; Giusti- Paiva, A.; Ventura, Renato R.; Elias, Lucila Leico K.; Cunha, Fernando Q.; Antunes- Rodrigues, J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 5, p. 351-357, 2010.



25. Gosselin, R.D.; O'Connor, R.M.; Tramullas, M.; Julio-Pieper, M.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Riluzole normalizes early-life stress-induced visceral hypersensitivity in rats: role of spinal glutamate reuptake mechanisms. **Gastroenterology**, v. 138, n. 7, p. 2418-25, 2010.
26. Gutkowska, J.; Thibault, G.; Milne, R.W.; Januszewicz, P.; Schiller, P.W.; Cantin, M.; Genest, J. Radioimmunoassay of atrial natriuretic factor (ANF) in rat atria. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 176, n. 2, p. 105-8, 1984.
27. Haanwinckel, M.A.; Elias, L.K.; Favaretto, A.L.; Gutkowska, J.; McCann, S.M.; Antunes-Rodrigues, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 17, p. 7902-6, 1995.
28. Han, J.; Lee, J.D.; Bibbs, L.; Ulevitch, R.J. A MAP Kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 265, p. 808-811, 1994.
29. Huang, W.; Lee, S. L.; Sjoquist, M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. **Am J Physiol**, v. 268, n. 3 Pt 2, p. R634-640, 1995.
30. Hussain, M.K.; Fernando, N.; Shapiro, M.; Kagan, A.; Glick, S.M. Radioimmunoassay of arginine vasopressin in humans' plasma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 37, n. 4, p. 616-25, 1973.
31. Imuta, N.; Hori, O.; Kitao, Y.; Tabata, Y.; Yoshimoto, T.; Matsuyama, T.; Ogawa, S. Hypoxia-Mediated Induction of Heme Oxygenase Type I and Carbon Monoxide Release from Astrocytes Protects Nearby Cerebral Neurons from Hypoxia-Mediated Apoptosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 5, p. 543-52, 2007.
32. Kadowaki, K.; Kishimoto, J.; Leng, G.; Emson, P.E. Up-Regulation of Nitric Oxide Synthase (NOS) Gene Expression Together with NOS Activity in the Rat Hypothalamo-Hypophysial System after Chronic Salt Loading: Evidence of a Neuromodulatory Role of Nitric Oxide in Arginine Vasopressin and Oxytocin Secretion. **Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 1011-17, 1994.
33. Kohmoto J.; Nakao. A.; Stolz, D.B.; Kaizu, T.; Tsung, A.; Ikeda, A.; Shimizu, H.; Takahashi, T.; Tomiyama, K.; Sugimoto, R.; Choi, A.M.K.; Billiar, T.R.; Murase N.; Mccurry, K.R. Carbon Monoxide Protects Rat Lung Transplants From Ischemia-Reperfusion Injury via a Mechanism Involving p38 MAPK Pathway. **Am J Transp**, v. 7, p. 2279-2290, 2007.

34. Konopacka, A.; Qiu, J; Yao, S.T.; Greenwood, M.P.; Greenwood, M.; Lancaster, T.; Inoue, W.; Mecawi, A.S.; Vechiato, F.M.V.; Lima, J.B.M.; Coletti, R.; Hoe, S.Z.; Martin, A.; Lee, J.; Joseph, M.; Hindmarch, C.; Paton, J.; Antunes-Rodrigues, J.; Bains, J.; Murphy, D. Osmoregulation Requires Brain Expression of the Renal Na-K-2Cl Cotransporter NKCC2. **J Neurosci**, v. 35, n. 13, p. 5144-5155, 2015.
35. Kostoglou-Athanassiou, I.; Forsling, M.L.; Navarra, P.; Grossman, A.B. Oxytocin release is inhibited by the generation of carbon monoxide from the rat hypothalamus--further evidence for carbon monoxide as a neuromodulator. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 42, n. 2, p. 301-306, 1996.
36. Kostoglou-Athanassiou, I.; Costa, A.; Navarra, P.; Nappi, G.; Forsling, M.L.; Grossman, A.B. Endotoxin stimulates an endogenous pathway regulating corticotropin-releasing hormone and vasopressin release involving the generation of nitric oxide and carbon monoxide. **J Neuroimmunol**, v. 86, n. 1, p. 104-109, 1998.
37. Kutscher, C.L. Hematocrit, plasma osmolality, and plasma protein concentration as estimators of plasma volume in hooded rats during food and water deprivation. **Physiol Behav**, v. 7, n. 2, p. 283-285, 1971
38. Kutty, R.K.; Maines, M.D. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 256, n. 8, p. 3956-3962, 1981.
39. Maines, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 517-554, 1997.
40. Mancuso, C.; Kostoglou-Athanassiou, I.; Forsling, M.L.; Grossman, A.B.; Preziosi, P.; Navarra, P.; Minotti, G. Activation of heme oxygenase and consequent carbon monoxide formation inhibits the release of arginine vasopressin from rat hypothalamic explants. Molecular linkage between heme catabolism and neuroendocrine function. **Molecular Brain Research**, v. 50, n. 1-2, p. 267-276, 1997.
41. Mancuso, C.; Perluigi, M.; Cini, C.; Marco, C.D.; Stella, A.M.G.; Calabrese, V. Heme Oxygenase and Cyclooxygenase in the Central Nervous System: A Functional Interplay. **J Neurosci Res**, v. 84, p. 1385-91, 2006.
42. Mccann, S. M.; Gutkowska, J.; Franci, C. R., Favaretto, A. L.; Antunes-Rodrigues, T. Hypothalamic control of water and salt intake and excretion. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 4, p. 865-84, 1994

43. McCann, S. M.; Gutkowska, J.; Antunes-Rodrigues, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 165-81, 2003.
44. McCarthy, K.D.; de Vellis, J.; Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. **J Cell Biol**, v. 85, n.3, p. 890-902, 1980.
45. McNally, S.J.; Ross, J.A.; James-Garden, O.; Wigmore, S.J. Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity. **Anal Biochem**, v. 332, n. 2, p. 398-400, 2004.
46. Oliet S.H.; Bourque, C.W. Properties of supraoptic magnocellular neurones isolated from the adult rat. **J Physiol**, v. 455, p. 291-306, 1992.
47. Paxinos, G.; Watson, C. The Rat Brain in Steriotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego, USA, 2004.
48. Queiroga, C.S.F.; Alves, R.M.A.; Conde, S.V.; Alves, P.M.; Vieira, H.L.A. Paracrine effect of carbon monoxide - astrocytes promote neuroprotection through purinergic signaling. **J Cell Sci**, v. 129, n. 16, p. 3178-88, 2016.
49. Raub, J.A.; Mathieu-Nolf, M.; Hampson, N.B.; Thom, S.R. Carbon monoxide poisoning--a public health perspective. **Toxicology**, v. 145, n. 1, p. 1-14, 2000.
50. Reis, W.L.; Biancardi, V.C.; Son, S.; Antunes-Rodrigues, J.; Stern, J.E. Enhanced expression of heme oxygenase-1 and carbon monoxide excitatory effects in oxytocin and vasopressin neurones during water deprivation. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 4, p. 653-663, 2012.
51. Reis, W.L.; Biancardi, V.C.; Son, S.; Antunes-Rodrigues, J.; Stern, J.E. Carbon Monoxide and Nitric Oxide interactions in Magnocellular Neurosecretory Neurones during Water Deprivation. **J Neuroendocrinol**, v. 27, n. 4, p. 111-22, 2015.
52. Roberts, M.M.; Robinson, A.G.; Fitzsimmons, M.D.; Grant, F.; Lee, Wen-Sen.; Hoffman, G.E. *c-fos* Expression in Vasopressin and Oxytocin Neurons Reveals Functional Heterogeneity within Magnocellular Neurons. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 388-400, 1993.
53. Robertson, G. Regulation of vasopressin release .In, **The Kidney: Physiology and Patophysiology**, 2<sup>nd</sup> ed, New York: Raven Press, 1595-1613, 1992.
54. Ruginsk, S.G.; Mecawi, A.S., Da Silva, M.P.; Reis, W.L.; Coletti, R.; Lima, J.B.M.; Elias, L.L.; Antunes-Rodrigues, J. Gaseous modulators in the control of

- the hypothalamic neurohypophyseal system. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 2, p. 127-38, 2015.
55. Scapagnini, G.; D'Agata, V.; Calabrese, V.; Pascale, A.; Colombrita, C.; Alkon, D.; Cavallaro, S. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. **Brain Res**, v. 954, p. 51-9, 2002.
56. Stern, J.E.; Ludwig, M. NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 6, p. 1815-22, 2001.
57. Summy-Long, J.Y.; Bui, V.; Mantz, S.; Koehler, E.; Weisz, J.; Kadekaro, M. Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration. **Neurosci Lett**, v. 152, n. 1-2, p. 190-193, 1993.
58. Takeda, K.; Ichijo, I. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. **Genes to Cells**, v. 7, p. 1099-1111, 2002.
59. Theodosis, D.T.; Poulain, D.A. 2008, Oliet, S.H.R. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. **Physiol Rev**, v. 88, p. 983-1008, 2008.
60. Verbalis, J.G. How does the brain sense osmolality? **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 12, p. 3056-3059, 2007.
61. Verma, A.; Hirsch, D.J.; Glatt, C.E.; Ronnett, G.V.; Snyder, S.H. Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science**, v. 259, n. 5093, p. 381-384, 1993.
62. Villar, M.J.; Ceccatelli, S.; Ronnqvist, M.; Hokfelt, T. Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. **Brain Res**, v. 644, n. 2, p. 273-81, 1994.
63. Vincent, S.R.; Kimura, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-84, 1992.
64. Vincent, S.R.; Das, S.; Maines, M.D. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 223-231, 1994.
65. Volti, G.L.; Ientile, R.; Abraham, N.G.; Vanella, A.; Cannavò, G.; Mazza, F.; Currò, M.; Raciti, G.; Avola, R.; Campisi, A. Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary cell cultures during

- differentiation: effect of glutamate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 315, p. 517-24, 2004.
66. Wei, Shun-Guang.; Yu, Y.; Zhang, Zhi-Hua.; Felder, R.B. Angiotensin II upregulates hypothalamic AT<sub>1</sub> receptor expression in rats via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, p. 2009
67. White, K.A.; Marletta, M.A. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. **Biochemistry**, v. 31, n. 29, p. 6627-6631, 1992.
68. Wilkinson, W.J.; Kemp, P.J. The carbon monoxide donor, CORM-2, is an antagonist of ATP-gated, human P2X<sub>4</sub> receptors. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 1, p. 57-64, 2011.
69. Wu, L.; Wang, R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 585-630, 2005.
70. Zhang, X.; Shan, P.; Alam, J.; Fu, X.Y.; Lee, P.J. Carbon monoxide differentially modulates stat1 and stat3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/akt and p38 kinase-dependent stat3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. **J Biol Chem**, v. 280, n. 10, p. 8714-8721, 2005.
71. Zongazo, M.A.; Carayon, A.; Masson, F.; Isnard, R.; Eurin, J.; Maistre, G.; Barthélemy, C., Prost, A.C.; Legrand, J.C. Atrial natriuretic peptide during water deprivation or hemorrhage in rats. Relationship with arginine vasipressin and osmolarity. **J Physiol**, v. 86, p. 167-75, 1992.

### Figures and Tables subtitles

**Table 1.** Effects of ZnDPBG (50 mM/4 µL) or vehicle (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4 µL) intracerebroventricular injection on hematocrit and plasma protein concentration of animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones. Values are expressed as mean ± SEM. \*\* p < 0.01 when compared to control group; # p < 0.05 when compared to 24 WD group. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post-hoc test.

**Table 2.** Effects of CORM-3 (100 µM/4 µL) or vehicle (CORM-3Inactivated 100 µM/4 µL) intracerebroventricular injection on hematocrit and plasma protein concentration of

animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  when compared to control group, ##  $p < 0.01$  when compared to 24 WD group. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post hoc test.

**Figure 1.** Effects of aCSF, synaptic blockers (DNQX, 10  $\mu$ M; D-AP5, 30  $\mu$ M; PICRO, 30  $\mu$ M) or synaptic blockers and ZnDPBG (30  $\mu$ M) superfusion on SON magnocellular neurons passive membrane properties: resting potential (A), action potential frequency (B), input resistance (C) and excitability (D). B1 demonstrates representative traces obtained during the analysis of action potential frequency (B). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  when compared to control group; ##  $p < 0.01$  when compared to synaptic blockers-submitted group. In A, B and C, the results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test. The results showed in D were analyzed by repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post-hoc test.

**Figure 2.** Effects of aCSF, synaptic blockers (DNQX, 10  $\mu$ M; D-AP5, 30  $\mu$ M; PICRO, 30  $\mu$ M) or synaptic blockers and CORM-3 (30  $\mu$ M) superfusion on SON magnocellular neurons passive membrane properties: resting potential (A), action potential frequency (B), input resistance (C) and excitability (D). B1 demonstrates representative traces obtained during the analysis of action potential frequency (B). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. In A, B and C, the results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test. The results showed in D were analyzed by repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post-hoc test.

**Figure 3.** SON magnocellular neurons phenotype characterization by immunofluorescence. Representative immunofluorescent photomicrographs of two recircled neurons identified as vasopressinergic (A1 a A4) and oxytocinergic (B1 a B4). The patch pipettes were filled with biocytin and visualized by streptavidin in blue (A1 and B1). Vasopressin-immunoreactive neuron is labeled in green (A2 and B2) while oxytocin-immunoreactive neuron is labeled in red (A3 and B3). The phenotypes were identified by co-localization of biocytin with the peptide (A4 and B4).

**Figure 4.** Effect of ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) or vehicle (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) on plasma vasopressin (A), oxytocin (B) and atrial natriuretic peptide (C) concentration of animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.01 and \*\*\*\* p < 0.0001 when compared to euhydrated animals (control); # p < 0.05 and ##### p < 0.0001 compared to vehicle-treated animals. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 5.** Effect of CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) or vehicle (CORM-3Inactivated 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) on plasma vasopressin (A), oxytocin (B) and atrial natriuretic peptide (C) concentration of animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01 when compared to euhydrated animals (control); ## p < 0.01 when compared to vehicle-treated animals. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 6.** Effect of ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) or its vehicle (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) (A; B) and CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) or its vehicle (CORM-3Inactivated 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) (C; D) on MBH heme oxygenase (A; C) and nitric oxide synthase (B; D) enzymatic activity of animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.05 and \*\*\* p < 0.001 when compared to euhydrated animals (control); # p < 0.05, ## p < 0.01 and ##### p < 0.0001 when compared to vehicle-treated animals; ++++ p < 0.0001 compared to respective group submitted to 24-hour water deprivation. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 7.** Effect of ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) or its vehicle (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) (A; C) and CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) or its vehicle (CORM-3Inactivated 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) (B; D) on SON p38 MAPK (A; C) and p-p38 MAPK/ p38 MAPK (B; D) of animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. # p < 0.05 when compared to vehicle-treated animals. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 8.** Effect of ZnDPBG (50 mM/ 4 $\mu$ L) or its vehicle (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM/ 4  $\mu$ L) and CORM-3 (100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) or its vehicle (CORM-3Inactivated 100  $\mu$ M/4  $\mu$ L) on SON p38 MAPK and p-p38 MAPK protein expression of animals subjected to 24 (24 WD) or 48 (48 WD) hours of water deprivation or euhydrated (control group) ones.

**Figure 9.** Representative immunofluorescent photomicrographs of hypothalamic astrocytes in control (A1; B1 e C1) or 30-minute hyperosmotic (A2; B2; C2) condition. DAPI is stained in blue, GFAP in red, HO-1 (A1 e A2), p38 MAPK (B1 e B2) and p-p38 MAPK (C1 e C2) are stained in green. 40 $\times$  magnification.



Plasma Parameter	Control		24 WD		48 WD		Euhydration vs. Dehydration
	Vehicle	ZnDPBG	Vehicle	ZnDPBG	Vehicle	ZnDPBG	
<b>Hematocrit (%)</b>	41.65 ± 1.5	39.20 ± 0.75	47.82 ± 0.68**	50.59 ± 1.21	53.11 ± 1.24**	53.33 ± 1.52	F <sub>2,31</sub> = 37.96, <i>p</i> < 0.0001
<b>Protein (g/dL)</b>	6.30 ± 0.04	6.68 ± 0.08	7.13 ± 0.06	7.31 ± 0.11	8.16 ± 0.40**:#	8.72 ± 0.37	F <sub>2,32</sub> = 24.38, <i>p</i> < 0.0001

Table 1

Plasma Parameter	Control		24 WD		48 WD		Euhydration vs. Dehydration
	Vehicle	CORM-3	Vehicle	CORM-3	Vehicle	CORM-3	
<b>Hematocrit (%)</b>	44.36 ± 1.00	44.63 ± 1.05	50.91 ± 1.26****	49.38 ± 0.71	55.18 ± 1.02****;##	52.77 ± 0.80	F <sub>2,79</sub> = 46.39, <i>p</i> < 0.0001
<b>Protein (g/dL)</b>	4.18 ± 0.18	4.30 ± 0.14	5.18 ± 0.24**	4.88 ± 0.17	5.08 ± 0.18**	5.27 ± 0.20	F <sub>2,32</sub> = 24.38, <i>p</i> < 0.0001

Table 2

Figure 1

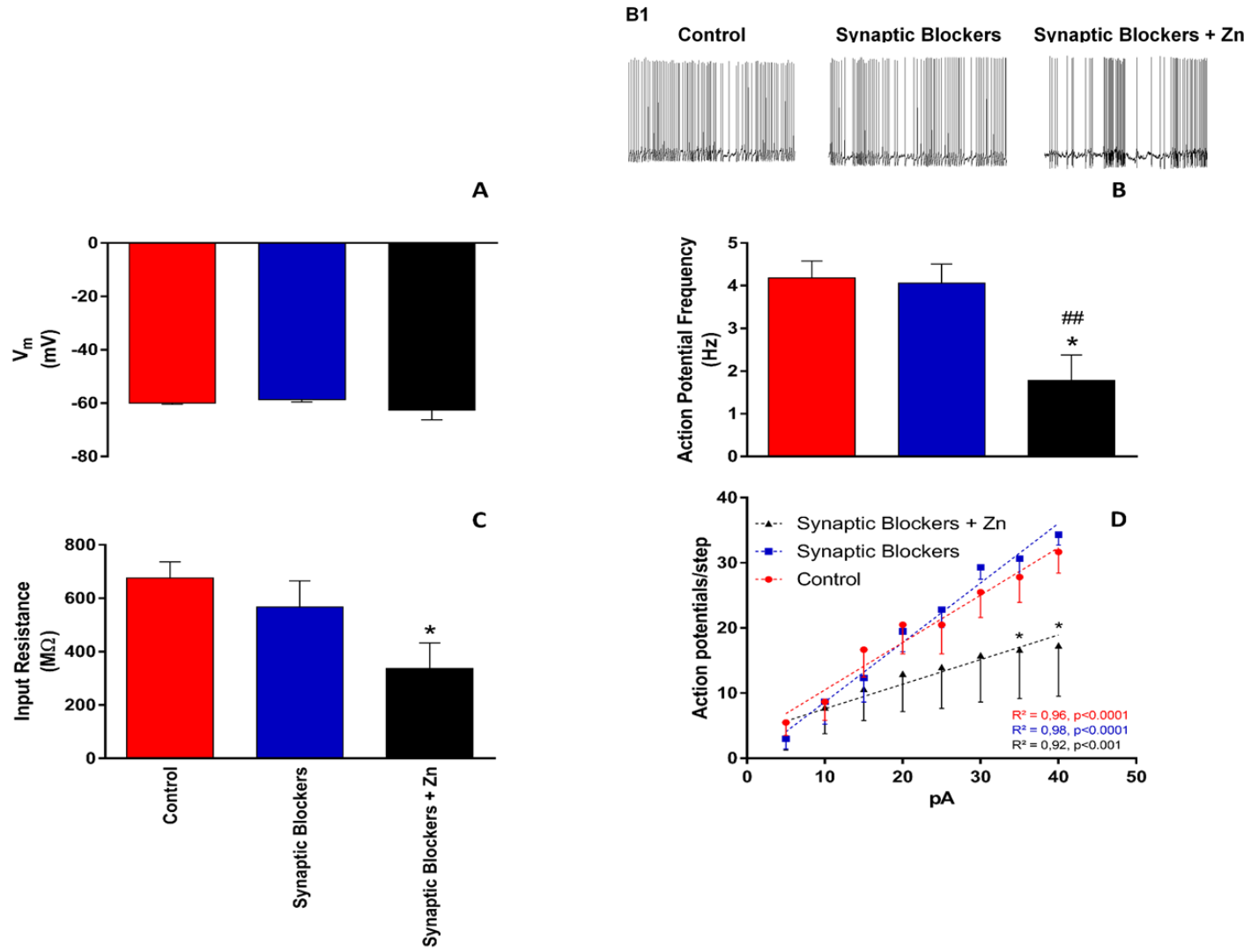


Figure 2

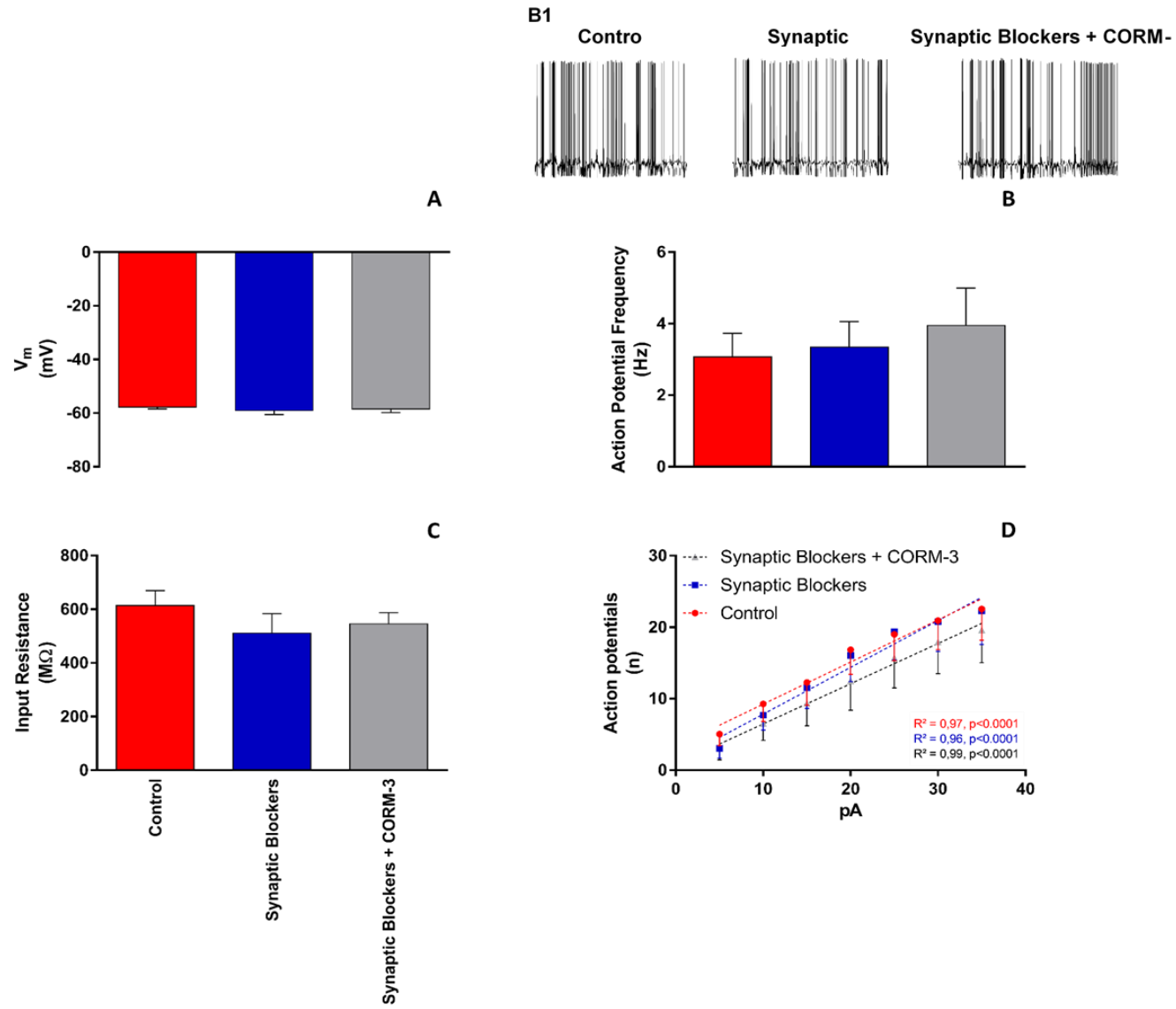


Figure 3

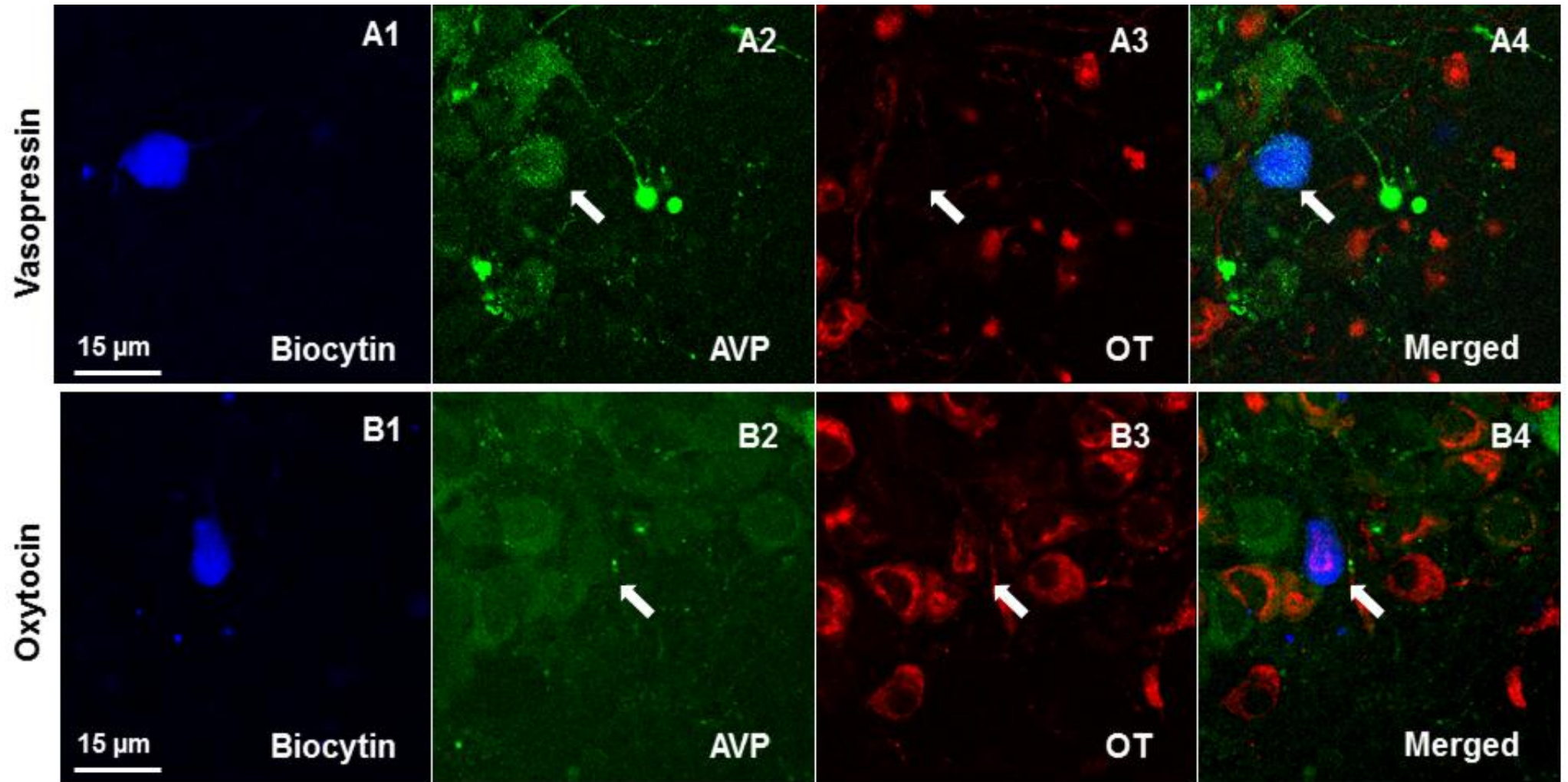


Figure 4

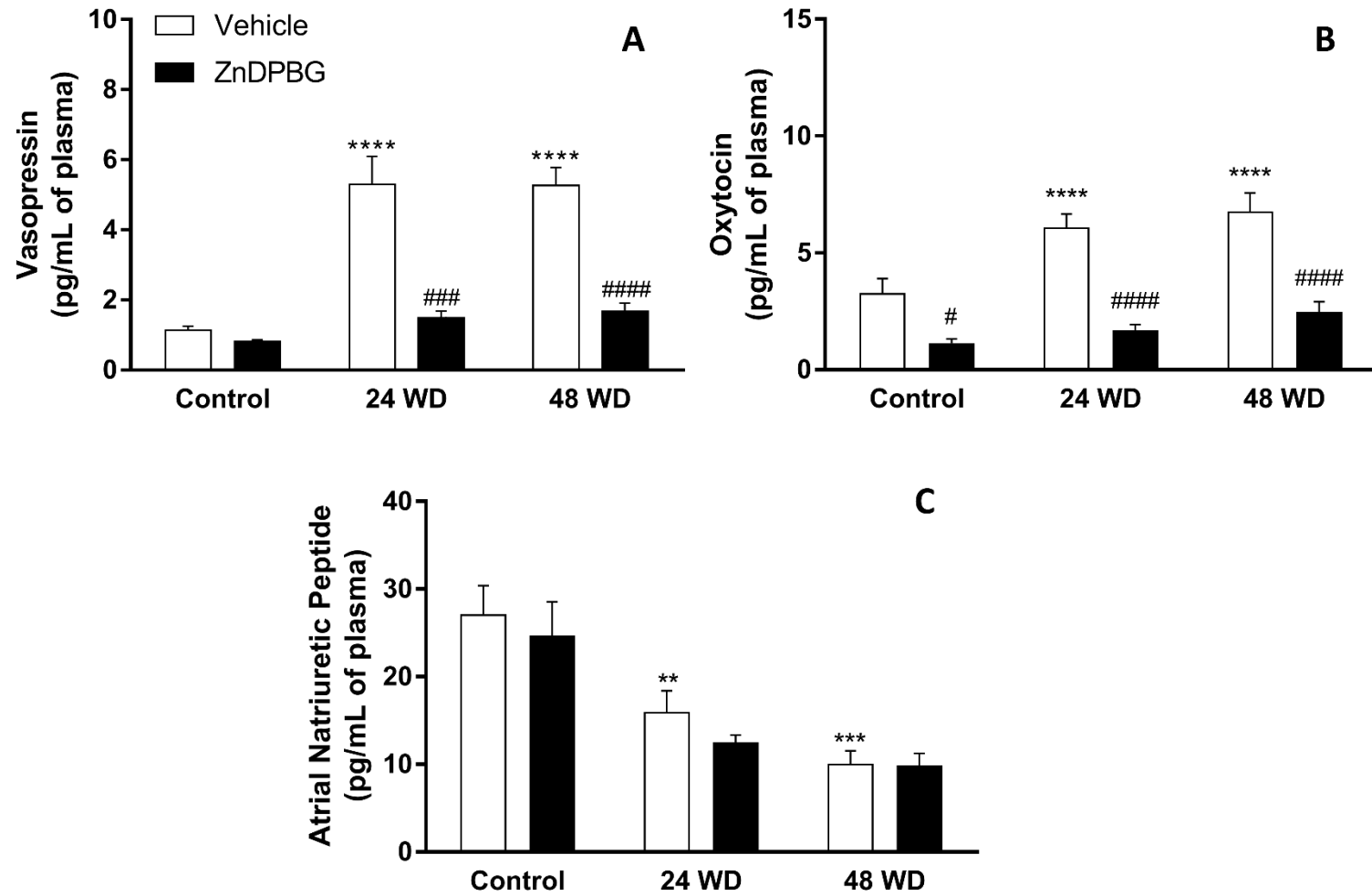


Figure 5

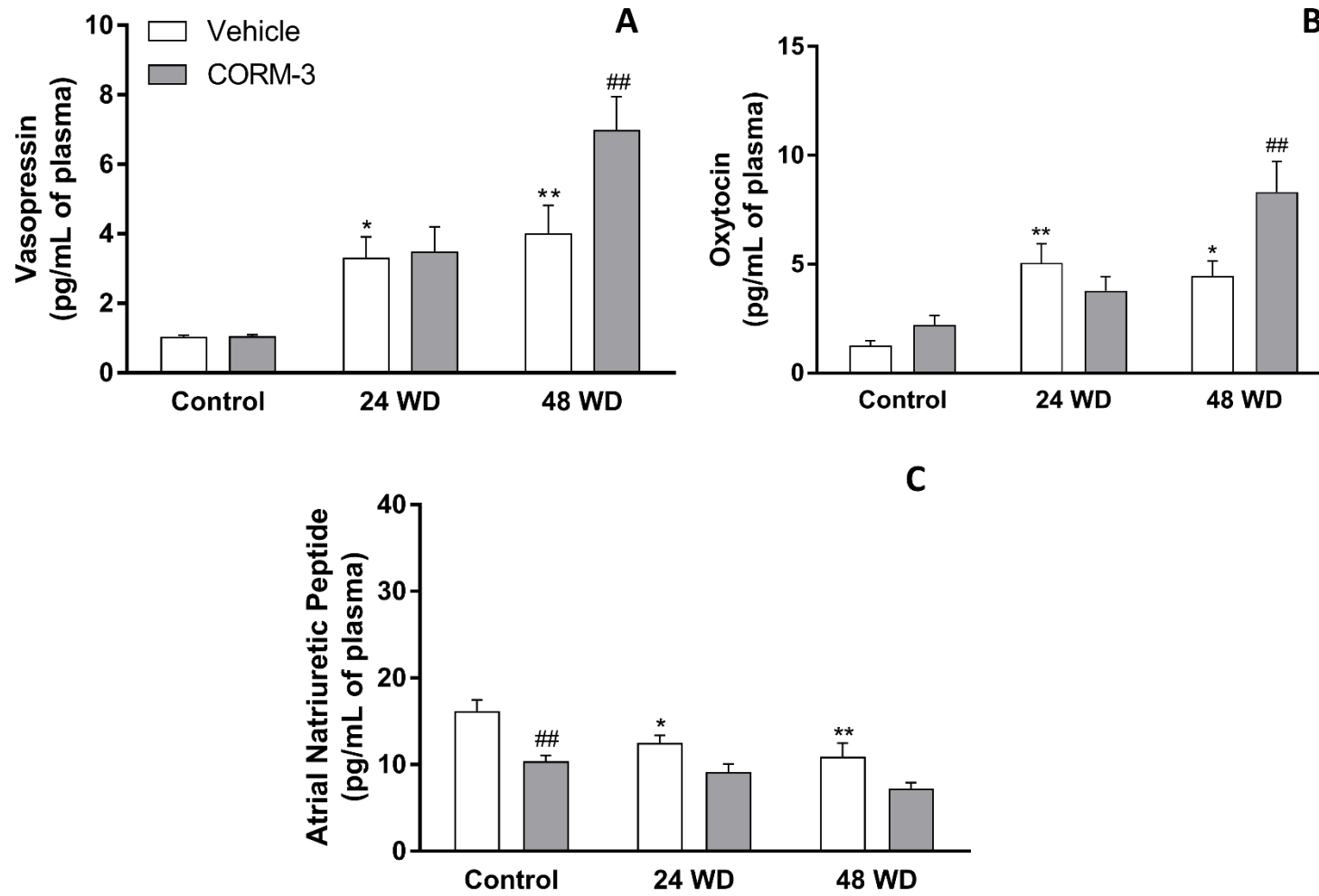


Figure 6

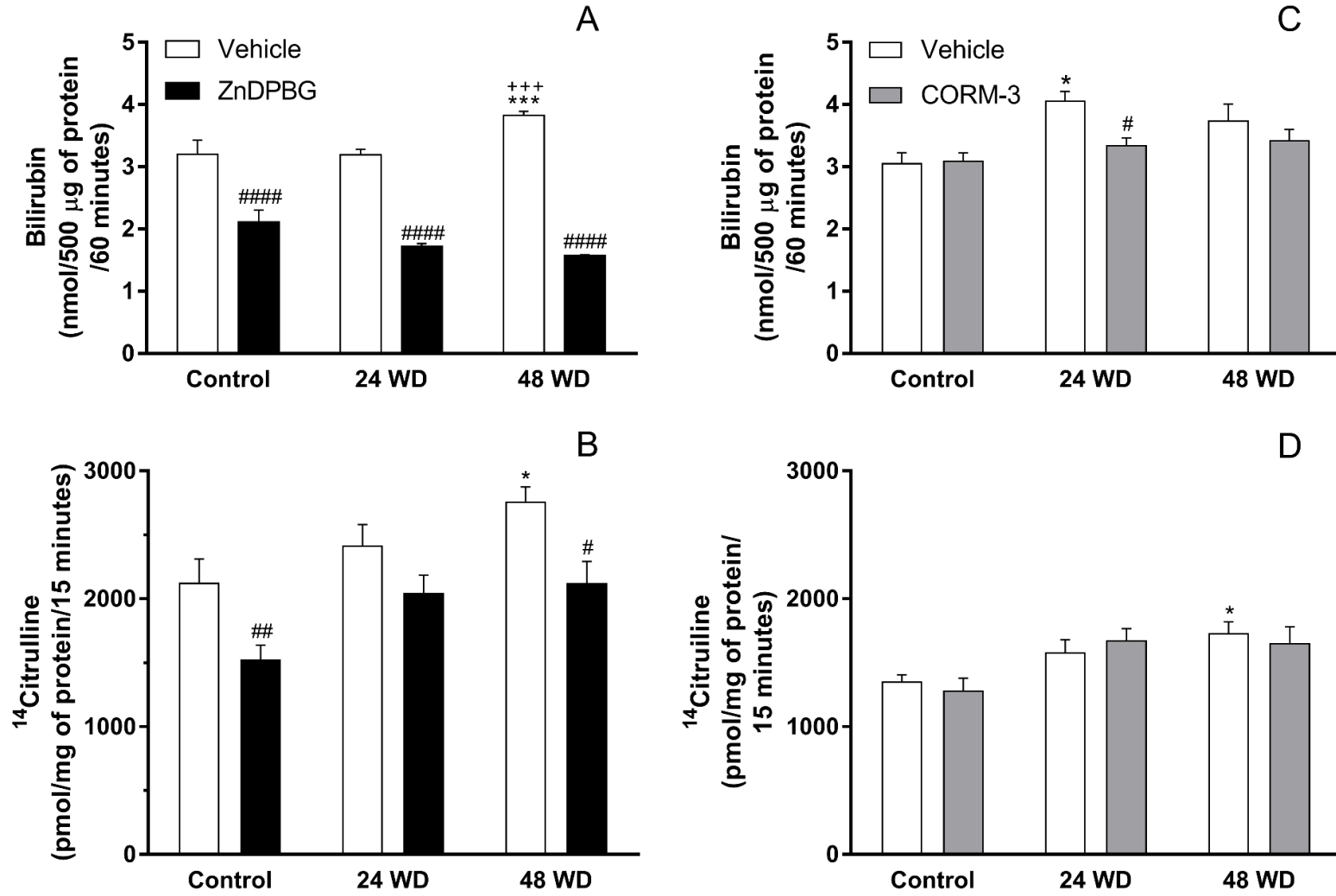


Figure 7

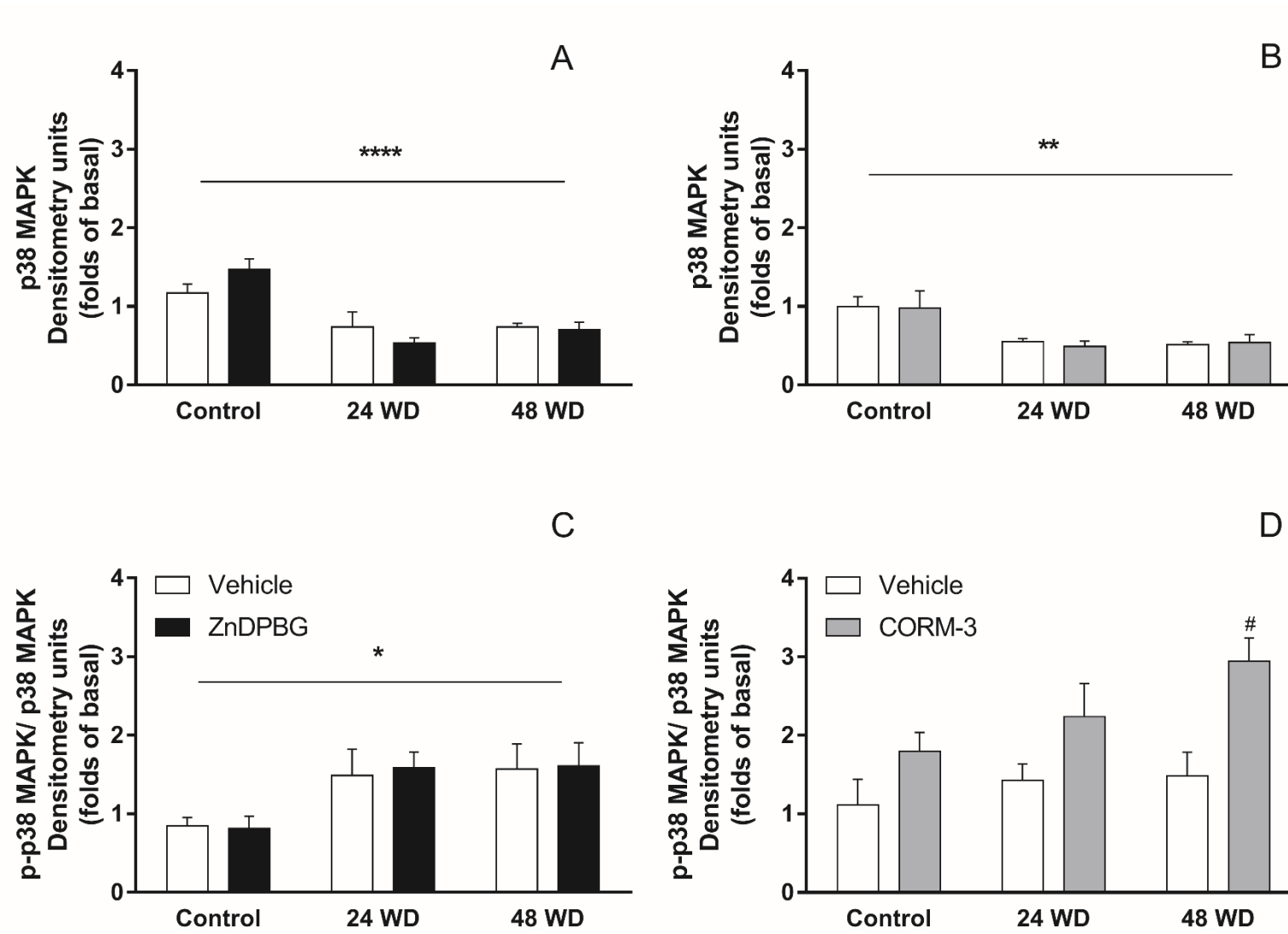




Figure 8

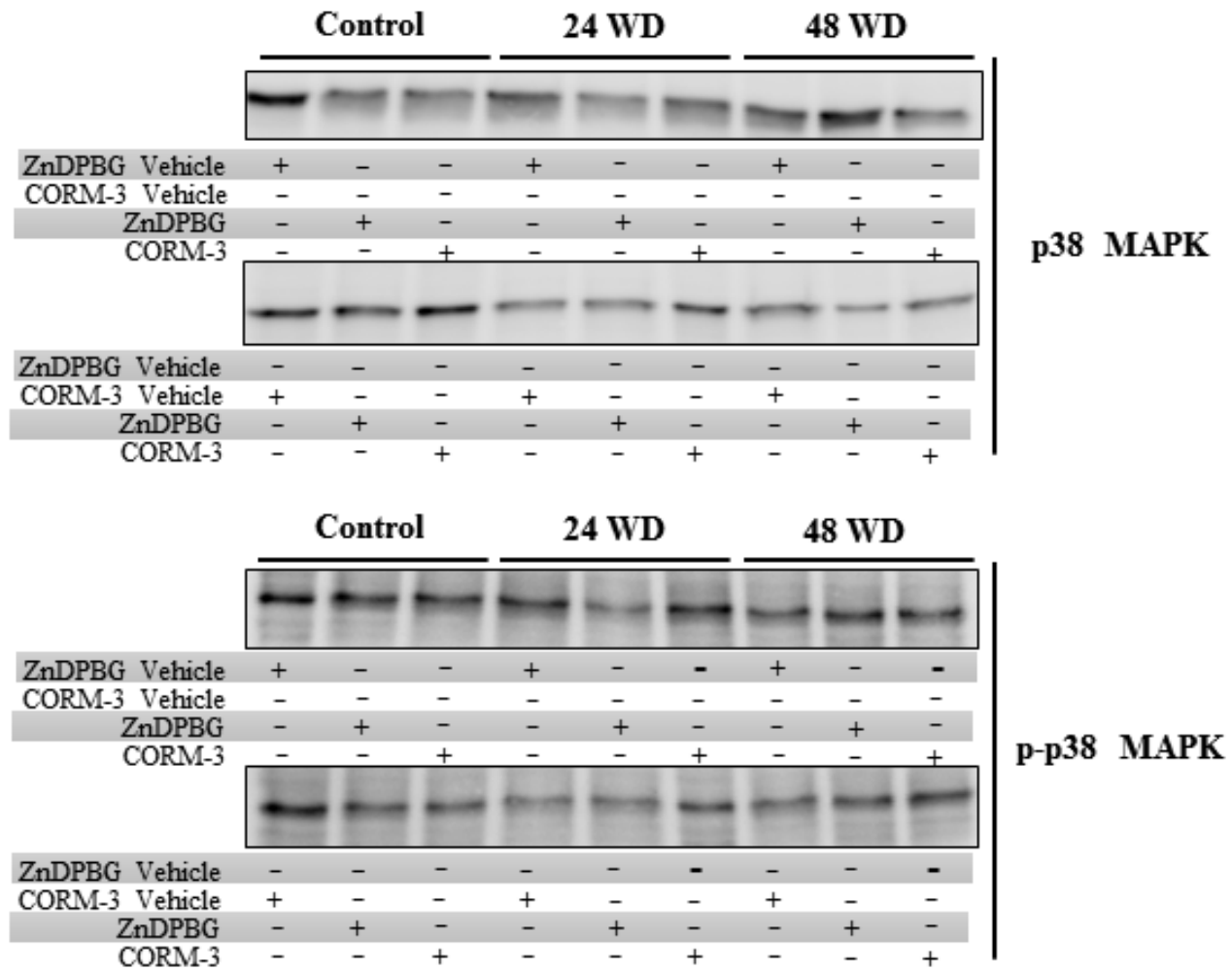


Figure 9

