UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

RICARDO COLETTI

PARTICIPAÇÃO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA MANUTENÇÃO DA
HOMEOSTASE HIDROELETROLÍTICA EM RESPOSTA À PRIVAÇÃO HÍDRICA DE
24 HORAS

RIBEIRÃO PRETO
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

RICARDO COLETTI

PARTICIPAÇÃO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA MANUTENÇÃO DA
HOMEOSTASE HIDROELETROLÍTICA EM RESPOSTA À PRIVAÇÃO HÍDRICA DE
24 HORAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Fisiologia.

Área de Concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Antunes-
Rodrigues.

RIBEIRÃO PRETO
2013

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.

Coletti, Ricardo

Participação do sulfeto de hidrogênio na manutenção da homeostase hidroeletrolítica em resposta à privação hídrica de 24 horas. Ribeirão Preto, 2013.

77 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: José Antunes-Rodrigues.

1. Sulfeto de hidrogênio. 2. Ocitocina. 3. Vasopressina. 4. Óxido Nítrico. 5. Sede.

Nome: COLETTI, Ricardo

Título: Participação do sulfeto de hidrogênio na manutenção da homeostase hidroeletrolítica em resposta à privação hídrica de 24 horas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Instituição: FMRP/USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Instituição: FORP/USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva

Instituição: FORP/USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*[...] À mesure que la science rabaisse ainsi
notre orgueil, elle augmente notre puissance.*

[À medida que a ciência reduz assim nosso
orgulho, ela aumenta nosso poder.]

Claude Bernard, Introduction à l'étude de la
médecine expérimentale, 1865, p. 141.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues responsável pela orientação deste mestrado e pela minha formação e amadurecimento científico desde a época da iniciação científica; muito obrigado pela confiança, exemplo e amizade.

À Prof.^a Dr.^a Lucila L. K. Elias pelas críticas e sugestões construtivas no desenvolvimento deste trabalho, e pela amizade.

À M.^a Gislaine de Almeida Pereira pela amizade e importante colaboração durante todo o mestrado.

Às técnicas Maria Valci dos Santos e Milene Mantovani Lopes pela amizade e preciosa colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Glauber dos S. F. da Silva, à Dr.^a Heloísa D. C. Francescato e ao Prof. Dr. Luiz Guilherme de S. Branco pelas importantes observações sobre o sistema do sulfeto de hidrogênio, além da grande ajuda para a dosagem da atividade das enzimas geradoras de sulfetos.

A todos os amigos internos e externos ao laboratório pela amizade e grande convívio durante este período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização dessa pesquisa não seria possível.

RESUMO

COLETTI, R. **Participação do sulfeto de hidrogênio na manutenção da homeostase hidroeletrólítica em resposta à privação hídrica de 24 horas.** 2013. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A manutenção da osmolalidade e do volume dos líquidos extra- (LEC) e intracelular (LIC) são fatores de extrema importância à conservação da vida. Na desidratação (por ingestão insuficiente ou perda excessiva de água), sistemas de controle autonômicos e endócrinos são acionados frente à ativação de barorreceptores (periféricos) e osmorreceptores (centrais e periféricos), visando estimular a sede e inibir o apetite ao sódio, além de reduzir a diurese, promover a natriurese e contrair a musculatura lisa dos vasos. Especificamente para o sistema de controle endócrino é evidente que tais respostas se dão pela secreção dos hormônios neuroipofisários vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), e pelo aumento da concentração sanguínea de angiotensina II (ANGII). As secreções de AVP e OT são controladas por sistemas subjacentes, representados por neurotransmissores e também por moduladores gasosos, como óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) (Calapai e cols., 1992; Ventura e cols., 2002 e 2008; Gomes e cols., 2004 e 2010; Reis e cols., 2010).

Apesar da existência de modelos que investigassem a modulação do H₂S sobre respostas hipocampais, modulação da frequência cardíaca e pressão arterial, e temperatura corporal (Abe e Kimura, 1996; Dawe e cols., 2008; Liu e cols., 2011; Ren e cols., 2011; Kwiatkoski e cols., 2012), nenhuma abordagem sobre a interação do H₂S com a secreção de AVP e OT havia sido realizada.

No presente estudo, portanto, objetivou-se avaliar, após a privação hídrica de 24 horas (estímulo potente à sede e secreção de AVP e OT), os efeitos do H₂S sobre a resposta hipotalâmica. Para tanto, sulfeto de sódio (Na₂S 65 mM, doador inorgânico), aminooxiacetato (AOA 50 µM, inibidor da enzima cistationina β-sintase) ou veículo (NaCl 0,9%) foram administrados intracerebroventricularmente (icv) em ratos adultos privados de água ou hidratados.

Observou-se inicialmente que, em animais apenas submetidos à desidratação (vs. hidratados), houve um aumento da atividade das enzimas hipotalâmicas

geradoras de H_2S ; e, além disso, a administração aguda de Na_2S a estes animais potencializou a secreção de AVP, OT e CORT (corticosterona), sem alterar a concentração plasmática de ANGII, ANP e prolactina (hormônios medidos após 5 min. da administração icv da droga ou veículo). O H_2S exógeno foi também capaz de reduzir o conteúdo de NO hipotalâmico (medido indiretamente pelo metabólito nitrato/nitrito após 5 min.).

O grande aumento na secreção plasmática de AVP e OT provavelmente foi o responsável pela maior concentração plasmática de CORT, uma vez que estes hormônios são secretagogos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) adenoipofisário. Enquanto o aumento de OT pode ter sido o responsável pela redução da ingestão de água entre os animais privados.

Inversamente, a administração de AOA (vs. veículo) aumentou a ingestão de água entre os animais desidratados.

Desta forma, estes resultados sugerem que o gás H_2S pode ser um importante agente modulador da resposta de sede e secreção neuroipofisária durante a privação hídrica; atuando ou diretamente sobre canais e receptores neuronais ou indiretamente através dos sistemas do NO e CO.

Palavras-chaves: sulfeto de hidrogênio; ocitocina; vasopressina; óxido nítrico; sede.

ABSTRACT

COLETTI, R. **Participation of hydrogen sulfide in the maintenance of hydroelectrolytic homeostasis in response to 24-hour water deprivation.** 2013. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Osmolality and volume maintenance of extra- (ECF) and intracellular fluids (ICF) are factors of extreme importance to life preservation. During dehydration (from insufficient intake or excessive loss of water), autonomic and endocrine control systems are triggered mainly by (peripheral) baroreceptors and (central and peripheral) osmoreceptors to stimulate water intake and inhibit sodium appetite, in addition to restraining diuresis, promoting natriuresis and contracting smooth muscle of vessels. Specifically for endocrine control system, it is evident that such responses take place by neurohypophysis secretion of vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), and by increase of plasma angiotensin II (ANGII) levels. Both AVP and OT secretion are controlled by underlying systems, which are represented by neurotransmitters and also by gaseous modulators like nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) (Calapai et al., 1992; Ventura et al., 2002 and 2008; Gomes et al., 2004 and 2010; Reis et al., 2010).

Despite the existence of models which investigated H₂S modulation on hippocampus responses, heart frequency and blood pressure, and body temperature (Abe and Kimura, 1996; Dawe et al, 2008; Liu et al, 2011; Ren et al, 2011; Kwiatkoski et al, 2012), no approach of H₂S interaction with AVP and OT secretion had been conducted.

In this study, we thus aimed to evaluate the effects of H₂S on hypothalamus response after a 24-hour water deprivation (a powerful stimulus for thirst and AVP/OT secretion). To that, 65 mM sodium sulfide (Na₂S, inorganic donor), 50 µM aminooxyacetate (AOA, cystathionine β-synthase inhibitor) or vehicle (NaCl 0,9%) were administered intracerebroventricularly (icv) to water-deprived or euhydrated adult rats.

It has been initially observed that hypothalamus H₂S-generating enzymes activity of dehydrated-only animals was increased (vs. euhydrated); and, further, acute Na₂S administration to dehydrated animals potentiated AVP, OT and CORT

(corticosterone) secretion without modifying ANGII, ANP and prolactin plasma levels (measured after 5 min. of drug or vehicle icv administration). Exogenous H₂S could reduce hypothalamus NO content as well (indirectly measured by metabolite nitrate/nitrite after 5 min.).

The great increase of AVP and OT secretion was probably responsible for higher levels of corticosterone, since these hormones are secretagogues of anterior pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH). While OT rise might have been the responsible for reduced water intake among deprived animals.

On the other hand, AOA central injection (vs. vehicle) augmented water intake among water-deprived rats.

These results therefore suggest that the gas H₂S may be an important modulating agent of thirst and posterior pituitary secretion response during water deprivation; acting either directly on neuron channels and receptors or indirectly by NO and CO systems.

Keywords: hydrogen sulfide; oxytocin; vasopressin; nitric oxide; thirst.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO GERAL	27
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Cirurgia para canulação do ventrículo cerebral lateral direito	28
4.3 Extração e Dosagem de Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT)	29
4.4 Extração e Dosagem de Corticosterona (CORT)	30
4.5 Extração e Dosagem de Peptídeo Atrial Natriurético (ANP) e Angiotensina II (ANGII)	30
4.6 Dosagem de Prolactina (PRL)	31
4.7 Determinação da Concentração plasmática de Sódio	31
4.8 Determinação do Hematócrito	31
4.9 Determinação da Concentração Plasmática de Proteínas	32
4.10 Determinação da Osmolalidade Plasmática	32
4.11 Dosagem de Nitrato/Nitrito Hipotalâmico	32
4.12 Avaliação do consumo de oxigênio (VO_2), eliminação de gás carbônico (VCO_2) e razão de troca respiratória (RER)	33
4.13 Atividade das enzimas hipotalâmicas geradoras de sulfeto (S^{2-}) e hidrossulfeto (HS^-)	34
4.14 Drogas	35
4.15 Análise Estatística	35
5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	36
5.1 Efeitos da administração icv de Na_2S ou AOA sobre as respostas comportamentais de ingestão de água e NaCl 1,8% após privação hídrica de 24 horas.	36
5.2 Efeito da administração icv de Na_2S sobre as respostas neuroendócrinas, conteúdo hipotalâmico de NO e parâmetros plasmáticos após privação hídrica de 24 horas.	37
5.3 Efeito da administração icv de Na_2S sobre as respostas metabólicas após privação hídrica de 24 horas.	37
5.4 Efeito da privação hídrica de 24 horas sobre a atividade das enzimas geradoras de sulfetos.	38
6. RESULTADOS	39
6.1 Ingestão de Água após administração de Na_2S icv	39
6.2 Ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%) após administração da Na_2S icv	39
6.3 Ingestão de água após administração de AOA icv	40

6.4 Ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%) após administração de AOA icv.....	41
6.5 Concentração plasmática de Vasopressina (AVP) após administração de Na ₂ S.....	41
6.6 Concentração plasmática de Ocitocina (OT) após administração de Na ₂ S	42
6.7 Concentração plasmática de Corticosterona (CORT) após administração de Na ₂ S....	43
6.8 Concentração plasmática de Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) após administração de Na ₂ S.....	44
6.9 Concentração plasmática de Angiotensina II (ANG II) após administração de Na ₂ S...	45
6.10 Concentração plasmática de Prolactina (PRL) após administração de Na ₂ S.....	46
6.11 Conteúdo de Nitratos/Nitritos (NO _x) do Hipotálamo Médio Basal após administração de Na ₂ S	47
6.12 Parâmetros plasmáticos (Osmolalidade, Hematócrito, Concentração de Sódio e de Proteínas) após administração de Na ₂ S.....	48
6.13 Consumo de oxigênio (VO ₂) após administração icv de Na ₂ S.....	50
6.14 Eliminação de gás carbônico (VCO ₂) após administração icv de Na ₂ S.....	51
6.15 Taxa de troca respiratória (RER) após administração icv de Na ₂ S.....	52
6.16 Atividade das enzimas geradoras de sulfetos (S ²⁻ e HS ⁻) do Hipotálamo Médio Basal após privação hídrica de 24 horas.....	54
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	66
9. BIBLIOGRAFIA.....	67

1. INTRODUÇÃO

Os humanos apresentam cerca de 45 a 75% de seu peso corporal composto por água (dependendo da quantidade de massa adiposa e idade) (Malnic, 2008); e, é em meio a este ambiente aquoso, que a ampla maioria das reações químicas necessárias à vida ocorrem.

A água é um solvente polar e, portanto, dissolve facilmente moléculas e átomos carregados ou polares (Nelson e Cox, 2008). Por isso, tanto o líquido extracelular (LEC) quanto o líquido intracelular (LIC) apresentam grandes quantidade de íons dissolvidos, sendo o sódio e o cloreto os principais íons extracelulares, e potássio, o principal cátion intracelular (Malnic, 2008). Todos estes átomos e moléculas dissolvidos em compartimentos intra- e extracelulares (separados por membrana celular semipermeável) determinam, então, osmolalidades intra- e extracelulares respectivamente; as quais, quando distintas, implicam em fluxo de solvente (água) a favor do gradiente de concentração¹ (de partículas osmoticamente ativas) (Procopio, 2008).

O controle da concentração destes íons (sódio, potássio, cloreto, etc.) e moléculas (bicarbonato, fosfato, glicose, etc.) é muito importante, visto que estes, além do controle do volume, participam também de processos bio-físico-químicos como neurotransmissão, contração muscular, secreção celular, sinalização celular e outros.

O controle fino do volume e da osmolalidade do LEC e LIC é, portanto, condição fundamental para a manutenção da vida. Para tanto, todos os vertebrados parecem ajustar a osmolalidade plasmática e volume extracelular principalmente através da ingestão e excreção urinária de fluidos e eletrólitos (Antunes-Rodrigues e cols., 2004).

A desidratação é uma situação peculiar (e ameaçadora à vida) capaz de desencadear respostas que visam à restauração de parâmetros como volume e osmolalidade. Quando um indivíduo encontra-se desidratado, por ingestão insuficiente ou perda excessiva de água, o volume do LEC se reduz; porém, como neste caso o conteúdo de sódio e cloreto neste compartimento se mantém

¹ Em situações de hidratação, todavia, as osmolalidades intra- e extracelulares são muito próximas, com fluxo resultante de água nulo (Guyton e Hall, 2006).

inalterado, a osmolalidade aumenta. Isto gera um gradiente osmótico, e resulta em fluxo de água do LIC para o LEC, com consequente “desidratação celular” (diminuição do volume do LIC). Tal conceito se encontra estabelecido desde 1985, uma vez que se observava que um aumento de 2% na osmolalidade efetiva do LEC era suficiente para produzir sede intracelular² (Fitzsimons, 1985 apud De Luca Jr. e cols., 2005).

Esta desidratação celular é identificada em neurônios especializados, os osmorreceptores – unidades sensíveis à osmolalidade através da redução de volume intracelular (LIC). Evidências sugerem que estes se localizam nos órgãos circumventriculares, estruturas cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica, e que, desta forma, são sensíveis às alterações periféricas de osmolalidade^{3,4}. Parecem se encontrar especificamente no órgão subfornicial (SFO), na região ânteroventral do terceiro ventrículo (AV3V)⁵ e área postrema (AP). Andersson e McCann, desde 1956, já haviam demonstrado que lesões por eletrocoagulação na região AV3V eram capazes de provocar adipsia, evidenciando a importância desta área no controle da sede. As informações advindas das zonas osmossensíveis projetam-se então em direção ao hipotálamo⁶, *locus coeruleus* e núcleo dorsal da rafe, onde controlam o comportamento de sede e apetite ao sódio, modulação da atividade simpática, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, e secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (Antunes-Rodrigues e cols., 2004).

² Hoje também está comprovado que a redução de 10% do volume do LEC é capaz de induzir a sede, mesmo sem alteração da osmolalidade deste compartimento (para revisão consulte Antunes-Rodrigues e cols., 2004), como ocorre na hemorragia, por exemplo.

³ Entretanto, desde 1978, Andersson (apud De Luca Jr. E cols., 2005) já propunha também a existência de células especializadas (na região AV3V) à percepção exclusiva do conteúdo de sódio, os sodiorreceptores, tendo em vista que nem sempre infusões de soluções hipertônicas não-eletrolíticas no terceiro ventrículo cerebral levavam à resposta dipsogênica, enquanto soluções hipertônicas de cloreto de sódio sempre geravam sede. A lógica destas observações consiste no fato de que a osmolalidade do LEC num sistema biológico é determinada basicamente pela concentração de cloreto de sódio dissolvido.

⁴ Osmolalidade se refere ao número de partículas osmoticamente ativas de soluto por quilograma de solvente, enquanto osmolaridade expressa o número de partículas osmoticamente ativas de soluto por volume de solvente.

⁵ A região ânteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) inclui a parte ventral do órgão mediano pré-óptico (MnPO) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLt).

⁶ O hipotálamo, por sua vez, mantém projeções com outras inúmeras áreas: a) neurônios ocitocinérgicos hipotalâmicos se projetam à amígdala central nas respostas frente à expansão de volume extracelular hipertônica (Margatho e cols., 2013); b) neurônios hipotalâmicos medeiam conexões do tálamo à pituitária, substância ativadora reticular, sistema límbico e neocórtex, o que permite que a resposta hormonal hipofisária responda a mudanças de atividade do sistema nervoso autônomo (Chen e cols., 2013); c) neurônios hipotalâmicos e dos gânglios basais se projetam ao tálamo posterior (Kagan e cols., 2013); d) eletroestimulação do hipotálamo, em ratos, é acompanhada de um aumento no conteúdo de ATP do feixe do cíngulo posterior, sugerindo provável conexão entre as áreas (Gourine e cols., 2012).

A AVP⁷ é um hormônio peptídico formado por nove aminoácidos, sendo um deles, no caso de humanos e muitos mamíferos, a arginina. É codificada pelo ácido ribonucleico (RNA) mensageiro da pré-pró-neurofisina II (Summar e cols., 1990), a qual sofre sucessivas clivagens pós-traducionais gerando AVP, neurofisina II e um glicopeptídeo. Sua síntese ocorre em neurônios hipotalâmicos magnocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e supraóptico (SON), sendo transportada por fluxo axoplasmático à neurohipófise, de onde é secretada à circulação periférica. Nos rins, a AVP atua, via receptores V2 (Armstrong e cols., 2013; Antunes-Rodrigues e cols., 2005), estimulando a reabsorção de cloreto de sódio pelo ramo grosso ascendente da alça de Henle, aumentando a permeabilidade do ducto coletor medular interno à ureia e, principalmente, aumentando a permeabilidade do túbulo coletor à água, através da inserção de canais aquaporina 2 (Aires, 2008). No sistema nervoso central, a presença de receptores do tipo V1a no sistema límbico, região supraquiasmática, hipotálamo e núcleo do trato solitário, demonstra que este peptídeo pode também exercer efeitos centrais⁸. Além disso, receptores do tipo V1a da vasculatura (Caldwell e cols., 2008) estão envolvidos na vasoconstrição mediada por AVP, e receptores do tipo V1b estão presentes na adenoipófise, respondendo à AVP com a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Koshimizu e cols., 2012; Antunes-Rodrigues e cols., 2005).

A OT é da mesma forma um hormônio peptídico de nove aminoácidos, diferindo estruturalmente da AVP apenas pela presença de isoleucina na posição 3, e de leucina, na posição 8. É codificada pelo RNA mensageiro da pré-pró-neurofisina I (Summar e cols., 1990), e, tal como a AVP, sofre várias modificações pós-traducionais até gerar OT em sua forma ativa. Sua ação renal é independente de AVP, estimulando a natriurese (excreção de sódio) e caliurese (excreção de potássio).

⁷ Apresenta meia-vida sistêmica de 5 a 10 min. (Antunes-Rodrigues e cols., 2005).

⁸ Szczepańska-Sadowska e cols. (1982), ao injetar AVP (0,10 a 0,15 mU) no terceiro ventrículo cerebral de cães, observaram um aumento significativo na ingestão de água e redução da osmolalidade plasmática. Este mesmo grupo, em 1987, também mostrou que a administração de antagonistas de AVP no terceiro ventrículo leva à redução da ingestão de água.

Centralmente, diferentemente da AVP, sua ação é bastante conhecida e clara, atuando sobre a redução do apetite ao sódio⁹ (Antunes-Rodrigues e cols., 2005; Stricker e Verbalis, 1996).

Na situação de desidratação, a modulação da secreção de AVP e OT é, então, de extrema importância para que o sistema possa poupar água, eliminar sódio, restaurar a pressão arterial sistêmica e impedir que o indivíduo consuma mais sódio.

Todavia, a queda da pressão sanguínea (do volume do LEC) desencadeia outras respostas independentes de AVP e OT, as quais também modulam o comportamento de ingestão, excreção e pressão arterial.

O aparelho justaglomerular renal (AJG) é bastante sensível à variação da pressão de perfusão renal, que varia diretamente com a pressão sanguínea sistêmica. Quedas de pressão (e de volume do LEC) são capazes de estimular o AJG a secretar renina, enzima que cliva o angiotensinogênio hepático em angiotensina I, a qual é convertida em angiotensina II (ANGII) pela enzima conversora de angiotensina (ECA) pulmonar. A ANGII periférica apresenta múltiplas ações, tendo como objetivo final elevar o volume do LEC e aumentar a resistência periférica total (Aires, 2008), restaurando a pressão arterial. Aliás, ela pode atuar especificamente sobre o SFO, AP e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) cerebral e, como bem estabelecido na literatura, aumentar rapidamente a ingestão de água e secreção de AVP^{10,11} (Cao e Feng; 2013; De Luca Jr. e cols., 2010; Antunes-Rodrigues e cols., 2005).

Além da AVP, OT e ANGII, outro hormônio, o peptídeo natriurético atrial (ANP), produzido principalmente pelos cardiomiócitos atriais, modula conjuntamente respostas hidroeletrolíticas. Ele, contudo, é secretado frente ao estiramento atrial

⁹ Estudos mais recentes de Fitts e cols. (2003) demonstram que a administração central de ornitina vasotocina (antagonista do receptor de OT) é capaz aumentar a ingestão de água em animais que não sofreram qualquer tratamento prévio, sugerindo que a OT também iniba o comportamento de sede.

¹⁰ Outros estudos sugerem que a ANGII pode ser gerada centralmente, uma vez que a grande maioria dos substratos e enzimas necessários à sua formação foram identificados no sistema nervoso central. A queda do volume sanguíneo, identificada por barorreceptores periféricos, chega ao núcleo do trato solitário, o que, por sua vez, provoca a liberação do hormônio no cérebro (Antunes-Rodrigues e cols., 2005); entretanto, a ANGII periférica é a que parece constituir o primeiro sinal importante à dipsogênese (De Luca Jr. e cols., 2005).

¹¹ A ANGII central também é capaz de modular a atividade simpática e ingestão alimentar (Cao e Feng; 2013).

induzido por expansão do volume de sangue circulante (aumento do volume do LEC) e atua induzindo vasodilatação, diurese e, principalmente, natriurese, dado que inibe direta e indiretamente a reabsorção de sódio, além de inibir a secreção de renina, aldosterona e AVP (Aires, 2008). O comportamento de sede é também modulado por este peptídeo, uma vez que Antunes-Rodrigues e cols., em 1985, demonstraram que a administração de 1 ou 2 nmol de ANP no terceiro ventrículo de ratos privados de água era capaz de inibir a ingestão de água.

Como pode ser notado até aqui, o equilíbrio hidroeletrolítico é mantido à custa de muitos sistemas controladores, vários deles endócrinos e neuroendócrinos, os quais são, por sua vez, também modulados por outros sistemas¹². Atualmente, muitos olhares têm se voltado aos moduladores gasosos, como: óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e sulfeto de hidrogênio (H₂S).

O NO, molécula inorgânica simples, previamente chamada de fator de relaxamento derivado do endotélio, foi um dos primeiros moduladores gasosos a ser descrito. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados e mostraram que este gás é capaz de inibir a secreção de hormônios e respostas comportamentais (como a busca por água):

1) Ventura e cols., em 2002, ao avaliar os efeitos de dietas hiper- ou hipossódicas por sete dias em ratos, observaram que havia um aumento da atividade da enzima geradora de óxido nítrico, a NO sintase (NOS), no hipotálamo médio basal (HMB)¹³ e neuroipófise de animais que haviam sido submetidos ao excesso de sódio; enquanto a dieta pobre em sódio levava a uma redução da atividade da enzima na neuroipófise. Além disto, estes mesmos autores mostraram que expansão de volume do LEC (EVEC) por meio de salina hipertônica era capaz de aumentar o nitrato/nitrito (metabólitos do NO; NO_x), AVP, OT e ANP plasmáticos, e conteúdo de NO_x hipotalâmico, após 5 min. do estímulo. Ademais, a pré-administração intracerebroventricular (icv) de L-NAME (inibidor da NOS neuronal,

¹² Certos neurotransmissores como dopamina (Horvitz e cols., 1993; Forsling e Williams, 1984), ácido gama-aminobutírico (GABA) (Yamaguchi e Yamada, 2008; Jones e Mogenson, 1982), serotonina (Magalhães-Nunes e cols., 2007), noradrenalina (Fortaleza e cols., 2011; Torda e cols., 1978) e acetilcolina (Raber e Bloom, 1996; Sorensen e Harvey, 1971) também participam das respostas modulatórias que visam manter o balanço hidroeletrolítico, como sede e secreção hormonal.

¹³ O hipotálamo médio basal compreende o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), núcleo supraóptico (SON), núcleo ventromedial, núcleo paraventricular (PVN), núcleo arqueado, núcleo supraquiasmático e áreas periventriculares (Gomes e cols., 2004 e 2010).

endotelial e induzível) à EVEC era capaz de reverter o aumento de NO e AVP plasmáticos.

2) Em 2010, Reis e cols., ao pré-tratar ratos com L-NAME, L-arginina (substrato da enzima NOS) ou salina isotônica icv, e, em seguida, administrar ANGII também icv, observaram que a ANGII exógena era capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de AVP, OT e ANP após 5 minutos, porém o pré-tratamento com L-NAME potencializava a secreção de todos os hormônios, enquanto o pré-tratamento com L-arginina reduzia a secreção de AVP e OT. Estes autores também observaram que o pré-tratamento com L-NAME era capaz de aumentar a ingestão de água e salina após uma hora, e que a administração de L-arginina reduzia a ingestão de fluidos; como já havia sido descrito por Calapai e cols., em 1992, e Kannan e cols., 1995.

3) Gomes e cols. (2004 e 2010), em estudo *in vitro*, descreveram que a incubação de fragmentos de hipotálamo basal em meio hiperosmótico (340 mOsm/Kg de água) aumentava a secreção de ANP e OT, com concomitante redução do conteúdo de nitritos. E a administração de nitroprussiato de sódio (SNP, um doador de NO) ao meio de incubação hiperosmótico reduzia a secreção de ANP e OT hipotalâmica.

Curiosamente, foi demonstrado que tanto o CO quanto o NO apresentam um mecanismo de ação dependente de guanilato ciclase (Bełtowski e cols., 2004 apud Łowicka e Bełtowski, 2007).

Estudos *in vitro* de Gomes e cols. (2010), utilizando fragmentos de hipotálamo basal, demonstraram que tanto em meio de incubação isotônico (280 mOsm/Kg de água) quanto hipertônico, a inibição da enzima geradora de CO, a heme oxigenase (HO), através de ZnPPiX (zinco protoporfirina IX), resultava em secreção diminuída de OT e maior atividade da NOS¹⁴. E que a administração de ODQ (um inibidor da guanilato ciclase solúvel; 1H-(1,2,4)-oxodiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona) era capaz de reverter completamente: 1) a secreção diminuída de OT frente à administração de ZnPPiX; 2) a secreção diminuída de OT frente ao nitroprussiato de sódio (SNP).

Tais dados mostraram que há modulação do CO sobre o sistema nitrérgico, e que as ações dos sistemas podem ocorrer pela modulação da enzima geradora de

¹⁴ Gomes e cols. (2004) também mostraram *in vitro* que a liberação de ANP induzida por meio hiperosmótico e a redução da atividade da NOS podiam ser inibidos pela administração de zinco deuteroporfirina-2,4-bis-glicol (ZnDPBG) ao meio de cultura.

monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), a guanilato ciclase solúvel; e que esta modulação direta do CO sobre o NO é capaz de alterar indiretamente a secreção dos hormônios neuroipofisários.

Pesquisas recentes têm sugerido que outro gás, o H₂S (gás incolor de odor intenso e característico), conhecido por décadas apenas como um poluente ambiental e tóxico (Beauchamp e cols., 1984; Dorman e cols., 2004; Sastre e cols., 2013)¹⁵, também exerça efeitos fisiológicos, sendo produzido em quantidades substanciais pelos tecidos dos mamíferos (Łowicka e Beltowski, 2007).

Até 1996, já se sabia que o H₂S podia ser endogenamente gerado da cisteína (aminoácido sulfurado) pela ação de enzimas dependentes de piridoxal-5'-fosfato, a cistationina β-sintase (CBS) e a cistationina γ-liase (CSE), em tecidos como fígado e rins, porém pouco se sabia sobre sua produção endógena no SNC (sistema nervoso central). Foi naquele ano que Abe e Kimura, utilizando a técnica de Northern blot, observaram uma elevada expressão de mRNA para CBS em áreas do hipocampo, cerebelo, tronco e córtex; embora a expressão de mRNA para CSE não fosse detectável por esta técnica. Os mesmos autores também observaram, através de registros de potenciais pós-sinápticos excitatórios (PEPS) e população de picos evocados por estimulação elétrica (estimulação tetânica), que o H₂S (fornecido a partir do doador inorgânico hidrossulfeto de sódio, NaHS) agia sobre a transmissão sináptica na região CA1 do hipocampo de ratos, suprimindo os PEPS e a quantidade de picos de potenciais, quando aplicadas concentrações de NaHS iguais ou maiores que 320 μM. Porém, ficou também demonstrado que, apesar de estimulações tetânicas fracas (15 pulsos a 100 Hz) não serem capazes de induzir potenciação a longo prazo (LTP) isoladamente, a adição de 10 a 130 μM de NaHS possibilitava o fenômeno LTP dose-dependentemente. Além disso, demonstrou-se, através da adição ao meio de NMDA (20 μM; agonista do receptor NMDA) ou APV (50 μM; antagonista do receptor NMDA), que NaHS facilitava a LTP induzida por estimulação tetânica fraca por meio da ativação de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), aumentando significativamente a corrente de entrada; efeito este que desaparecia após a lavagem do NaHS do meio.

¹⁵ A inalação crônica de H₂S (80 p.p.m., 6h/dia, 90 dias) está associada com perda de peso, perda olfativa, rinite, hipertrofia e hiperplasia do epitélio bronquiolar (Dorman e cols., 2004), enquanto o envenenamento agudo grave (Sastre e cols., 2013) está relacionado à asfixia, vômito, insuficiência cardíaca, edema pulmonar, anóxia e isquemia cerebral, e congestão vascular.

A observação de que a expressão da CSE é baixa, porém existente, no SNC perdura até hoje. Hu e colaboradores (2011) destacam que a CBS parece ser predominante no SNC, enquanto a CSE é principalmente expressa pelo sistema cardiovascular, estando envolvida na proteção cardíaca contra o dano de reperfusão após isquemia, modulação do tônus vascular, atividade de renina, inibição da secreção de insulina, e em estados pró- e anti-inflamatórios em diferentes sistemas e patologias.

Recentemente, Shibuya e colaboradores (2009) demonstraram, em cérebros de camundongos *knockout* para CBS, a existência de outra enzima geradora de H₂S no SNC, a 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) que, em conjunto à cisteína aminotransferase (CAT, também dependente de piridoxal-5'-fosfato), produz H₂S a partir da cisteína. A 3-MST não produz H₂S diretamente, porém gera enxofre sulfano, o qual, na presença de redutores, libera H₂S.

As principais vias geradoras de H₂S encontram-se esquematizadas a seguir (Figura 1).

Figura 1. Metabolismo da cisteína acoplado à geração de sulfeto de hidrogênio. CAT: cisteína aminotransferase; CBS: cistationina β-sintase; CDO: cisteína dioxigenase; CSE: cistationina γ-liase; 3-MST: 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase; H₂S: sulfeto de hidrogênio. Figura adaptada de Łowicka e Bełtowski (2007), e Hu e cols. (2011).

O H_2S , produzido sob condições fisiológicas (pH 7,4) pelas enzimas supracitadas, pode ser encontrado na forma não-dissociada (20%, H_2S) e dissociada (80%) em próton (H^+) e hidrossulfeto (HS^-) (Kimura e cols., 2012). O HS^- pode, subsequentemente, se dissociar em H^+ e sulfeto (S^{2-} , pequenas quantidades), embora isso apenas ocorra em ambientes mais básicos ($\text{pK}_a > 12$) (Łowicka e Beltowski, 2007). A permeabilidade da membrana ao H_2S é bastante alta e, mesmo bicamadas contendo colesterol e esfingomielina, os quais diminuem a capacidade de difusão da membrana, mantêm grande permeabilidade a este modulador gasoso. Estas observações sugerem que a membrana não seja um agente limitante na difusão de H_2S (Mathai e cols., 2009). Ainda, segundo Mathai e cols. (2009), é improvável que o transporte da forma HS^- através de canais de cloreto (Cl^-) ou de outros canais aniônicos tenha algum papel fisiológico. A forma da molécula que passa pela membrana não é necessariamente a forma funcional, sendo bastante complexa a determinação de qual forma (H_2S ou HS^-) tem função fisiológica. Estima-se que a concentração cerebral de H_2S livre, medida através de cromatografia gasosa de encéfalos homogeneizados, seja 14 nM (0,12 $\mu\text{mol/kg}$ de proteína). Porém, por outro lado, Furne e colaboradores (2008) sugeriram que o H_2S liberado da dessulfidração da cisteína deve ocorrer em uma taxa suficiente para manter a concentração total do tecido entre 30 e 100 μM .

Os mecanismos envolvidos na sinalização neuronal intracelular iniciada pelo H_2S ainda não são plenamente conhecidos, porém parecem envolver principalmente a modulação da atividade de canais na membrana plasmática. Como já abordado anteriormente, Abe e Kimura (1996) demonstraram que o H_2S , em concentrações anteriormente consideradas como fisiológicas, aumenta as correntes catiônicas não-seletivas mediadas pelo receptor NMDA, sendo esta estimulação envolvida na indução da LTP hipocampal. O mecanismo pelo qual o H_2S potencializa a função do receptor NMDA ainda não está totalmente elucidado, embora a hipótese de que ela possa ocorrer via modulação redox dos grupos tiol espalhados pelos domínios extracelulares do receptor tenha sido sugerida (Qu e cols., 2008). Kimura (2000) também indica que concentrações fisiológicas de H_2S favoreçam a fosforilação de sítios específicos de subunidades do receptor NMDA por proteínas quinase A (PKA), ativadas por monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Tais ações foram observadas em culturas de neurônios e células gliais, além de oócitos de *Xenopus*.

Adicionalmente, Han e colaboradores (2005) demonstraram que o H_2S (doado a partir do NaHS) regula positivamente o receptor B de ácido γ -aminobutírico ($GABA_B$ R), um receptor acoplado à proteína G localizado em sítios pré- e pós-sinápticos. A estimulação de receptores pós-sinápticos gera potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS) de longa duração, que resulta no aumento da condutância ao potássio, sendo este mecanismo importante para a neurotransmissão inibitória fina. Nos sítios pré-sinápticos, o $GABA_B$ R regula a liberação de GABA e glutamato, ao inibir canais de cálcio voltagem-dependentes.

Em outros sistemas, o efeito do H_2S também pode envolver canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}). Esta conclusão é baseada na observação de que muitos efeitos do H_2S são mimetizados por fármacos capazes de induzir a abertura destes canais, como pinacidil e diazoxida, enquanto estes mesmos efeitos são abolidos por antagonistas do canal, como glibenclamida e outros derivados de sulfoniluréia (Łowicka e Bełtowski, 2007).

Além do papel de neuromodulador, tem sido observado que o H_2S desempenha função antioxidativa tanto no microambiente intra- quanto extracelular dos neurônios. Já está bem estabelecido que a glutathiona reduzida é uma importante defesa antioxidante para o SNC. Kimura e Kimura (2004) demonstraram que o H_2S aumenta a produção de glutathiona reduzida em neurônios, através da estimulação da enzima γ -glutamylcisteína sintetase, além de aumentar o transporte de cisteína. Segundo Qu e cols. (2008), este aumento no conteúdo de glutathiona protege os neurônios da oxitose (morte celular por estresse oxidativo disparada por altas concentrações de glutamato).

Além de modular a atividade neuronal, o H_2S parece exercer efeitos também sobre as células gliais. Nagai e colaboradores (2004), utilizando culturas de astrócitos, mostraram que o H_2S exógeno (doado pelo NaHS) é capaz de gerar ondas de cálcio, as quais são transmitidas às células vizinhas, modulando funções neuronais e vasculares. Segundo Qu e colaboradores (2008), esta onda de cálcio disparada pelo H_2S nos astrócitos é precedida por um aumento intracelular da concentração de cálcio, que ocorre através de canais de cálcio presentes na membrana plasmática e, em menor intensidade, da liberação de cálcio de estoques intracelulares.

Ainda na glia, foi demonstrado que o H_2S protege, de maneira dose-dependente, a microglia e os astrócitos da inflamação induzida por

lipopolissacarídeos (LPS), ao atenuar a secreção de NO e fator de necrose tumoral α (TNF- α) por estas células (Hu e cols., 2007). Tal mecanismo antioxidativo é semelhante ao descrito para neurônios, de forma que o efeito resultante é prevenir a morte celular¹⁶. As principais vias de sinalização do H₂S (no sistema nervoso central) encontram-se esquematizadas abaixo.

Figura 2. Vias de sinalização do H₂S no sistema nervoso central. CBS: cistationina β -sintase; γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetase; Glu: glutamato; Gly: glicina; GSH: glutathiona; H₂S: sulfeto de hidrogênio; R.E.: retículo endoplasmático. Figura adaptada de Qu e cols. (2008).

¹⁶ Rice e Russo-Menna (1998) observaram que a concentração de glutathiona é maior na glia que em neurônios, sugerindo que as células gliais contribuem ativamente para a antioxidação neste microambiente.

Especificamente, em relação ao hipotálamo e aos neurônios hipotalâmicos, algumas ações específicas do também H_2S já estão descritas, mediando principalmente mecanismos neurovegetativos:

1) Já foi timidamente demonstrado, por Dawe e cols. (2008), que a microinjeção de NaHS no hipotálamo posterior resulta em bradicardia e hipotensão, sendo tais efeitos antagonizados pelo pré-tratamento com gliclazida (bloqueador do canal K_{ATP})¹⁷. Da mesma forma, Liu e colaboradores (2011) demonstraram recentemente que injeções intracerebroventriculares (icv) sequenciais de NaHS realmente induzem diminuição dose-dependente da pressão sanguínea e frequência cardíaca. Além disso, a administração de SAME (S-adenosil-L-metionina, doador orgânico de cisteína) também produziu hipotensão e bradicardia significativas. Tanto a hipotensão quanto a bradicardia induzidas por NaHS foram efetivamente atenuadas pelo pré-tratamento com glibenclamida (também uma sulfonilureia que fecha canais K_{ATP}), sugerindo que a bradicardia e hipotensão decorrentes do NaHS são dependentes da ativação de canais K_{ATP} (Liu e cols. 2011), hipótese corroborada pelos estudos adicionais desenvolvidos por Ren e colaboradores (2011)¹⁸.

2) Kwiatkoski e cols. (2012) observaram, através da administração de Na_2S (doador inorgânico de H_2S) ou aminooxiacetato (AOA, inibidor da CBS) icv ou intra-AVPO (região hipotalâmica ânteroventral pré-óptica), durante hipóxia de 7% O_2 , para qualquer via de administração, potencialização da redução da temperatura corporal frente à aplicação de Na_2S , e redução da diminuição da temperatura corporal frente à inibição da CBS por AOA; evidenciando mais uma forma de atuação do H_2S sobre o hipotálamo, agora sobre o controle da temperatura.

3) Recentemente, Khademullah e Ferguson (2013) mostraram, através de ensaio eletrofisiológico *whole cell* de células hipotalâmicas (magnocelulares, parvocelulares neuroendócrinas e parvocelulares pré-autonômicas), que a administração de NaHS ao banho em concentrações de 0,1 a 50 mM é capaz de despolarizar cerca de 80% de todas as subpopulações celulares analisadas; e que,

¹⁷ A gliclazida é uma sulfonilureia de alta potencia que fecha canais de potássio sensíveis a ATP, bloqueando as correntes de saída de potássio. No pâncreas, o fechamento de canais K_{ATP} e, consequente despolarização destas células, leva ao aumento do conteúdo de cálcio intracelular (pela abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes) e secreção hormonal (Lawrence e cols., 2001).

¹⁸ Ren e cols. (2011) observaram que a injeção icv de β -mercaptopiruvato – um substrato da 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase – foi capaz de aumentar a pressão arterial de ratos; enquanto a administração de sulfeto de hidrogênio gerou hipotensão transiente, a qual pode ser bloqueada por glibenclamida.

quanto maior é a concentração de NaHS ao banho, maior é a voltagem alcançada durante a despolarização (de forma dose-dependente). Ademais, o ensaio *current-clamp* da despolarização destas células mostrou que este ganho de potencial elétrico pela membrana se deve ao fechamento de canais de potássio, corroborando os estudos farmacológicos prévios de hipotálamo que utilizaram glicazida e glibenclamida.

Tais resultados sugerem que o H_2S está envolvido no controle da função hipotalâmica atuando diretamente por meio de canais K_{ATP} .

É sabido que, da mesma forma que CO interage com o NO, o H_2S também modula/é modulado pelos outros dois moduladores gasosos. Desde 2010, Mancuso e cols. (em revisão da literatura) delinearam as principais vias de interação deste sistema gasoso complexo (figura 3).

Figura 3. Principais vias de transdução envolvidas nas atividades biológicas do NO, CO e H_2S . CBS: cistationina β-sintase; CSE: cistationina γ-liase; 3-MST: 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase; H_2S : sulfeto de hidrogênio; HO: heme oxigenase; CO: monóxido de carbono; AC: adenilato ciclase; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; Nrf2: fator 2 relacionado ao fator eritroide nuclear 2; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; COX: ciclooxigenase; GC: guanilato ciclase. As setas verdes indicam estímulo, enquanto as setas vermelhas indicam inibição. Figura adaptada de Mancuso e cols. (2010).

Como podemos observar, o H_2S e o NO parecem desempenhar inibição mútua, enquanto o primeiro estimula a geração de CO , que por sua vez inibe a geração de H_2S . E, como já visto por Gomes e cols. (2010), o CO exerce inibição sobre o NO .

Baseado nos achados experimentais supracitados, o presente trabalho objetiva investigar o papel do H_2S sobre a manutenção da homeostase hidroeletrolítica em animais submetidos à privação hídrica de 24 horas, de forma a compreender a relevância fisiológica deste sistema no organismo intacto, particularmente relacionada às funções comportamental e neuroendócrina.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel do sulfeto de hidrogênio (H_2S) sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais induzidas pela privação hídrica de 24 horas (P24H).

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar especificamente:

1. Os efeitos da administração intracerebroventricular (icv) aguda de Na_2S (sulfeto de sódio; doador inorgânico de H_2S ; 65 mM, 4 μ L, segundo Kwiatkoski e cols., 2012) e de seu veículo NaCl 0,9% (4 μ L), em animais hidratados e em P24H, sobre:

1.1 Respostas comportamentais: ingestão de água e NaCl 1,8%;

1.2 Respostas neuroendócrinas: concentração plasmática de vasopressina (AVP), ocitocina (OT), peptídeo atrial natriurético (ANP), angiotensina II (ANGII), corticosterona (CORT) e prolactina (PRL);

1.3 O sistema nitrérgico hipotalâmico: dosagem do conteúdo de nitratos/nitritos no hipotálamo médio basal;

1.4 Os parâmetros plasmáticos: hematócrito, concentração de sódio e proteínas, e osmolalidade;

1.5 Os parâmetros metabólicos: consumo de oxigênio, eliminação de dióxido de carbono e razão de troca respiratória.

2. Os efeitos da administração icv aguda de AOA (aminooxiacetato; inibidor da enzima CBS; 50 μ M, 4 μ L, segundo Kwiatkoski e cols., 2012) e de seu veículo NaCl 0,9% (4 μ L), em animais hidratados e em P24H, sobre:

2.1 Respostas comportamentais: ingestão de água e NaCl 1,8%.

3. Os efeitos da privação hídrica de 24 horas e hidratação sobre a atividade das enzimas geradoras de sulfeto no hipotálamo médio basal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, de 250 a 300 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, aclimatados em temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (exposição à luz: das 6h às 18h), com ração padrão e água *ad libitum*, em gaiolas plásticas coletivas (4 ratos por gaiola). Antes do experimento, os animais foram habituados em gaiolas metabólicas ou gaiolas plásticas, dependendo do protocolo experimental, com apresentação *ad libitum* de água, solução de salina hipertônica (NaCl 1,8%) e ração padrão.

Os experimentos foram todos realizados no período da manhã (entre 7h e 11h) e foram conduzidos em acordo ao “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996) e aos princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL; acessado de <<http://www.cobea.org.br>> em 26/11/2013). Todos os protocolos foram submetidos previamente à sua realização para avaliação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP/USP (Protocolo n.º 101/2012).

4.2 Cirurgia para canulação do ventrículo cerebral lateral direito

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula de aço inoxidável no ventrículo lateral direito e posterior administração de sulfeto de sódio (260 nmol/4 µl; doador de sulfeto de hidrogênio), aminooxiacetato (200 pmol/4 µl; inibidor da CBS) ou veículo (NaCl 0,9%, 4 µl).

Previamente à cirurgia, todos os animais foram anestesiados com quetamina (60 mg/kg; i.p.) e xilazina (7,5 mg/kg; i.p.), de acordo com técnica anteriormente utilizada pelo laboratório (Mecawi e cols., 2010). Uma vez anestesiados, os animais foram colocados em instrumento estereotáxico (Kopf, modelo 900), com o crânio nivelado entre os pontos anatômicos bregma e lambda. Uma cânula de aço inoxidável (10 mm de comprimento, 0,6 mm de diâmetro externo e 0,4 mm de diâmetro interno) foi, então, unilateralmente colocada no ventrículo cerebral lateral

direito de acordo com as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997): 0,5 mm caudal ao bregma, 1,5 mm lateral à linha média e 3,6 mm abaixo do tecido ósseo. A cânula foi fixada ao crânio com o auxílio de resina acrílica dental e dois parafusos de joalheria afixados caudalmente. Uma guia metálica ocupou o diâmetro interno da cânula quando esta não estivesse sendo utilizada para a infusão da droga. Após a cirurgia, os animais receberam intramuscularmente doses profiláticas de pentabiótico veterinário (0,1 mL/100 g de peso corporal, i.m., Fort Dodge) para evitar possíveis infecções, permanecendo em recuperação por aproximadamente uma semana. Durante este período, foram manuseados diariamente, visando sua adaptação aos procedimentos experimentais.

A verificação do correto posicionamento da cânula foi feita ao final do experimento, após decapitação, por meio da administração de azul de Evans (2% em 5 µl) através da própria cânula.

4.3 Extração e Dosagem de Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT)

Os procedimentos foram realizados de acordo com técnica previamente descrita por Elias e cols. (1997) e Haanwinckel e cols. (1995).

Para as dosagens de AVP e OT, amostras de sangue do tronco foram coletadas em frascos contendo heparina (10 µL/mL de sangue).

A extração dos hormônios foi realizada utilizando-se 1 mL de plasma adicionado de 2 mL de acetona gelada, seguidos de agitação contínua (20 segundos) e centrifugação (3000 RPM por 25 min. a 4°C). Ao sobrenadante adicionaram-se 2 mL de éter de petróleo; seguiu-se de agitação e repouso (por 5 min.) para a separação das fases. A fase superior foi aspirada e descartada, enquanto a fase inferior foi liofilizada.

Para o radioimunoensaio (RIE), 100 µL do primeiro anticorpo [anti-AVP (RAS 8103, Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, California, E.U.A.) ou anti-OT (HIC 8152, Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, California, E.U.A.), ambos feitos em coelho] foram adicionados às amostras; os tubos foram agitados e incubados a 4°C por 24 horas. Em seguida, 100 µL de peptídeos marcados com ¹²⁵I (2000 CPM/100 µL AVP, 4000 CPM/100 µL OT; marcados e purificados, em nosso laboratório, por cromatografia de alta resolução) foram adicionados aos tubos; estes foram agitados e incubados por 24h a 4°C. O segundo anticorpo (anti-IgG de coelho feito em cabra)

foi, então, adicionado (100 µL) e incubado por 24h a 4°C. Polietilenoglicol (PEG 6,25%; 1 mL) foi colocado e incubado (4 a 6h), as amostras centrifugadas (3000 RPM, 25 min., 4°C) e o sobrenadante aspirado. A radioatividade do precipitado foi determinada por contador gama (Packard).

As dosagens mínimas detectáveis foram de 0,12 pg/mL para AVP e OT, e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 2,98% e 29,26% para AVP, e de 3,58% e 11,16% para OT.

4.4 Extração e Dosagem de Corticosterona (CORT)

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

A extração da corticosterona foi realizada a partir de 25 µL de plasma com 1 mL de etanol absoluto gelado, conforme previamente descrito. As amostras foram centrifugadas a 2500 RPM (4°C, 15 min.) e, em seguida, liofilizadas.

Para o RIE, a 500 µL da amostra ressuspendida foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-corticosterona (AB-cort-17984) e 100 µL de hormônio marcado [corticosterona (1,2-3(H), New England Nuclear]; os tubos foram agitados e mantidos a 4°C por 24 horas. No segundo dia, carvão-dextran (0,5/0,05%) foi adicionado às amostras, as quais foram agitadas, mantidas em repouso por 15 min. e centrifugadas a 2500 RPM (15 min., 4°C). O sobrenadante foi, então, vertido em tubo de cintilação e adicionado de 4 mL de líquido de cintilação; foram agitados e mantidos em repouso por 2h. A radiatividade foi determinada por contador beta.

A dosagem mínima detectável foi de 0,4 µg/dL, e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 2,81% e 17,84%.

4.5 Extração e Dosagem de Peptídeo Atrial Natriurético (ANP) e Angiotensina II (ANGII)

Para a mensuração das concentrações plasmáticas de ANGII e ANP, as amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, 2 mg/mL) e inibidores de enzimas proteolíticas (10 µL de 1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto, 10 µL de 500 mM pepstatina A e 20 µL de p-hidroximercuribenzoato, por mL de sangue coletado).

A extração dos hormônios foi realizada por meio de cromatografia por hidrofobicidade, em colunas Sep-Pak C-18 (Waters Corporation, Milford, MA, E.U.A.) capazes de ligar o hormônio frio; o qual foi, em seguida, eluído da coluna pela adição de ácido trifluoroacético (TFA 0,1%) e acetonitrila 60%, e liofilizado. A radiatividade foi determinada por contador gama.

As dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios de duplo-anticorpo específicos usando as técnicas descritas por Vecsei (1979), Gutkowska e cols. (1991), e Botelho e cols. (1994), para ANP e ANG II.

As dosagens mínimas detectáveis foram de 0,7 pg/mL e 0,4 pg/mL para ANP e ANG II respectivamente, e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 1,65% e 2,29% para ANP, e de 1,71% e 3,68% para ANG II.

4.6 Dosagem de Prolactina (PRL)

O procedimento foi realizado de acordo com técnica previamente descrita por Durlo e cols. (2004).

Para a dosagem do hormônio prolactina (PRL), não foi necessária extração, sendo o radioimunoensaio realizado diretamente na amostra de plasma. 100 µL de plasma foram adicionados de 100 µL do primeiro anticorpo anti-prolactina; posteriormente, após incubação, adicionaram-se 100 µL de hormônio marcado e o segundo anticorpo (específico contra o primeiro anticorpo). No segundo dia, houve adição de PEG 6,25%. A radiatividade foi determinada por contador gama.

A dosagem mínima detectável foi de 0,4 ng/mL, e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 2,37% e 3,93% respectivamente.

4.7 Determinação da Concentração plasmática de Sódio

A determinação da concentração de sódio plasmática foi realizada por meio de um fotômetro de chama (Micronal - modelo b 262). O aparelho foi calibrado com uma solução padrão contendo 140 mEq/L de sódio, diluída em água deionizada na proporção de 1:100.

4.8 Determinação do Hematócrito

Após a decapitação dos animais, foram coletadas amostras de sangue por capilaridade para determinação do hematócrito. O capilar heparinizado contendo a amostra de sangue foi centrifugado por 5 minutos a 2.500 rpm e a análise foi expressa em porcentagem do volume total.

4.9 Determinação da Concentração Plasmática de Proteínas

Para as dosagens de proteínas plasmáticas, os animais foram eutanasiados por decapitação nos tempos apropriados. O plasma, coletado em tubo plástico com adição de heparina, foi separado por centrifugação a 3.000 rpm, a 4°C, durante 20 min, e em seguida estocado a -70°C, em alíquotas de 10 µL, apropriadas para a dosagem do conteúdo de proteína segundo o método de Bradford (1976).

4.10 Determinação da Osmolalidade Plasmática

Para a determinação da osmolalidade plasmática, foram utilizados 250 µL de plasma (coletado em tubo plástico com adição de heparina) para leitura em um osmômetro de bancada (GONOTEC) que utiliza o princípio de abaixamento do ponto de congelamento.

4.11 Dosagem de Nitrato/Nitrito Hipotalâmico

Após a eutanásia do animal, o hipotálamo médio basal foi coletado em tubos de plástico contendo 200 µl de ácido acético 0,1 N gelado, acondicionados no gelo. Com o auxílio de um homogeneizador, os tecidos foram homogeneizados (em gelo) por 20 segundos.

Uma alíquota de 20 µl do homogeneizado (diluído 1:100 em água destilada) foi utilizada para dosagem de proteína pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando um fotocolorímetro de comprimento de onda de 595 nm, uma vez que os valores das dosagens de nitrato/nitrito foram expressos em mg de proteína.

Uma alíquota de 25 µl do homogeneizado foi desproteïnizada por incubação com 50 µl de etanol absoluto gelado, seguida de agitação (15 segundos) e mantido por no mínimo 30 minutos no freezer -20°C. Posteriormente a amostra foi

centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado em freezer -20°C para dosagem.

A determinação da concentração de nitrato/nitrito foi feita por meio de quimiluminescência NO/O₃ utilizando um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyser, Boulder CO, USA).

4.12 Avaliação do consumo de oxigênio (VO₂), eliminação de gás carbônico (VCO₂) e razão de troca respiratória (RER)

Para avaliação dos parâmetros metabólicos, os animais foram mantidos, com livre acesso à água e ração (animais hidratados) ou apenas à ração (animais privados), em gaiolas individuais herméticas conectadas ao sistema aberto OxyMax/CLAMS (Columbus Instruments). O oxigênio (O₂) foi medido por sensor paramagnético, enquanto o dióxido de carbono (CO₂) foi aferido por sensor de infravermelho não-dispersado de único feixe.

A taxa consumo de O₂ ($\dot{V}O_2$, dada em mL/Kg.h) foi calculada pela equação 1, e a taxa de eliminação de CO₂ ($\dot{V}CO_2$, dada em mL/Kg.h) pela equação 2:

$$\dot{V}O_2 = \dot{V}_i \times FO_{2i} - \dot{V}_o \times FO_{2o} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\dot{V}CO_2 = \dot{V}_o \times FCO_{2o} - \dot{V}_i \times FCO_{2i} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde $\dot{V}_i$ é fluxo de entrada de ar na gaiola por unidade de tempo, $\dot{V}_o$ é o fluxo de saída de ar na gaiola por unidade de tempo, FO_{2i} é a fração de O₂ em $\dot{V}_i$, FO_{2o} é a fração de O₂ em $\dot{V}_o$, FCO_{2i} é a fração de CO₂ em $\dot{V}_i$, e FCO_{2o} é a fração de CO₂ em $\dot{V}_o$.

$\dot{V}_i \times FO_{2i}$ e $\dot{V}_i \times FCO_{2i}$ (entradas) foram aferidas apenas ao início da avaliação de cada gaiola, enquanto $\dot{V}_o \times FO_{2o}$ e $\dot{V}_o \times FCO_{2o}$ (saídas) foram medidas a cada 30 segundos, após 8 min. da injeção central (para que os gases O₂ e CO₂ do trato respiratório do animal pudessem se equilibrar ao conteúdo da gaiola, uma vez que esta foi aberta para o procedimento icv).

A razão de troca respiratória (RER, adimensional) foi calculada pela razão entre $\dot{V}CO_2$ e $\dot{V}O_2$ (equação 3):

$$RER = \frac{\dot{V}CO_2}{\dot{V}O_2} \quad (\text{Equação 3})$$

Para o cálculo do consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$, dado em mL/Kg) dos 8 aos 18 minutos avaliados (equação 4), e da eliminação de CO_2 ($\dot{V}CO_2$, dado em mL/Kg) para o mesmo período (equação 5), utilizaram-se as áreas sob as curvas (AUC):

$$\dot{V}O_2 = \int_8^{18} \dot{V}O_2 dt \quad (\text{Equação 4})$$

$$\dot{V}CO_2 = \int_8^{18} \dot{V}CO_2 dt \quad (\text{Equação 5})$$

O mesmo conceito matemático de AUC foi utilizado para uma avaliação global da RER no intervalo de 8 a 18 minutos após a injeção icv (equação 6), sendo dada em horas (h):

$$RER_{AUC} = \int_8^{18} RER dt \quad (\text{Equação 6})$$

4.13 Atividade das enzimas hipotalâmicas geradoras de sulfeto (S^{2-}) e hidrossulfeto (HS^-)

Após a eutanásia do animal, hipotálamo médio basal foi extraído e acondicionado em freezer -70°C .

A atividade de geração de sulfetos foi medida conforme descrito por Kwiatkoski e cols. (2012), Francescato e cols. (2011), e Stipanuk e Beck (1982). As amostras de hipotálamo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (100 mM) utilizando um microprocessador. Cada amostra (em 100 μL de KH_2PO_4 100 mM pH 7,4) continha L-cisteína (10 mM; 8 μL), piridoxal-5'-fosfato (2 mM; 8 μL) e PBS (10 μL). A reação foi realizada em tubos eppendorf cobertos com parafilme e foi iniciada transferindo-se os tubos para banho a 37°C . Após incubação de 2 horas, acetato de zinco (1% p/v; 50 μL) foi adicionado para sequestrar o sulfeto gerado, seguido por ácido tricloroacético (10% p/v; 50 μL) para precipitar as proteínas e parar a reação. Após centrifugação, sulfato de N,N-dimetil-p-fenilenediamina (20

mM; 40 µL) em HCl (7,2 N) seguido por FeCl₃ (30 mM; 40 µL) em HCl (1,2 N) foi então adicionado a 80 µL de sobrenadante, e a densidade óptica do conteúdo foi medida a 670 nm em espectrofotômetro.

Para avaliar o conteúdo de proteínas das amostras, alíquotas de 20 µL dos homogeneizados iniciais foram diluídas em água destilada (1:100) e analisadas pelo método de Bradford (1976).

4.14 Drogas

Como ferramentas farmacológicas foram utilizados: 1) o doador inorgânico sulfeto de sódio (Na₂S, Aldrich), administrado icv em dose única na concentração de 65 mM (260 nmol/4 µl; Kwiatkoski e cols., 2012); 2) o inibidor da enzima CBS aminooxiacetato (AOA, Aldrich), administrado icv em dose única na concentração de 50 µM (200 pmol/4 µl; Kwiatkoski e cols., 2012); ou 3) seu veículo (NaCl 0,9%/4 µl).

4.15 Análise Estatística

Os dados obtidos foram apresentados como médias ± erro padrão da média. A análise da atividade de geração de sulfetos endógena foi realizada através de teste *t* de Student, com nível de significância para a rejeição da hipótese nula fixado em 0,05. Para a análise da ingestão de fluidos e taxa metabólica, utilizou-se a análise de variâncias (ANOVA) de medidas repetidas com “tratamento” (privação de 24 horas vs. hidratação) e “droga” (Na₂S icv vs. Veículo ou AOA icv vs. Veículo) como fatores interindividuais (*between-subjects*), e “tempo” como fator intraindividual (*within-subjects*); e para as análises de concentração hormonal, de conteúdo de NO_x, de parâmetros plasmáticos, e de VO₂ e VCO₂ e RER_{AUC} utilizou-se a ANOVA fatorial com “tratamento” e “droga” como fatores interindividuais (*between-subjects*). O pós-teste de Student-Newman-Keuls para comparações específicas foi aplicado apenas quando o *F* relativo àquele(s) fator(es) fosse significativo. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula foi fixado em 0,05.

5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.1 Efeitos da administração icv de Na_2S ou AOA sobre as respostas comportamentais de ingestão de água e NaCl 1,8% após privação hídrica de 24 horas.

Após receberem a cânula no ventrículo lateral direito, os animais passaram por um período de recuperação de 1 a 2 dias. Após este período, foram alocados em gaiolas metabólicas com bebedouros graduados para água e NaCl 1,8%, e com ração, todas *ad libitum*. Permaneceram em adaptação ao novo ambiente por 4 a 5 dias; e, no 5º ou 6º dia, metade dos animais iniciou a privação hídrica de 24 horas (P24H), enquanto o restante permaneceu com livre acesso à água e salina.

Após o período de P24H, metade de cada grupo (hidratado ou P24H) recebeu: 1) a injeção icv de Na_2S (260 nmol em 4 μL de NaCl 0,9%) ou veículo (4 μL de NaCl 0,9%); 2) a injeção icv de AOA (200 pmol em 4 μL de NaCl 0,9%) ou veículo (4 μL de NaCl 0,9%). Após a injeção central das drogas ou veículo, ambos os fluidos foram imediatamente reapresentados; sendo a avaliação da ingestão realizada após 5 e 15 min. para o grupo Na_2S (ou veículo), e após 5, 15 e 30 min. para o grupo AOA (ou veículo). Segue o esquema abaixo (figura 4).

Figura 4. Protocolo experimental para avaliação da ingestão de fluidos.

5.2 Efeito da administração icv de Na_2S sobre as respostas neuroendócrinas, conteúdo hipotalâmico de NO e parâmetros plasmáticos após privação hídrica de 24 horas.

Após receberem a cânula no ventrículo lateral direito, os animais passaram por um período de recuperação de 5 a 7 dias. No dia anterior ao experimento, metade dos animais iniciou a privação hídrica de 24 horas (P24H), enquanto o restante permaneceu com livre acesso aos fluidos (água e salina) e à ração.

Após o período de P24H, metade de cada grupo (hidratado ou P24H) recebeu a injeção icv de Na_2S (260 nmol em 4 μL de NaCl 0,9%) ou veículo (4 μL de NaCl 0,9%). Após 5 min. da administração central das drogas ou veículo, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue truncanl e/ou encéfalo. Segue o esquema abaixo (figura 5).

Figura 5. Protocolo experimental para coleta de sangue truncanl e encéfalo.

5.3 Efeito da administração icv de Na_2S sobre as respostas metabólicas após privação hídrica de 24 horas.

Após receberem a cânula no ventrículo lateral direito, os animais passaram por um período de recuperação de 5 a 7 dias. No dia anterior ao experimento, os animais foram colocados em adaptação na gaiola metabólica; metade dos animais iniciou a privação hídrica de 24 horas (P24H), enquanto o restante permaneceu com livre acesso aos fluidos (água e salina) e à ração.

Após o período de P24H, metade de cada grupo (hidratado ou P24H) recebeu a injeção icv de Na_2S (260 nmol em 4 μL de NaCl 0,9%) ou veículo (4 μL de NaCl

0,9%). Após 2 min. da administração central das drogas ou veículo iniciaram-se as medições dos parâmetros metabólicos (VO_2 e VCO_2) a cada 30 segundos, porém apenas após 8 min. os valores encontravam-se equilibrados (ambiente interno da gaiola com trato respiratório do animal). A partir destes valores calculou-se a RER. Segue o esquema abaixo (figura 6).

Figura 6. Protocolo experimental para avaliação do VO_2 , VCO_2 e RER.

5.4 Efeito da privação hídrica de 24 horas sobre a atividade das enzimas geradoras de sulfetos.

Neste protocolo os animais não foram canulados, uma vez que não foram administrados fármacos centralmente.

No dia anterior ao experimento, metade dos animais foi privada de água (P24H), enquanto o restante permaneceu com livre acesso aos fluidos (hidratado). No dia do experimento, estes foram então eutanasiados por decapitação, e o encéfalo coletado (e armazenado a -70°C), para posterior extração do hipotálamo médio basal e dosagem *in vitro* da atividade das enzimas hipotalâmicas geradoras de sulfetos.

6. RESULTADOS

6.1 Ingestão de Água após administração de Na₂S icv

A privação hídrica de 24 horas (P24H) constituiu um estímulo potente para o consumo de água dos animais após a rerepresentação dos fluidos (tratamento: $F_{1;36} = 163,2$; $p < 0,001$); enquanto a administração de Na₂S (260 nmol) reverteu parte deste efeito (droga: $F_{1;36} = 6,6$; $p < 0,05$). Conjuntamente, ambos os estímulos foram capazes de alterar o consumo de água (tratamento*droga: $F_{1;36} = 6,6$; $p < 0,05$).

Especificamente observa-se que, aos 5 minutos, o animal privado de água que recebeu veículo (NaCl 0,9% icv) bebeu muito mais água que o respectivo animal hidratado ($2,2 \pm 0,3$ mL/100 g de peso corporal vs. Hidratado/NaCl 0,9% icv: $0,0 \pm 0,0$ mL/100 g p.c.; $p < 0,05$); porém, o animal P24H que recebeu Na₂S icv ingeriu três vezes menos água que o respectivo controle ($0,7 \pm 0,2$ mL/100 g p.c. vs. P24H/NaCl 0,9% icv: $2,2 \pm 0,3$ mL/100 g p.c.; $p < 0,05$). Aos 15 minutos não foram observados mais efeitos referentes ao Na₂S (figura 7).

Figura 7. Ingestão cumulativa de água após 5 e 15 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. Os grupos hidratados apresentaram ingestão nula. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. # significativamente diferente do respectivo grupo veículo, $p < 0,05$. ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.2 Ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%) após administração da Na₂S icv

A ingestão de salina hipertônica foi maior, de forma geral, entre os animais P24H (tratamento: $F_{1;36} = 12,0$; $p < 0,01$), sem qualquer alteração frente à administração ou não de Na₂S (figura 8).

Figura 8. Ingestão cumulativa de salina após 5 e 15 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias ± erro padrão da média. Os grupos hidratados apresentaram ingestão nula. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.3 Ingestão de água após administração de AOA icv

A ingestão de água aumentou nos animais que foram submetidos à P24H (tratamento: $F_{1;41} = 267,7$; $p < 0,001$); e ademais, a administração icv do inibidor da enzima CBS, o AOA, foi também capaz de aumentar o consumo de água (droga: $F_{1;41} = 6,0$; $p < 0,05$).

Os animais P24H que receberam veículo icv ingeriram mais água que os animal hidratados aos 5 min. (P24H/NaCl 0,9% icv: $1,6 \pm 0,3$ mL/100 g p.c. vs. Hidratado/NaCl 0,9% icv: $0,0 \pm 0,0$ mL/100 g p.c., $p < 0,05$), aos 15 min. (P24H/NaCl 0,9% icv: $5,0 \pm 0,5$ mL/100 g p.c. vs. Hidratado/NaCl 0,9% icv: $0,0 \pm 0,0$ mL/100 g p.c., $p < 0,05$) e aos 30 min. (P24H/NaCl 0,9% icv: $8,0 \pm 0,5$ mL/100 g p.c. vs. Hidratado/NaCl 0,9% icv: $0,0 \pm 0,0$ mL/100 g p.c., $p < 0,05$); contudo, aos 5 e 15 min., o animal P24H que recebeu AOA icv bebeu mais água (1,7 e 1,3 vezes, respectivamente) que aquele que recebeu veículo (5 min.: P24H/AOA icv: $2,8 \pm 0,2$ mL/100 g p.c. vs. P24H/NaCl 0,9% icv: $1,6 \pm 0,3$ mL/100 g p.c., $p < 0,05$; 15 min.: P24H/AOA icv: $6,5 \pm 0,4$ mL/100 g p.c. vs. P24H/NaCl 0,9% icv: $5,0 \pm 0,5$ mL/100 g p.c., $p < 0,05$) (figura 9).

Figura 9. Ingestão cumulativa de água após 5, 15 e 30 min. da administração icv de AOA. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. O grupo hidratado/NaCl 0,9% apresentou ingestão nula. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. # significativamente diferente do respectivo grupo veículo, $p < 0,05$. ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.4 Ingestão de salina hipertônica (NaCl 1,8%) após administração de AOA icv

A P24H aumentou a ingestão de salina hipertônica durante todos os tempos avaliados (tratamento: $F_{1;41} = 7,6$; $p < 0,01$), sem nenhuma alteração em resposta à administração de AOA ou veículo (figura 10).

Figura 10. Ingestão cumulativa de salina após 5, 15 e 30 min. da administração icv de AOA. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. Os grupos hidratados apresentaram ingestão nula. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.5 Concentração plasmática de Vasopressina (AVP) após administração de Na_2S

O estímulo da P24H aumentou as concentrações plasmáticas de AVP (tratamento: $F_{1;43} = 74,9$; $p < 0,001$), o que foi potencializado pela administração icv de Na_2S (droga: $F_{1;43} = 7,6$; $p < 0,01$; tratamento*droga: $F_{1;43} = 5,5$; $p < 0,05$).

Especificamente, os animais P24H que receberam veículo secretaram 3,7 vezes mais AVP que os animais hidratados que receberam veículo ($5,2 \pm 1,0$ pg/mL vs. Hidratado/ NaCl 0,9%: $1,4 \pm 0,2$ pg/mL, $p < 0,05$); além disso, os animais P24H injetados com Na_2S apresentaram níveis hormonais 1,6 vezes maiores que animais P24H/ NaCl 0,9% icv ($8,3 \pm 0,7$ pg/mL vs. P24H/ NaCl 0,9% icv: $5,2 \pm 1,0$ pg/mL, $p < 0,05$) (figura 11).

Figura 11. Concentração plasmática de AVP após 5 min. da administração icv de Na_2S . Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. # significativamente diferente do respectivo grupo veículo, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.6 Concentração plasmática de Ocitocina (OT) após administração de Na_2S

A concentração plasmática de OT elevou-se nos animais que foram submetidos à P24H (tratamento: $F_{1;31} = 50,0$; $p < 0,001$) e foi potencializada naqueles animais que receberam Na_2S icv (droga: $F_{1;31} = 20,6$; $p < 0,001$; tratamento*droga: $F_{1;31} = 11,88$; $p < 0,01$).

Pode-se observar que o grupo P24H/NaCl 0,9% icv apresentou maiores concentrações plasmáticas de OT (4 vezes) que o grupo Hidratado/NaCl 0,9% ($10,3 \pm 1,2$ pg/mL vs. Hidratado/NaCl 0,9%: $2,6 \pm 0,6$ pg/mL, $p < 0,05$), e 2,7 vezes menores que os animais P24H que receberam Na₂S icv ($28,14 \pm 3,4$ pg/mL, $p < 0,05$) (figura 12).

Figura 12. Concentração plasmática de OT após 5 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. # significativamente diferente do respectivo grupo veículo, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.7 Concentração plasmática de Corticosterona (CORT) após administração de Na₂S

A análise estatística mostrou que a privação hídrica de 24 horas e a injeção central de Na₂S são fatores que podem conjunta ou individualmente aumentar a concentração plasmática de CORT (tratamento: $F_{1;37} = 10,8$, $p < 0,01$; droga: $F_{1;37} = 5,6$, $p < 0,01$; tratamento*droga: $F_{1;37} = 5,0$, $p < 0,05$).

Especificamente pode ser observado que o grupo P24H/Na₂S icv apresenta concentrações plasmáticas 1,5 vezes maiores que os animais P24H/NaCl 0,9% e

que os animais Hidratados/ Na_2S ($14,3 \pm 1,5 \mu\text{g/dL}$ vs. P24H/ NaCl 0,9%: $9,7 \pm 1,3 \mu\text{g/dL}$, $p < 0,05$; e vs. Hidratado/ Na_2S : $8,6 \pm 1,1 \mu\text{g/dL}$, $p < 0,05$) (figura 13).

Figura 13. Concentração plasmática de CORT após 5 min. da administração icv de Na_2S . Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. # significativamente diferente do respectivo grupo veículo, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.8 Concentração plasmática de Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) após administração de Na_2S

O único fator, deste modelo, que alterou a secreção periférica de ANP foi a P24H (tratamento: $F_{1;35} = 47,2$; $p < 0,001$), não tendo o Na_2S nenhum efeito.

Nota-se que os animais privados apresentam concentração plasmática de ANP cerca de 2 vezes menor que os animais hidratados (Hidratado/ NaCl 0,9% icv.: $96,8 \pm 12,9 \text{ pg/mL}$ vs. P24H/ NaCl 0,9% icv.: $46,6 \pm 5,3 \text{ pg/mL}$, $p < 0,05$; Hidratado/ Na_2S icv.: $111,6 \pm 11,2 \text{ pg/mL}$ vs. P24H/ Na_2S icv.: $41,7 \pm 5,9 \text{ pg/mL}$, $p < 0,05$) (figura 14).

Figura 14. Concentração plasmática de ANP após 5 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.9 Concentração plasmática de Angiotensina II (ANG II) após administração de Na₂S

A concentração plasmática de ANG II aumentou apenas em resposta à privação hídrica de 24 horas (tratamento: $F_{1;33} = 28,2$; $p < 0,001$).

De maneira específica, o grupo P24H/NaCl 0,9% icv tem níveis hormonais 3 vezes maiores que o grupo Hidratado/NaCl 0,9% icv ($17,5 \pm 2,5$ pg/mL vs. $5,7 \pm 0,8$ pg/mL, $p < 0,05$); e o grupo P24H/Na₂S icv é 3,15 vezes maior que o grupo Hidratado/Na₂S icv ($23,0 \pm 4,0$ pg/mL vs. $7,3 \pm 0,8$ pg/mL, $p < 0,05$) (figura 15).

Figura 15. Concentração plasmática de ANG II após 5 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.10 Concentração plasmática de Prolactina (PRL) após administração de Na₂S

Nem a privação hídrica de 24 horas, nem a administração de Na₂S foram estímulos capazes para gerar modificações nas concentrações plasmáticas de PRL (figura 16).

Figura 16. Concentração plasmática de PRL após 5 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias ± erro padrão da média.

6.11 Conteúdo de Nitratos/Nitritos (NO_x) do Hipotálamo Médio Basal após administração de Na₂S

A análise estatística mostra que, de forma conjunta, a privação hídrica e a injeção central de Na₂S são capazes de alterar o conteúdo hipotalâmico de NO_x (tratamento*droga: $F_{1;30} = 8,1$; $p < 0,01$). E, individualmente, a administração central de Na₂S também é capaz de reduzir estes níveis (droga: $F_{1;30} = 8,5$; $p < 0,01$).

Da maneira específica, vemos que o grupo P24H que recebeu veículo tem uma maior quantidade de NO_x que o grupo Hidratado/NaCl 0,9% icv ($0,09 \pm 0,01$ nmol/μg de proteína vs. Hidratado/NaCl 0,9% icv.: $0,04 \pm 0,01$ nmol/μg, $p < 0,05$), e que a administração de Na₂S reduz a geração de NO_x no grupo privado (P24H/Na₂S icv.: $0,03 \pm 0,01$ nmol/μg de proteína vs. P24H/NaCl 0,9% icv., $p < 0,05$) (figura 17).

Figura 17. Conteúdo hipotalâmico de nitratos após 5 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. # significativamente diferente do respectivo grupo veículo, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.12 Parâmetros plasmáticos (Osmolalidade, Hematócrito, Concentração de Sódio e de Proteínas) após administração de Na₂S

A privação hídrica de 24 horas foi um estímulo potente para aumentar os níveis de todos os parâmetros plasmáticos avaliados (tratamento: $F's > 5,0$; $p's < 0,05$), enquanto a administração de Na₂S foi capaz apenas de influenciar os níveis de osmolalidade (tabela 1).

Variável	Hidratado e NaCl 0,9% icv.	Hidratado e Na ₂ S icv.	P24H e NaCl 0,9% icv.	P24H e Na ₂ S icv.	Tratamento (Hidratado vs. P24H)	Droga (NaCl 0,9% vs. Na ₂ S)	Tratamento*Droga
Osmolalidade (mOsm/Kg de água)	298,5 ± 4,6 ^a	291,6 ± 5,4	321,8 ± 2,7 ^{a,b}	301,1 ± 5,3 ^b	F _{1;34} = 11,77, p < 0,01	F _{1;34} = 8,31, p < 0,01	F _{1;34} = 2,10, p = 0,15
Sódio (mEq/L)	134,2 ± 4,9 ^a	136,5 ± 2,1	149,0 ± 1,2 ^a	141,1 ± 2,8	F _{1;24} = 9,57, p < 0,01	F _{1;24} = 0,79, p = 0,38	F _{1;24} = 2,64, p = 0,11
Proteína Total (mg/dL)	4,9 ± 0,2 ^a	4,9 ± 0,2	5,6 ± 0,1 ^a	5,0 ± 0,2	F _{1;32} = 5,01, p < 0,05	F _{1;32} = 2,19, p = 0,14	F _{1;32} = 3,41, p = 0,07
Hematócrito (%)	50,0 ± 1,0	48,5 ± 1,4	53,8 ± 1,8	50,7 ± 0,5	F _{1;24} = 5,10, p < 0,05	F _{1;24} = 2,96, p = 0,09	F _{1;24} = 0,41, p = 0,52

Tabela 1. Parâmetros plasmáticos após 5 min. da administração de Na₂S icv. Valores expressos como médias ± erro padrão da média. (^a) significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, p < 0,05. (^b) significativamente diferente do respectivo grupo veículo, p < 0,05. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Especificamente pode ser observado, entre os animais que receberam veículo, que a P24H foi capaz de aumentar a osmolalidade, a concentração de sódio e a concentração de proteínas totais em, respectivamente, 7,80%, 11,02% e 14,28%. Verificou-se ainda que a injeção icv de Na_2S não determinou nenhuma alteração significativa em relação aos parâmetros avaliados, com exceção da osmolalidade.

6.13 Consumo de oxigênio (VO_2) após administração icv de Na_2S

Nem a privação hídrica, nem a administração de Na_2S foram capazes de alterar a taxa de consumo de oxigênio (figura 18) e o consumo total de oxigênio (figura 19) nos 10 min. avaliados.

Figura 18. Taxa de consumo de oxigênio após 8 min. da administração icv de Na_2S . Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média.

Figura 19. Consumo total de oxigênio dos 10 min. avaliados (8 aos 18 min.). Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média.

6.14 Eliminação de gás carbônico (VCO_2) após administração icv de Na_2S

A privação hídrica de 24 horas foi capaz de reduzir a taxa de eliminação de CO_2 (tratamento: $F_{1;12} = 5,90$, $p < 0,05$) bem como, a eliminação total de 10 min. (tratamento: $F_{1;12} = 5,37$, $p < 0,05$), porém a injeção central de Na_2S não alterou as respostas observadas (figuras 20 e 21).

Figura 20. Taxa de eliminação de gás carbônico após 8 min. da administração icv de Na_2S . Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Figura 21. Eliminação total de gás carbônico dos 10 min. avaliados (8 aos 18 min.). Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. ANOVA fatorial seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.15 Taxa de troca respiratória (RER) após administração icv de Na₂S

O estímulo da privação hídrica de 24 horas reduziu a RER (tratamento: $F_{1;12} = 53,82$, $p < 0,0001$), não tendo nenhum efeito o Na₂S (figura 22).

E, de forma específica, também foi observado que, entre os animais que receberam Na₂S icv, a RER é sempre maior entre os animais hidratados (vs. privados, $p < 0,05$).

Figura 22. Taxa de troca respiratória (RER) após 8 min. da administração icv de Na₂S. Valores expressos como médias $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo privado, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Quando a área sob a curva (AUC) destes pontos foi avaliada, para se ter uma ideia global da resposta, de 8 a 18 min., pode-se observar que a privação hídrica modulou negativamente a resposta (tratamento: $F_{1;12} = 53,85$, $p < 0,0001$), sem efeito do Na₂S (figura 23).

Especificamente, os animais hidratados obtiveram RER_{AUC} maiores (vs. privados), tanto entre aqueles que receberam Na₂S icv quanto entre os veículos ($p < 0,05$).

Figura 23. Área sob a curva (AUC) da RER dos 10 min. avaliados (8 aos 18 min.). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * significativamente diferente do respectivo grupo hidratado, $p < 0,05$. ANOVA fatorial seguida de pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6.16 Atividade das enzimas geradoras de sulfetos (S^{2-} e HS^-) do Hipotálamo Médio Basal após privação hídrica de 24 horas

A privação hídrica de 24 horas aumentou em cerca de 60% a atividade *in vitro* das enzimas hipotalâmicas geradoras de sulfetos (Hidratado: $2,9 \pm 0,4$ μmol sulfeto/mg proteína $\times$ h vs. Privado: $4,7 \pm 0,3$ μmol sulfeto/mg proteína $\times$ h; $t_{18} = 3,25$, $p < 0,05$) (figura 24).

Figura 24. Atividade das enzimas geradoras de sulfeto. * significativamente diferente do grupo hidratado, $p < 0,05$. Teste t de Student.

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a privação hídrica de 24 horas é, de forma geral, capaz de aumentar o hematócrito, a osmolalidade e as concentrações plasmáticas de proteínas e sódio ($F's \geq 5,01$ e $p's < 0,05$).

Já está bem esclarecido na literatura científica que a desidratação, provocada pela ingestão insuficiente de água (como na privação hídrica) ou pela eliminação excessiva desta (como na hemorragia, hiperidrose, diarreia, poliúria, etc.), leva a alterações rápidas de parâmetros sanguíneos como volemia e osmolalidade¹⁹.

No modelo experimental de privação hídrica de 24 horas, no qual o animal permanece sem acesso à água ou outro fluido rico em água por um dia, observa-se uma redução do volume do LEC – representada pelo aumento (indireto) da concentração plasmática de proteínas totais e do hematócrito sanguíneo²⁰ – e um aumento da osmolalidade – indicado pelo aumento (direto) da osmolalidade plasmática e da concentração plasmática de sódio (principal íon do LEC²¹).

Desde 1971, Kutscher já havia mostrado que a privação hídrica de 48 horas e de 96 horas, em ratos machos Long-Evans (85 a 150 dias de idade), era capaz de efetivamente reduzir o volume plasmático em, respectivamente, 1,37 e 1,42 vezes, com aumentos de 23% e 21,6% no hematócrito, 4,3% e 3,9% na osmolalidade plasmática, e 16,6% e 13,3% na concentração plasmática de proteínas totais. Tal autor ainda mostrou que todos estes parâmetros plasmáticos apresentavam correlação indireta forte ($r's < -0,70$, e $p's < 0,01$) com o volume plasmático (medido através da diluição sanguínea do corante azul de Evans, método de Wang), sugerindo, desta forma, indicadores indiretos menos invasivos para a aferição da volemia.

¹⁹ O LEC é representado, em ordem de grandeza, pelo líquido intersticial (16% do peso corporal), plasma (4-5%) e líquido transcelular (1-3%) (Malnic, 2008), os quais podem trocar íons e massa de água entre si com certa facilidade; desta forma, alterações do plasma levam possivelmente a alterações do líquido intersticial e transcelular, e vice-versa.

²⁰ Com a desidratação e, conseqüente, redução do volume do sangue circulante (pela perda de água), espera-se que a concentração de proteínas totais (mg de proteínas/dL de plasma) e hematócrito (volume de elementos figurados/volume de sangue) aumentem, uma vez que não há alteração do conteúdo total de proteínas ou do número de elementos figurados do sangue frente a este quadro.

²¹ Como o LEC é constituído predominantemente por sódio (140 mEq/L) e cloreto (100 mEq/L) (Malnic, 2008), grande parte da osmolalidade deste fluido é majoritariamente determinada pela concentração de cloreto de sódio em solução, de forma que pode ser estimada pela equação: $P_{osm} = 2 \times [Na^+] + 0,055 \times [glicose] + 0,35 \times [nitrogênio\ ureico]$ (Antunes-Rodrigues e cols., 2008).

Estas informações foram, no mesmo ano de 1971, confirmadas por Hatton, em ratos machos Holtzman; o qual também mostrou que, frente à privação hídrica de 48 e 72 horas, a osmolalidade e a concentração plasmática de proteínas totais já se encontravam cerca de 4% e 8,5% maiores (vs. animal hidratado); e além disso, após privações de 24, 48 e 72 horas, os animais já apresentavam pesos corporais 8%, 11% e 14% menores que quando hidratados.

Nossos resultados estão em total concordância com a literatura, justificando, pois, que os indivíduos privados encontravam-se hipovolêmicos e com o plasma hiperosmótico, isto é, com o volume do LEC reduzido e hiperosmótico.

É de se esperar que nesta situação haja fluxo de água resultante do LIC para o LEC, dado que existe um gradiente osmótico. Mas, embora as células realmente possam contribuir com uma dada massa de água para o meio externo, esta situação de desbalanço não deve prosseguir, para que não haja desidratação celular importante e prejuízo da função das células. Para isso, o organismo dos mamíferos dispõe de respostas estereotipadas que visam alterar o comportamento para a busca de água²², reabsorção de água pelos rins e aumento da pressão arterial (dada a hipovolemia).

A consequente redução do volume do LIC frente à desidratação ocorre em virtualmente todas as células do organismo; contudo, esta é principalmente identificada quando atinge células especializadas, as quais geram respostas potentes e complexas. Estas células especializadas são neurônios osmossensíveis localizados em áreas desprovidas de barreira hematoencefálica que projetam informações, por exemplo, ao hipotálamo, *locus coeruleus* e núcleo dorsal da rafe, de onde respostas comportamentais (para a busca de água) e para secreção hormonal são geradas.

Nossos resultados mostraram que a privação hídrica de um dia foi potente para, na reoferta dos fluidos, aumentar a busca por água ($F's \geq 163,2$ e $p < 0,001$) e salina hipertônica ($F's \geq 7,6$ e $p < 0,01$) dos animais desidratados (vs. hidratados). Desde 1960, Kessen e cols. já mostravam que quanto maior fosse o período de privação de hídrica (0 a 47 horas), maior era a ingestão de água após a sua

²² Na hiperosmolalidade do LEC, há inicialmente uma busca por água visando diluir o soluto (correção da osmolalidade); todavia, uma eventual redução excessiva da osmolalidade do LEC pela ingestão de água também pode causar dano celular (entrada excessiva de água na célula); daí a importância do apetite ao sódio (Antunes-Rodrigues e cols., 2008), para correção de gradiente osmótico entre LEC-LIC.

reapresentação; entretanto, foi apenas 19 anos depois, que Saad e cols. (1979), ao realizar lesões na área septal (SA) e/ou SFO, comprovaram que o SFO era uma estrutura muito importante para iniciar o comportamento de ingestão de água, e que a SA apresentava comportamento inibitório sobre o SFO. Atualmente, sabemos que o circuito é bem mais complexo e envolve muitas outras áreas²³.

Desta forma, em nosso modelo, observa-se, como na literatura, que, além das alterações dos parâmetros plasmáticos, há também alteração do padrão comportamental de ingestão de água e sódio, onde a forte busca inicial por água é o mecanismo básico para a correção da hiperosmolalidade plasmática.

Além disso, também pudemos observar que a restrição hídrica de um dia aumenta potentemente a secreção dos hormônios neuroipofisários: AVP e OT. Neste modelo, a privação aumentou em cerca de 4 vezes as concentrações plasmáticas de AVP (vs. hidratados; $F_{1;43} = 74,9$; $p < 0,001$) e de OT (vs. hidratados; $F_{1;31} = 50,0$; $p < 0,001$).

Informações relativas à hiperosmolalidade advindas dos órgãos circunventriculares chegam ao hipotálamo estimulando a secreção de AVP e OT, enquanto a hipovolemia periférica estimula a secreção renal de renina que culmina, após várias etapas, com a elevação plasmática dos níveis de ANG II; e reduz a secreção de ANP pelos cardiomiócitos atriais.

A AVP é capaz de aumentar a reabsorção de água nos rins (ao incorporar canais aquaporina 2 ao túbulo distal e coletor), aumentar a pressão arterial (ao atuar sobre receptores V1a dos vasos sanguíneos, gerando vasoconstrição), modular positivamente o comportamento de sede, e atuar como secretagogo de ACTH (através de receptores V1b). Ji e cols. (2005) mostraram, em ratos Sprague-Dawley adultos machos, que a privação hídrica de 24 horas é um estímulo potente para aumentar os níveis plasmáticos de AVP em cerca de 10 vezes (vs. controles

²³ Sinais do SFO e OVLT parecem ser integrados primeiramente no núcleo pré-óptico medial (MnPO), de onde partem sinais para os núcleos hipotalâmicos PVN e SON (secretores de AVP e OT), os quais também recebem informações da área postrema (AP), núcleo do trato solitário (NTS), núcleo parabraquial (NPB) e núcleos bulbares noradrenérgicos, com os quais o MnPO apresenta conexões recíprocas. O NTS também se conecta a estruturas telencefálicas subcorticais (relacionadas ao processamento da informação envolvida com o controle da sede e do apetite ao sódio, tais como a amígdala estendida, substância inominada subltenticular e neurônios dos grupos medial e central da amígdala), as quais, juntamente às áreas telencefálicas corticais, área insular agranular e córtex límbico pré-frontal, estariam relacionadas com a integração e coordenação das informações endócrinas e autonômicas com o comportamento motivado requerido para a busca e ingestão de água e sódio (De Luca Jr. e cols., 2005).

hidratados), e que a privação hídrica de 48 horas não resulta em maior secreção que o modelo anterior.

Já a OT, de forma independente, atua gerando natriurese e caliurese nos rins, e promove centralmente inibição do apetite ao sódio e à água. Kadekaro e cols. (1992) mostraram que, em ratos Sprague-Dawley adultos machos, a privação hídrica de 24 horas era capaz de aumentar em 72% a concentração plasmática de OT (vs. animais hidratados), e que as privações de 48h e 72h potenciavam esta secreção em 51% e 65% respectivamente. Além disso, também observaram que, após 48 horas, o conteúdo pituitário de OT decrescia 52,5% em relação aos controles hidratados²⁴.

A avaliação da concentração plasmática de ANP de nossos animais mostrou valores reduzidos (cerca de duas vezes menores) frente à privação hídrica (tratamento: $F_{1;35} = 47,2$; $p < 0,001$), uma vez que o ANP é secretado pelos cardiomiócitos atriais frente ao estímulo mecânico do estiramento [atuando sobre os rins e vasos, induzindo vasodilatação, natriurese e diurese, além de centralmente inibir a ingestão de água (Antunes-Rodrigues e cols., 1985; Aires, 2008)]. Estudos de Januszewicz e cols., em 1986, ressaltam que, em ratos Sprague-Dawley machos adultos, privações hídricas de 24h, 48h e 72h, são capazes de reduzir as concentrações plasmáticas de ANP em 3, 6 e mais de 8 vezes respectivamente.

Em relação à ANGII, nossos dados mostram um aumento de 3 vezes sobre a concentração plasmática deste hormônio ($F_{1;33} = 28,2$; $p < 0,001$). A ANGII gerada sistemicamente age aumentando a resistência periférica e volume do LEC, porém pode centralmente induzir à rápida ingestão de água e secreção de AVP. Bennett e Gardiner, já em 1987, estudando tanto ratos Long-Evans quanto Brattleboro, após respectivamente 53h e 14h de privação hídrica, observaram aumentos de 465% e 424% sobre a secreção plasmática de ANGII²⁵.

Todas as informações, tanto sobre nosso experimentos quanto sobre a literatura, dadas até o momento servem para destacar que, de forma geral, após a

²⁴ Kadekaro e cols. também demonstraram que, após 24 horas de privação hídrica, os níveis plasmáticos de AVP aumentavam em 4 vezes, com redução do conteúdo pituitário em 24%. Ademais, observaram que a razão $[AVP]/[OT]_{\text{pituitária}}$ não se alterava frente às privações de 24h, 48h e 72h ou controle hidratado, mantendo-se em cerca de 0,7, sugerindo que o conteúdo de OT é maior que aquele de AVP. De forma única na literatura biomédica também mostram que pH, PO_2 e PCO_2 arteriais e glicose plasmática não são parâmetros alterados pela privação hídrica.

²⁵ Estes autores também observaram aumentos de 46% e 44% sobre a concentração plasmática de aldosterona, em ratos Long-Evans e Brattleboro respectivamente.

privação hídrica de um dia, animais normais apresentam-se hipovolêmicos e com plasma hiperosmótico (e hipernatrêmico), e com concentrações plasmáticas de AVP, OT e ANGII aumentadas, visando induzir o comportamento inicial de sede e aversão ao sódio, reabsorção renal de água e excreção de sódio, e contração da musculatura lisa dos vasos; tendo todos estes mecanismos o objetivo final de restaurar o volume do LEC e sua osmolalidade para que as células e tecidos do organismo sejam adequadamente perfundidos, com fornecimentos de adequados de gases e nutrientes.

Para que todos estes mecanismos operem de forma adequada, deve haver formas de controle subjacentes. Atualmente grande parte das pesquisas têm se focado no estudo de gases com atividades modulatórias, como o NO, CO e H₂S.

Muitos estudos sobre as ações do NO sobre o sistema de balanço hidroeletrólítico foram realizados. Calapai e cols. (1992), Ventura e cols. (2002), Reis e cols. (2010), e Gomes e cols. (2004 e 2010) já demonstraram tanto *in vivo* quanto *in vitro*, utilizando doadores (SNP), precursores (L-arginina) ou inibidores da síntese de NO (L-NAME ou L-NMMA), que este gás é um agente capaz de modular negativamente a secreção dos hormônios AVP e OT, além de inibir o comportamento de sede frente à administração icv de ANGII ou privação hídrica, sem que haja comprometimento da concentração periférica de ANGII, ANP ou outros hormônios. Especificamente, Gomes e cols. (2010) observaram que a administração de um inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, podia reverter a secreção diminuída de OT frente ao SNP, mostrando que o mecanismo de ação do NO podia depender da geração de cGMP. E, além disso, a administração de um inibidor da HO, o ZnPPIX, levava à maior atividade da NOS e menor secreção de OT, sugerindo que o sistema nitrérgico podia ser modulado pelo sistema do CO.

Através de nossos dados, podemos observar, em acordo com estes autores, que frente à privação hídrica de 24 horas há um grande aumento (125% em relação ao grupo hidratado) na geração hipotalâmica de nitratos/nitritos (metabólitos do NO), onde o NO provavelmente se encontra modulando negativamente a secreção de AVP e OT – atuando como um “freio” ao eixo hipotálamo-neuroipofisário. De fato, Ventura e cols. (2008), através de estudos eletrofisiológicos (com L-arginina e L-NAME), mostraram que o NO pode inibir a atividade de neurônios magnocelulares hipotalâmicos (independentemente de GABA), o que, portanto, reduz a secreção de AVP e OT.

A partir de 1996, um novo gás, o H_2S , surgiu como modulador neuronal. Neste ano, Abe e Kimura observaram²⁶ que, em fatias de hipocampo, a aplicação de um doador inorgânico, o NaHS a 130 μM , podia induzir potenciação a longo prazo (LTP) por meio da ativação de receptores NMDA²⁷, aumentando a corrente de entrada.

Vários estudos sobre as possíveis ações centrais (e periféricas) do H_2S foram surgindo, entretanto foi apenas em 2008, que Dawe e cols. demonstraram uma possível ação hipotalâmica do gás. Estes autores realizaram microinjeções de NaHS (200 mM) e SAME (S-adenosil-L-metionina, doador orgânico de cisteína e ativador da CBS, 0,1 e 1 mM) no hipotálamo posterior de ratos acordados e observaram reduções na pressão arterial média e frequência cardíaca; efeitos estes que foram revertidos de maneira dose-dependente pela pré-aplicação de glicazida (na dose de 300 nM a 3 μM ; inibidor de canal de K_{ATP}), sugerindo que o efeito fosse mediado por canais K_{ATP} . Houve também a aplicação de aminooxiacetato (AOA, 10 mM) e hidroxilamina (20 mM) no hipotálamo posterior, ambos inibidores da CBS, resultando em aumento da pressão arterial média; o que sugere que o H_2S é gerado no hipotálamo e que, provavelmente, realiza um controle inibitório sobre estes parâmetros cardiovasculares. Estes resultados foram repetidos em 2011 pelo grupo de Liu e cols., porém através de administração icv, com efeitos revertidos através de outro inibidor de canal K_{ATP} , a glibenclamida; reforçando o achado anterior. Em 2012, Kwiatkoski e cols., ao administrar NaHS ou AOA, icv ou intra-AVPO (região hipotalâmica ânteroventral pré-óptica), durante hipóxia de 7% O_2 , observaram uma acentuação (frente à administração de NaHS) e uma redução (frente ao AOA) da queda da temperatura corporal, sugerindo, que nesta situação, o H_2S no hipotálamo seria um importante agente de modulação térmica.

Finalmente, em 2013, Khademullah e Ferguson demonstraram por estudos eletrofisiológicos que todos os tipos de neurônios hipotalâmicos (magnocelulares, parvocelulares neuroendócrinos e parvocelulares pré-autonômicos) respondiam ao H_2S (0,1 a 50 mM de NaHS) despolarizando majoritariamente (cerca de 80% das subpopulações celulares hipotalâmicas) em intensidades dose-dependentes. Tal

²⁶ Além de que o H_2S podia ser gerado, no sistema nervoso central, a partir de L-cisteína por ação catalisada pela enzima cistationina-beta-sintase (CBS).

²⁷ Kimura (2000) sugere que concentrações fisiológicas de H_2S favoreçam a fosforilação de sítios específicos do receptor NMDA por PKA, como observado em culturas de neurônios, células gliais e oócitos.

abordagem explicitou um ponto muito importante da ação deste gás sobre as células hipotalâmicas.

Em nossos estudos, pudemos observar que a privação hídrica de 24 horas, por si só, aumenta a capacidade endógena de produção de sulfetos em 60%; e ademais, a administração icv de Na_2S (doador inorgânico de H_2S ; 260 nmol) é capaz de, na privação hídrica de 24 horas, potenciar a secreção de AVP e OT, como visto através das concentrações plasmáticas destes hormônios (vs. grupo privado/veículo). Frente à administração do doador, a AVP plasmática aumentou 60% ($F_{1;43} = 7,6$; $p < 0,01$), e a OT, cerca de 300% ($F_{1;31} = 20,6$; $p < 0,001$); porém, sem quaisquer alterações para os níveis plasmáticos de ANGII, ANP e PRL.

Estes resultados são corroborados pelos achados de Khademullah e Ferguson (2013), uma vez que, para que haja maior secreção de AVP e OT, é necessária maior despolarização das populações de neurônios magnocelulares do PVN e SON. É também provável que tal efeito de potenciação do H_2S esteja ocorrendo por modulação de canais de K_{ATP} , como já observado por Dawe e cols. (2008), Liu e cols. (2011), e Ren e cols. (2011)²⁸.

De forma interessante, também pudemos notar que a administração icv de Na_2S aumentou a concentração plasmática de corticosterona dos animais privados (vs. privados/veículo, e vs. hidratados/ Na_2S) ($F_{1;37} = 5,6$, $p < 0,01$); contudo, todos os outros grupos apresentaram níveis muito próximos do hormônio. Além disto, não houve qualquer alteração de prolactina²⁹ plasmática.

Kant e cols., em 1983, demonstraram que, de forma geral, ratos expostos ao estresse, seja ele crônico ou agudo, apresentam aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona e prolactina, e redução da concentração plasmática de hormônio de crescimento, independentemente do sexo do indivíduo. Estes resultados, quando aplicados ao nosso modelo, sugerem que o aumento na corticosterona plasmática observado seja realmente decorrente da privação hídrica em associação à injeção de Na_2S , uma vez que a prolactina não se alterou nem frente ao tratamento, nem frente à droga; e os outros três grupos (hidratado/veículo, hidratado/ Na_2S , privado/veículo) expressaram níveis de corticosterona bem próximos e inferiores ao

²⁸ Ren e cols. (2011) foram capazes de observar aumento de pressão arterial média frente à administração icv de beta-mercaptopiruvato, o que sugere a participação da via dependente de 3-MST no SNC.

²⁹ Scacchi e cols. (1989) mostraram que tanto a privação de alimentos, quanto a privação hídrica em ratos reduzem as concentrações séricas de prolactina e hormônio luteinizante (LH); por outro lado, Juszczak (1998) não encontrou alterações da concentração deste hormônio frente à privação hídrica.

grupo privado/ Na_2S . Além disso, como Khademullah e Ferguson (2013) também observaram maior despolarização de neurônios parvocelulares neuroendócrinos frente à administração de Na_2S , é possível que uma maior atividade e secreção de neurônios hipotalâmicos vasopressinérgicos parvocelulares que atingem a adenoipófise tenha estimulado a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual aumenta a secreção de glicocorticoides das adrenais.

Quando analisamos a produção hipotalâmica de NO em resposta à privação hídrica e administração icv de Na_2S , encontramos uma redução de 67% no conteúdo de nitratos/nitritos (vs. privado/veículo) ($F_{1;30} = 8,1$; $p < 0,01$).

Mancuso e cols. (2010) relatam que, teoricamente, tanto o NO quanto o CO podem inibir a atividade da CBS; contudo, análises mais cuidadosas têm mostrado que apenas o CO tem um papel importante em tal alça regulatória. De forma reversa, o H_2S é capaz de sequestrar o NO transformando-o em S-nitrosotiol (ou tionitrito), um composto inativo. Além disso, o H_2S também estimula a atividade da HO e aumenta a formação de CO (ao ativar o fator Nrf2), o qual, como já mostrado por Gomes e cols. (2010), parece inibir a atividade da NOS.

Assim, o menor conteúdo de nitratos, em nosso modelo, pode tanto ser resultado de um sequestro químico do NO, quanto um efeito indireto da maior atividade da HO, o que reduziria a geração de NO pela NOS. Por sua vez, a menor geração de NO também pode contribuir para uma maior secreção dos hormônios AVP e OT, como já abordado anteriormente. Ademais, Rivier e Shen (1994) mostraram que a pré-administração intravascular (iv) de L-NAME (30 mg/Kg) significativamente aumenta a ação estimulatória da AVP (0,9 $\mu\text{g/Kg}$) e OT (30 $\mu\text{g/Kg}$) sobre a secreção de ACTH. Isto sugere que, em situação de baixa produção de NO e alta secreção de AVP e OT, como no nosso modelo, a secreção de ACTH pode estar aumentada, o que leva também a níveis maiores de corticosterona plasmática.

Tendo em vista este panorama, ilustrado por altos níveis hormonais de AVP e ANGII, baixa concentração plasmática de ANP e baixo conteúdo hipotalâmico de NO (frente a administração de Na_2S), esperaríamos que a ingestão inicial de água (após a reoferta) fosse bastante alta³⁰; todavia encontrou-se exatamente o oposto: os

³⁰ Calapai e cols. (1992), e Reis e cols. (2010) mostraram que a inibição do sistema nitrérgico por L-NAME aumentava a ingestão de água induzida por privação hídrica ou administração icv de ANGII; Szczepańska-Sadowska e cols. (1982) observaram que a injeção icv de AVP levava à ingestão de água e redução da osmolalidade plasmática; Antunes-Rodrigues e cols. (1985), ao administrar ANP icv, encontraram inibição da sede em ratos previamente privados de fluidos.

animais privados de água por 24 horas, quando submetidos à injeção icv de Na₂S, beberam menos água que os controles privados.

Deve-se lembrar, então, que o aumento na secreção de OT foi cerca de 240% maior que o aumento de AVP, entre os animais privados (Na₂S vs. veículo). Fitts e cols. (2003) observaram que a administração icv de ornitina vasotocina (antagonista do receptor de OT; 10 µg) em ratos Long-Evans hidratados levava a um aumento significativo (mais de cinco vezes) da ingestão cumulativa de água e salina 0,3 M por 30 min. Este resultado sugere que a OT exerce efeito inibitório potente sobre a ingestão de fluidos. Desta forma, a maior secreção de OT, frente ao estímulo de Na₂S, poderia ter inibido fortemente a ingestão inicial de água.

Também foi observado que a inibição da CBS, através da administração icv de AOA (200 pmol), aumentava, de forma oposta ao Na₂S, a ingestão de água entre os animais privados, mas não entre os animais hidratados; isto sugere que realmente alguma via modulada pelo H₂S endógeno pode estar relacionada direta ou indiretamente à ingestão de fluidos e ao balanço hidroeletrólítico.

Em nosso modelo, também buscamos avaliar se, frente à privação hídrica e fornecimento de H₂S exógeno no ventrículo lateral, haveria alterações de parâmetros metabólicos (VO₂, VCO₂ e RER), uma vez que Blackstone e cols. (2005) demonstraram que, em camundongos *Mus musculus*, a administração inalatória de 80 p.p.m. de H₂S (H₂S_g) era capaz de, já nos primeiros 5 min., reduzir em aproximadamente 50% o VO₂ e em 60%, o VCO₂; além disso, observaram, após 6h de inalação, redução da temperatura corporal para 15°C (em temperatura ambiente de 13°C), e queda do VO₂ e VCO₂ para 10% dos valores controles. Após este período, com a remoção do H₂S_g da câmara, os animais recuperaram os valores pré-inalação e pareciam não demonstrar sequelas neurológicas, sugerindo que o H₂S_g pudesse induzir o estado de animação suspensa, muito parecido aos estágios iniciais da hibernação, reduzindo a taxa metabólica e a temperatura corporal.

Não observamos, entretanto, alterações dos parâmetros metabólicos gasosos VO₂, VCO₂ e RER frente à administração icv de Na₂S (vs. veículo), o que mostra que a taxa metabólica do animal e, provavelmente, sua temperatura³¹ mantiveram-se inalteradas neste caso.

³¹ Segundo Branco e cols. (2005), mamíferos e aves (animais endotérmicos) possuem alta taxa metabólica e, portanto, alta capacidade de gerar calor, regulando sua temperatura corporal por

Muitos autores já demonstraram que AVP é capaz de induzir hipotermia e agir como antipirético (Paro e cols., 1985; Poulin e Pittman, 1993; Drago e cols., 1997; Steiner e cols., 1998); além de apresentar concentrações plasmáticas e líquóricas aumentadas durante a febre (Branco e cols., 2005). Estes dados indicam, pois, que a AVP atua na regulação neuroendócrina da temperatura corporal e que sua secreção pode ser modulada por sinais térmicos. Em nosso experimento, uma temperatura corporal constante indicaria que as secreções aumentadas de AVP, OT e CORT não são produtos indiretos do controle neuroendócrino da temperatura corporal, mas resultado da ação do H₂S sobre as respostas do balanço hidroeletrólítico.

Encontramos, todavia, que tanto o VCO₂ quanto a RER são alterados pela privação hídrica de 24 horas.

Armstrong e cols., em 1980, mostraram que o peso corporal de ratos Wistar (de 120 dias) diminui rapidamente após a privação hídrica de 24, 48, 72 ou 96 horas, indicando que, apesar da manutenção da ração *ad libitum*, os animais ingerem menos alimento nesta condição. Desta forma, o metabolismo oxidativo se altera, dado que na ausência de glicose (por ingesta reduzida de alimento ou jejum) o organismo disponibiliza outros substratos, como as proteínas dos músculos e os lipídios do tecido adiposo para a geração de energia (Migliorini e Kettelhut, 2008), o que gera modificações na RER.

Segundo Beals e cols. (1999), de forma geral para os carboidratos, para cada molécula de CO₂ gerada no metabolismo oxidativo, consome-se uma molécula de O₂ (equação 7).

Assim, quando o metabolismo oxidativo utiliza basicamente glicose como substrato, encontra-se uma RER de teoricamente 1 (equação 8).

$$RER = \frac{VCO_2}{VO_2} = \frac{n}{n} = 1 \quad (\text{Equação 8})$$

Porém, em um quadro de jejum ou menor ingesta alimentar, como no caso induzido por privação hídrica, onde há prevalência de outro substrato energético que não um carboidrato, a RER geralmente corresponde a valores menores do que 1.

De forma geral, as gorduras saturadas exibem RER de aproximadamente (0,7) (equações 9 e 10), enquanto os aminoácidos apresentam RER de cerca de 0,8.

$$RER = \frac{3n+6}{4,5n+3,75} \approx 0,7 \quad (\text{Equação 10})$$

Como se pode notar, as gorduras e os aminoácidos geram menos moléculas de CO_2 para cada molécula de O_2 utilizada.

Em nosso modelo, frente à privação hídrica, não houve alteração do VO_2 , porém houve redução do VCO_2 . Isto significa que, provavelmente o animal reduziu a sua ingesta alimentar, e modificou seu substrato oxidativo de glicose para aminoácidos, uma vez que a RER atingiu valores de cerca de 0,8. E, como, frente à administração de Na_2S , nenhum parâmetro de alterou, pode-se afirmar que, neste modelo, a administração exógena de H_2S não alterou o padrão metabólico do animal.

8. CONCLUSÃO

De forma inédita, demonstramos que a privação hídrica de 24 horas aumenta a produção de sulfetos pelo hipotálamo médio basal.

O H_2S se mostrou como um potente agente modulador sobre a concentração plasmática de AVP e OT, conteúdo hipotalâmico de NO, e ingestão de água, no modelo de privação.

Os níveis aumentados de AVP e OT podem ser resultados tanto indiretos da inibição do H_2S sobre o sistema nitrérgico (por sequestro de NO; ou por estimulação do sistema do CO, o qual tem ação inibitória sobre a NOS), quanto diretos da atuação do H_2S sobre canais de K sensíveis a ATP, receptores NMDA, receptores GABA_B , e canais de cálcio dos neurônios hipotalâmicos.

A redução da ingestão de água é provavelmente resultado da secreção bastante aumentada de OT, a qual inibe a ingestão de fluidos.

O esquema abaixo ilustra estas observações (figura 25).

Figura 25. Resultados observados e suas possíveis explicações, expostos de forma esquemática. As setas verdes representam estímulo, enquanto as setas vermelhas indicam inibição. Os itens em roxo foram efetivamente medidos em nosso modelo, enquanto os itens em preto representam os achados da literatura.

9. BIBLIOGRAFIA

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 3, p. 1066-1071, 1996.

AIRES, M.M. Papel do Rim na Regulação do Volume e da Tonicidade do Fluido Extracelular. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 748-767.

ANDERSSON, B.; MCCANN, S.M. The effect of hypothalamic lesions on the water intake of the dog. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 35, n. 3-4, p. 312-320, 1956.

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

ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L.K.; CASTRO, M.; DE LUCA JR, L.A.; VIVAS, L.M.; MENANI, J.V. Regulação do Balanço Hidroeletrolítico. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 1119-1136.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S.M.; ROGERS, L.C.; SAMSON, W.K. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n. 24, p. 8720-8723, 1985.

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, 2005, p. 81-115.

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

ARMSTRONG, S.P.; SEEGER, R.M.; AYOUB, M.A.; FELDMAN, B.J.; PFLEGER, K.D. Characterization of three vasopressin receptor 2 variants: an

apparent polymorphism (V266A) and two loss-of-function mutations (R181C and M311V). *PLoS One*, v. 8, n. 6, e65885, 2013.

BEALS, M.; GROSS, L.; HARRELL, S. Metabolism for Energy and the Respiratory Quotient. Disponível em: <<http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/webmodules/respiratoryquotient.html>>, acessado em 12/10/2013.

BEAUCHAMP, R.O. Jr.; BUS, J.S.; POPP, J.A.; BOREIKO, C.J.; ANDJELKOVICH, D.A. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 13, n. 1., p. 25-97, 1984.

BENNETT T, GARDINER SM. Water deprivation: effects on fluid and electrolyte handling and plasma biochemistry in Long-Evans and Brattleboro rats. *The Journal of Physiology*, v. 385, p. 35-48, 1987.

BLACKSTONE, E.; MORRISON, M.; ROTH, MB. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, v. 308, n. 5721, p. 518, 2005.

BOTELHO, L.M.; BLOCK, C.H.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*, v. 15, n. 4, p. 723-729, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCO, L.G.; STEINER, A.A.; BÍCEGO, K.C. Regulação Neuroendócrina da Temperatura Corporal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L.K.; CASTRO, M. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 64-80.

CALAPAI, G.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; ZINGARELLI, B.; CAMPO, G.M.; CILIA, M.; CAPUTI, A.P. Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour. *Neuropharmacology*, v. 31, n. 8, p. 761-764, 1992.

CALDWELL, H.K.; LEE, H.J.; MACBETH, A.H.; YOUNG, W.S. Vasopressin: Behavioral Roles of an "Original" Neuropeptide. *Progress in Neurobiology*, v. 84, n. 1, p. 1-24, 2008.

CAO, T; FENG Y. The (pro)renin receptor and body fluid homeostasis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 305, n. 2, p. 104-106, 2013.

CHEN, L.; ZHANG, J.; DING, Y.; LI, H.; NIE, L.; YAN, X.; ZHOU, H.; ZHENG, Y. K(ATP) channels of parafacial respiratory group (pFRG) neurons are involved in H₂S-mediated central inhibition of respiratory rhythm in medullary slices of neonatal rats. *Brain Research*, v. 1527, p. 141-148, 2013.

CHEN, S.H.; LIN, M.T.; CHANG, C.P. Ischemic and oxidative damage to the hypothalamus may be responsible for heat stroke. *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 2, p. 129-140, 2013.

DAWE, G.S.; HAN, S.P.; BIAN, J.S.; MOORE, P.K. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience*, v. 152, n. 1, p. 169-177, 2008.

DE LUCA JR, L.A.; PEREIRA-DERDERIAN, D.T.; VENDRAMINI, R.C.; DAVID, R.B.; MENANI, J.V. Water deprivation-induced sodium appetite. *Physiology & Behavior*, v. 100, n. 5, p. 535-544, 2010.

DE LUCA JR, L.A.; VIVAS, L.M.; MENANI, J.V. Controle Neuroendócrino da Ingestão de Água e Sal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L.K.; CASTRO, M. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 116-134.

DE MAGALHÃES-NUNES, A.P., BADAUÊ-PASSOS JR, D.; VENTURA, R.R.; GUEDES, D. DA S JR; ARAÚJO, J.P.; GRANADEIRO, P.C.; MILANEZ-BARBOSA, H.K.; DA COSTA-E-SOUSA, R.H.; DE MEDEIROS, M.A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; REIS, L.C. Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. *Experimental Physiology*, v. 92, n. 5, p. 913-922, 2007.

DORMAN, D.C.; STRUVE, M.F.; GROSS, E.A.; BRENNEMAN, K.A. Respiratory tract toxicity of inhaled hydrogen sulfide in Fischer-344 rats, Sprague-Dawley rats, and B6C3F1 mice following subchronic (90-day) exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 198, n. 1, p. 29-39, 2004.

DRAGO, F.; STANCIU, M.; SALEHI, S.; SCAPAGNINI, U. The block of central vasopressin V1 but not V2 receptors suppresses grooming behavior and hypothermia induced by intracerebroventricular vasopressin in male rats. *Peptides*, v. 18, n. 9, p. 1389-1392, 1997.

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 82, n. 4, p. 1243-1247, 1997.

FITTS, D.A.; THORNTON, S.N.; RUHF, A.A.; ZIERATH, D.K.; JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. Effects of central oxytocin receptor blockade on water and saline intake, mean arterial pressure, and c-Fos expression in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 286, n. 6, p. 1331-1339, 2003.

FORSLING, M.L.; WILLIAMS, H. Central effects of dopamine on vasopressin release in the normally hydrated and water-loaded rat. *The Journal of Physiology*, v. 346, p. 49-59, 1984.

FORTALEZA, E.A.; SCOPINHO, A.A.; CORRÊA, F.M. Cardiovascular responses to microinjection of noradrenaline into the medial amygdaloid nucleus of conscious rats result from α_2 -receptor activation and vasopressin release. *The European Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 9, p. 1677-1684, 2011.

FRANCESCATO, H.D.; MARIN, E.C.; CUNHA, F DE Q.; COSTA, R.S.; SILVA, C.G.; COIMBRA, T.M. Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. *Archives of Toxicology*, v. 85, n. 12, 1597-1606, 2011.

FURNE, J.; SAEED, A.; LEVITT, M.D. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values.

American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 295, n. 5, p. 1479-1485, 2008.

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. *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 Research*, v. 1016, n. 1, p. 33-39, 2004.

GUTKOWSKA, J.; TREMBLAY, J.; MEYER, R.; MARCINKIEWICZ, M.; NEMER, M. Evidence for atrial natriuretic peptide (ANP) synthesis and the presence of ANP-transducing receptors in the rat olfactory bulb. *Journal of Neurochemistry*, v. 57, n. 6, p. 1855-1861.

GOURINE, A.V.; ABRAMOVA, A.Y.; PERTSOV, S.S.; SUDAKOV, K.V. ATP concentration in the cingulum bundle of rats during stimulation of the ventromedial hypothalamus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 152, n. 4, p. 389-391, 2012.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. The Body Fluid Compartments: Extracellular and Intracellular Fluids; Interstitial Fluid and Edema. In: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Textbook of Medical Physiology*. Estados Unidos: Elsevier Inc., 2006, p. 291-306.

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. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 17, p. 7902-7906, 1995.

HAN, Y.; QIN, J.; CHANG, X.; YANG, Z.; BU, D.; DU, J. Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neuroscience Research*, v. 53, n. 2, p. 216-219, 2005.

HATTON GI. Time course of blood changes during acute water deprivation in rats. *Physiology & Behavior*, v. 7, n. 1, p. 35-38, 1971.

HORVITZ, J.C.; RICHARDSON, W.B.; ETTEMBERG, A. Dopamine receptor blockade and reductions in thirst produce differential effects on drinking behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 45, n. 3, p. 725-728, 1993.

HU, H.; SHI, Y.; CHEN, Q.; YANG, W.; ZHOU, H.; CHEN, L.; TANG, Y.; ZHENG, Y. Endogenous hydrogen sulfide is involved in regulation of respiration in medullary slice of neonatal rats. *Neuroscience*, v. 156, n. 4, p. 1074-1082, 2008.

HU, L.F.; WONG, P.T.; MOORE, P.K.; BIAN, J.S. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *Journal of Neurochemistry*, v. 100, n. 4, p. 1121-1128, 2007.

HU, L.F.; LU, M.; HON WONG, P.T.; BIAN, J.S. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 15, n. 2, p. 405-419, 2011.

JANUSZEWICZ, P.; THIBAUT, G.; GUTKOWSKA, J.; GARCIA, R.; MERCURE, C.; JOLICOEUR, F.; GENEST, J.; CANTIN, M. Atrial natriuretic factor and vasopressin during dehydration and rehydration in rats. *The American Journal of Physiology*, v. 251, n. 4, p. 497-501, 1986.

JI, L.L.; FLEMING, T.; PENNY, M.L.; TONEY, G.M.; CUNNINGHAM, J.T. Effects of water deprivation and rehydration on c-Fos and FosB staining in the rat supraoptic nucleus and lamina terminalis region. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, n. 1, p. 311-321, 2005.

JONES, D.L.; MOGENSON, G.J. Central injections of spiperone and GABA: attenuation of angiotensin II stimulated thirst. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 60, n. 5, p. 720-726, 1982.

JUSZCZAK M. Melatonin affects the oxytocin and prolactin responses to stress in male rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 49, n. 1, p. 151-163, 1998.

KADEKARO, M.; SUMMY-LONG, J.Y.; FREEMAN, S.; HARRIS, J.S.; TERRELL, M.L.; EISENBERG, H.M. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. *The American Journal of Physiology*, v. 262, n. 2, p. 310-317, 1992.

KAGAN, R.; KAINZ, V.; BURSTEIN, R.; NOSEDA, R. Hypothalamic and basal ganglia projections to the posterior thalamus: Possible role in modulation of migraine headache and photophobia. *Neuroscience*, v. 248, p. 359-369, 2013.

KANNAN, H.; IKI, K.; KUNITAKE, T.; SHIMOKAWA, A.; SAITA, M.; ISHIZUKA, Y.; HANAMORI, T. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates osmotic thirst in the rat. *Neurobiology*, v. 3, n. 3-4, p. 363-370, 1995.

KANT, G.J.; LENOX, R.H.; BUNNELL, B.N.; MOUGEY, E.H.; PENNINGTON, L.L.; MEYERHOFF, J.L. Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology*, v. 8, n. 4, p. 421-428, 1983.

KESSEN, W.; KIMBLE, G.A.; HILLMANN, B.M. Effects of deprivation and scheduling on water intake in the white rat. *Science*, v. 131, n. 3415, p. 1735-1736, 1960.

KHADEMULLAH, C.S.; FERGUSON, A.V. Depolarizing actions of hydrogen sulfide on hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *PLoS One*, v. 8, n. 5, e64495, 2013.

KIMURA H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 267, n. 1, p. 129-133, 2000.

KIMURA H. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 12, n. 9, p. 1111-1123, 2010.

KIMURA, H.; SHIBUYA, N.; KIMURA, Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 17, n. 1, p. 45-57, 2012.

KIMURA, Y.; KIMURA, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB Journal*, v. 18, n. 10, p. 1165-1167, 2004.

KLENTZ, R.D.; FEDDE, M.R. Hydrogen sulfide: effects on avian respiratory control and intrapulmonary CO₂ receptors. *Respiration Physiology*, v. 32, n. 3, p. 355-367, 1978.

KOSHIMIZU, T.A.; NAKAMURA, K.; EGASHIRA, N.; HIROYAMA, M.; NONOGUCHI, H.; TANOUE, A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological Reviews*, v. 92, n. 4, p. 1813-1864, 2012.

KUTSCHER CL. Hematocrit, plasma osmolality, and plasma protein concentration as estimators of plasma volume in hooded rats during food and water deprivation. *Physiology & Behavior*, v. 7, n. 2, p. 283-285, 1971.

KWIATKOSKI, M.; SORIANO, R.N.; FRANCESCATO, H.D.; BATALHAO, M.E.; COIMBRA, T.M.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G. Hydrogen sulfide as a cryogenic mediator of hypoxia-induced anapyrexia. *Neuroscience*, v. 201, p. 146-156, 2012.

LAWRENCE, C.L.; PROKS, P.; RODRIGO, G.C.; JONES, P.; HAYABUCHI, Y.; STANDEN, N.B.; ASHCROFT, F.M. Gliclazide produces high-affinity block of KATP channels in mouse isolated pancreatic beta cells but not rat heart or arterial smooth muscle cells. *Diabetologia*, v. 44, n. 8, p. 1019-1025, 2001.

LIU, W.Q.; CHAI, C.; LI, X.Y.; YUAN, W.J.; WANG, W.Z.; LU, Y. The cardiovascular effects of central hydrogen sulfide are related to K(ATP) channels activation. *Physiological Research*, v. 6, n. 5, p. 729-738, 2011.

ŁOWICKA, E.; BEŁTOWSKI, J. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*, v. 59, n. 1, p. 4-24, 2007.

MALNIC, G. Compartimentalização dos Fluidos do Organismo. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 51-58.

MANCUSO, C.; NAVARRA, P.; PREZIOSI, P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neurochemistry*, v. 113, n. 3, p. 563-575, 2010.

MARGATHO, L.O.; ELIAS, C.F.; ELIAS, L.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin in the central amygdaloid nucleus modulates the neuroendocrine responses induced by hypertonic volume expansion in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 25, n. 5, p. 466-477, 2013.

MATHAI, J.C.; MISSNER, A.; KÜGLER, P.; SAPAROV, S.M.; ZEIDEL, M.L.; LEE, J.K.; POHL, P. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 39, p. 16633-16638, 2009.

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. *Physiology & Behavior*, v. 99, n. 1, p. 118-124, 2010.

MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Controle Hormonal e Neural do Metabolismo Energético. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 1105-1117.

NAGAI, Y.; TSUGANE, M.; OKA, J.; KIMURA H. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB Journal*, v. 18, n. 3, p. 557-559, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Water. In: NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Inglaterra: W.H. Freeman & Company, 2008, p. 43-70.

PARO, F.M.; ALMEIDA, M.C.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G. Role of L-glutamate in systemic AVP-induced hypothermia. *Journal of Applied Physiology*, v. 94, n. 1, p. 271-277, 1985.

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

POULIN, P.; PITTMAN, Q.J. Possible involvement of brain oxytocin in modulating vasopressin antipyretic action. *The American Journal of Physiology*, v. 265, p. 151-156, 1993.

PROCOPIO, J. Transporte Passivo na Membrana. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 116-136.

QU, K.; LEE, S.W.; BIAN, J.S.; LOW, C.M.; WONG, P.T. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochemistry International*, v. 52, n. 1-2, p. 155-165, 2008.

RABER, J.; BLOOM, F.E. Arginine vasopressin release by acetylcholine or norepinephrine: region-specific and cytokine-specific regulation. *Neuroscience*, v. 71, n. 3, p. 747-759, 1996.

REIS, W.L.; SAAD, W.A.; CAMARGO, L.A.; ELIAS, L.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Central nitrenergic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. *Behavioral and Brain Functions*, v. 6, p. 64-72, 2010.

REN, Y.S.; WU, S.Y.; WANG, X.J.; YU, F.; ZHAO, J.; TANG, C.S.; OUYANG, J.P.; GENG, B. Multiple hemodynamic effects of endogenous hydrogen sulfide on central nervous system in rats. *Chinese Medical Journal*, v. 124, n. 21, p. 3468-3475, 2011.

RICE, M.E.; RUSSO-MENNA, I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*, v. 82, n. 4, p. 1213-1223, 1998.

RIVIER, C.; SHEN, G.H. In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin. *The Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 4, p. 1985-1993, 1994.

SAAD, W.A.; DE ARRUDA CAMARGO, L.A.; MORITA, N.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; COVIAN, M.R. Influence of the subfornical organ on water intake induced by septal lesion. *Acta Physiologica Latino Americana*, v. 29, n. 6, p. 323-332, 1979.

SASTRE, C.; BAILLIF-COUNIOU, V.; KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; BARTOLI, C.; CHRISTIA-LOTTER, M.A.; PIERCECCHI-MARTI, M.D.; LEONETTI, G.; PELISSIER-ALICOT, A.L. Fatal accidental hydrogen sulfide poisoning: a domestic case. *Journal of Forensic Sciences*, v. 58, p. 280-284, 2013.

SCACCHI, P.; CARBONE, S.E.; DE RONDINA, D.C.; MASTRONARDI, I.O.; SZWARCFARB, B. Starvation and dehydration: effect on hypothalamic monoamines and serum LH and prolactin. *General Pharmacology*, v. 20, n. 1, p. 111-113, 1989.

SHIBUYA, N.; TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; OGASAWARA, Y.; TOGAWA, T.; ISHII, K.; KIMURA, H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 11, n. 4, p. 703-714, 2009.

SORENSEN JR, J.P.; HARVEY, J.A. Decreased brain acetylcholine after septal lesions in rats: correlation with thirst. *Physiology & Behavior*, v. 6, n. 6, p. 723-725, 1971.

STEINER, A.A.; CARNIO, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L.G. Role of nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypothermia. *The American Journal of Physiology*, v. 275, p. 937-941, 1998.

STIPANUK, M.H.; BECK, P.W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *The Biochemical Journal*, v. 206, n. 2, p. 267-277, 1982.

STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regulatory Peptides*, v. 66, n. 1-2, p. 83-85, 1996.

SUMMAR, M.L.; PHILLIPS, J.A.; BATTEY, J.; CASTIGLIONE, C.M.; KIDD, K.K.; MANESS, K.J.; WEIFFENBACH, B.; GRAVIUS, T.C. Linkage relationships of human arginine vasopressin-neurophysin-II and oxytocin-neurophysin-I to prodynorphin and other loci on chromosome 20. *Molecular Endocrinology*, v. 4, n. 6, p. 947-950, 1990.

SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E.; SOBOCIŃSKA, J.; KOZŁOWSKI, S. Thirst impairment elicited by intraventricular administration of vasopressin antagonists. *Peptides*, v. 8, n. 6, p. 1003-1009, 1987.

SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E.; SOBOCIŃSKA, J.; SADOWSKI, B. Central dipsogenic effect of vasopressin. *The American Journal of Physiology*, v. 242, n. 3, p. 372-379, 1982.

TORDA, T.; LICHARDUS, B.; KVETNANSKÝ, R.; PONEC, J. Posterior pituitary dopamine and noradrenaline content: effect of thirst, ethanol and saline load. *Endokrinologie*, v. 72, n. 3, p. 334-338, 1978.

VECSEI, P.; HAACK, D.; LICHTWALD, K.; VIELHAUER, W. Corticosteroid and corticosteroid metabolite levels in animals immunized against corticosteroids. *Journal of Steroid Biochemistry*, v. 11, n. 1C, p. 971-980.

VENTURA, R.R.; AGUIAR, J.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VARANDA, W.A. Nitric oxide modulates the firing rate of the rat supraoptic magnocellular neurons. *Neuroscience*, v. 155, n. 2, p. 359-365, 2008.

VENTURA, R.R.; GOMES, D.A.; REIS, W.L.; ELIAS, L.L.; CASTRO, M.; VALENÇA, M.M.; CARNIO, E.C.; RETTORI, V.; MCCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Nitrgergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 9, p. 1101-1109, 2002.

YAMAGUCHI, K.; YAMADA, T. Roles of forebrain GABA receptors in controlling vasopressin secretion and related phenomena under basal and hyperosmotic circumstances in conscious rats. *Brain Research Bulletin*, v. 77, n. 1, p. 61-69, 2008.