

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**REGIS CRISTIAN ZANELLA**

**ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE**  
**PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO: EFEITOS SOBRE A INGESTÃO**  
**DE ÁGUA, EXCREÇÃO RENAL E ALTERAÇÕES**  
**CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR AUMENTO DA**  
**OSMOLARIDADE PLASMÁTICA**

**ARARAQUARA**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**REGIS CRISTIAN ZANELLA**

**ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE**  
**PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO: EFEITOS SOBRE A INGESTÃO**  
**DE ÁGUA, EXCREÇÃO RENAL E ALTERAÇÕES**  
**CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR AUMENTO DA**  
**OSMOLARIDADE PLASMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari.

**ARARAQUARA**

**2013**

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

Z28ai

Zanella, Regis Cristian.

Administração intracerebroventricular de peróxido de hidrogênio : efeitos sobre a ingestão de água, excreção renal e alterações cardiovasculares induzidas por aumento da osmolaridade plasmática / Regis Cristian Zanella. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

35 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Natriurese. 3. Ratos albinos. 4. Sede. 5. Ocitocina. 6. Ventrículo lateral cerebral. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

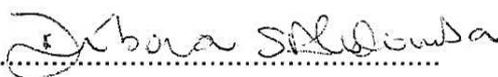
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Regis Cristian Zanella

Dia 13/05/2013

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora Simões de Almeida Colombari.....



Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior.....



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina Aparecida Fabrício de Andrade.....



## **DADOS CURRICULARES**

### **REGIS CRISTIAN ZANELLA**

NASCIMENTO	19.11.1982 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	José Antonio Zanella Aparecida Correa Zanella
2004/2008	Curso de Graduação em Fisioterapia Centro Universitário de Araraquara- Uniara
2011/2013	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).

**AO MEU PAI,  
JOSÉ ANTÔNIO**

**A MINHA MÃE,  
APARECIDA**

**A MINHA ESPOSA,  
DAIANA**

**A MINHA FILHA,  
ISADORA**

**Obrigado por estarem presentes na minha vida.**

## ***Agradecimentos***

*Agradeço especialmente a Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Débora Simões de Almeida Colombari, pela orientação, apoio e dedicação a este trabalho.*

*Aos meu pais José Antônio e Aparecida, pela vida, amor e confiança.*

*A minha filha Isadora, que é a razão de tudo na minha vida.*

*A minha querida esposa Daiana, por todo o amor, carinho e paciência nos momentos de alegria e de tensão.*

*Aos professores do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelo conhecimento adquirido nessa jornada.*

*Aos colegas e amigos pelo apoio.*

*Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Araraquara pelo suporte técnico na realização deste trabalho.*

*Ao órgão de fomento CNPq pelo suporte financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.*

Zanella RC. Administração intracerebroventricular de peróxido de hidrogênio: efeitos sobre a ingestão de água, excreção renal e alterações cardiovasculares induzidas por aumento da osmolaridade plasmática [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2013

## **RESUMO**

As espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas endogenamente podem atuar em áreas centrais modulando respostas autonômicas e comportamentais. Estudos recentes demonstraram que uma espécie reativa de oxigênio, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), injetado no ventrículo lateral (VL) reduz resposta pressora induzida pela injeção central de angiotensina II. No presente estudo investigamos os efeitos do  $H_2O_2$  sobre a resposta dipsogênica, pressora e sobre as alterações na excreção renal induzidas por aumento da osmolaridade plasmática pela administração intragástrica (ig) de NaCl 2 M (2 ml) . Ratos Holtzman (280 – 320 g) com cânulas de aço inoxidável implantadas no VL foram utilizados. Injeções de  $H_2O_2$  ou PBS foram realizadas no VL. As injeções de  $H_2O_2$  (2,5 ou 5  $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$ ) no VL reduziu a ingestão de água induzida por NaCl 2 M ig ( $3,1 \pm 0,7$  e  $3,5 \pm 1,1$  ml, vs. PBS:  $8,6 \pm 1,0$  e  $7,6 \pm 0,5$  ml/2 h,  $p < 0,05$ , respectivamente) e a natriurese ( $609,2 \pm 82,9$  e  $1290,7 \pm 80,5$ , vs. PBS:  $876,4 \pm 129,5$  e  $1443,6 \pm 67,5$   $\mu\text{Eq}/2$  h,  $p < 0,05$ , respectivamente). Por outro lado a diurese e a resposta pressora após gavagem de NaCl 2 M não foram alteradas pelo tratamento prévio com  $H_2O_2$ . Nossos dados sugerem um papel inibitório para o  $H_2O_2$  agindo centralmente na ingestão de água e na natriurese, sem alterar a resposta pressora induzida por hiperosmolaridade plasmática.

**PALAVRAS CHAVE:** Natriurese. Ingestão de líquidos. Ratos. Sede. Água.

Zanella RC. Intracerebroventricular administration of hydrogen peroxide: effects on water intake, renal excretion and cardiovascular changes induced by plasma hyperosmolality [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2013

### **Abstract**

The reactive oxygen species (ROS), produced endogenously in central areas may act by modulating autonomic and behavioral responses. Recent studies have shown that a reactive oxygen species, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), injected into the lateral ventricle (LV) reduces pressor response induced by central injection of angiotensin II. In the present study we investigated the effects of  $H_2O_2$  on the dipsogeni and pressor responses and on the changes in renal excretion induced by the increases in plasma osmolality by intragastric administration (ig) of 2 M NaCl (2 ml). Holtzman rats (280 - 320 g) with stainless steel cannula implanted in the LV were used.  $H_2O_2$  or PBS injections were made in the LV. Injections of  $H_2O_2$  (2.5 or 5  $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$ ) in the LV reduced water intake induced by ig 2 M NaCl ( $3.1 \pm 0.7$  and  $3.5 \pm 1.1$  ml, vs. PBS:  $8.6 \pm 1.0$  and  $7.6 \pm 0.5$  ml/2h,  $P < 0.05$ , respectively) and natriuresis ( $609.2 \pm 82.9$  and  $1290.7 \pm 80.5$ , vs. PBS:  $876.4 \pm 129.5$  and  $1443.6 \pm 67.5$   $\mu\text{Eq}/2$  h,  $p < 0.05$ , respectively). However, diuresis and pressor response after ig 2 M NaCl were not altered by the pre-treatment with  $H_2O_2$ . The present data suggest a inhibitory role of central  $H_2O_2$  in water intake and natriuresis without changing the pressor response induced by plasma hyperosmolality.

**KEYWORDS:** Natriuresis. Fluid intake. Rats. Thirst. Water.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados mostrando o local da injeção, indicado pela seta, no ventrículo lateral (VL), (barra = 2,0 mm).....13
- Figura 2.** Efeito do pré-tratamento com (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) ou PBS e (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre a ingestão cumulativa de água após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS, # diferente de NaCl 2 M + PBS.....14
- Figura 3.** Efeito do pré-tratamento com (A e B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) ou PBS e (C e D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre a ingestão cumulativa sacarose 2 % e água. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de PBS.....16
- Figura 4.** Efeito do pré-tratamento com (A e B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) ou PBS e (C e D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre a ingestão cumulativa de ração e água em ratos privados 24 h de ração. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de PBS.....18
- Figura 5.** Efeito do pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre as alterações no (A) volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) excreção de potássio após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS, # diferente de NaCl 2 M + PBS .....20

**Figura 6.** Efeito do pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre as alterações no (A) o volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) excreção de potássio após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS, # diferente de NaCl 2 M + PBS.....21

**Figura 7.** Efeito do pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 ou 5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre as alterações na (A) pressão arterial média e (B) frequência cardíaca após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS.....22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANG II** – angiotensina II;
- ANP** – peptídeo natriurético atrial
- ATZ** – 3-amino-1,2,4-triazole
- AVP** – vasopressina
- EPM** – erro padrão da média
- EROs** – espécies reativas de oxigênio
- FC** – frequência cardíaca
- GABA** – ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio
- icv** – intracerebroventricular;
- ig** – intragástrico
- ip** – intra-peritonal
- MIF** – fator inibitório de migração de macrófagos
- NaCl** – cloreto de sódio
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – ânion superóxido
- OT** – ocitocina
- OVL** – órgão vasculoso da lâmina terminal
- PAM** – pressão arterial média
- PAP** – pressão arterial pulsátil
- PVN** – núcleo paraventricular do hipotálamo
- OSF** – órgão subfornical;
- SNC** – sistema nervoso central;
- SON** – núcleo supra-óptico;
- SOD** – superóxido dismutase;
- VL** – ventrículo lateral

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	5
3 Material e Método .....	6
3.1 Animais.....	6
3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no ventrículo lateral (VL) .....	6
3.3 Injeções no VL .....	7
3.4 Aumento da osmolaridade plasmática.....	7
3.5 Drogas e soluções utilizadas.....	7
3.6 Medida de ingestão de líquido.....	7
3.7 Medida de ingestão de ração .....	8
3.8 Medida da excreção urinária.....	8
3.9 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	8
3.10 Histologia .....	8
3.11 Apresentação dos resultados e análise estatística.....	9
4 Protocolos experimentais.....	10
4.1 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no VL sobre a resposta dipsogênica induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M.....	10
4.2 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de sacarose 2% ou ração.....	10
4.2.1 Ingestão de sacarose 2% e água.....	10
4.2.2 Ingestão de ração e água.....	10
4.3 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no VL sobre a excreção renal de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> e volume urinário em ratos tratados ou não pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M.....	11
4.4 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no VL sobre a resposta pressora induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M .....	12
5 Resultado .....	13
5.1 Localização histológica das cânulas no VL.....	13
5.2 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no VL sobre a resposta dipsogênica induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M .....	14

5.3 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de sacarose 2% ou ração.....	15
5.3.1 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de sacarose 2% .....	15
5.3.2 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de ração.....	17
5.4 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a excreção renal de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> e volume urinário em ratos tratados ou não pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M .....	19
5.5 Efeito da administração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no VL sobre a resposta pressora induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M.....	22
6 Discussão.....	23
7 Conclusão .....	27
8 Referências Bibliográficas.....	28
Anexo.....	34

## **1 Introdução**

A manutenção da composição e do volume dos líquidos corporais dentro de uma faixa de variação restrita é fundamental para manter a pressão sanguínea adequada garantindo a perfeita irrigação tecidual. A água está distribuída no organismo em dois tipos de compartimentos: o compartimento intracelular e o extracelular, sendo que a maior parte dessa água se concentra no compartimento intracelular. O volume e a composição do compartimento extracelular são determinados em grande parte pelo equilíbrio entre a ingestão e a excreção de água e eletrólitos, em especial o sódio que representa o principal fator osmótico deste compartimento. As variações de volume e da osmolaridade dos líquidos corporais constituem um dos sinais que permitem que a excreção urinária de sódio e água varie apropriadamente de acordo com as flutuações da sua ingestão. Devido a sua capacidade única de excretar seletivamente água e sódio, os rins constituem elementos vitais para a manutenção da volemia e da osmolaridade dos líquidos corporais.

O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental na regulação cardiovascular e no controle da ingestão de água e excreção de eletrólitos e água<sup>3,15,32,35</sup>. As variações de volume ou da composição do compartimento do fluido extracelular são facilmente detectados pelo sistema nervoso central (SNC). Alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios circulantes, como a angiotensina II (ANG II) e os sinais provenientes osmorreceptores, barorreceptores e receptores cardiopulmonares alertam o SNC para tais alterações.

### **Circuitos neurais envolvidos no aumento da osmolaridade plasmática**

Dados da literatura mostram que o aumento da osmolaridade plasmática promove ativação dos osmorreceptores centrais, localizados nos órgãos circunventriculares, em especial o órgão subfornical (OSF) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT)<sup>3,9,18</sup>. Alterações na osmolaridade são percebidos pelos osmorreceptores centrais que ativam neurônios de determinados núcleo hipotalâmicos envolvidos no equilíbrio hidroeletrolítico e cardiovascular, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo supra-óptico (SON), os quais estão relacionados com secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina<sup>4,10</sup>. Com o aumento da osmolaridade plasmática é observada ingestão de água que é decorrente da ativação dos osmorreceptores centrais<sup>9,35</sup>. E a lesão do OSF reduz a

ingestão de água induzida por aumento da osmolaridade plasmática<sup>46</sup>. Além da ingestão de água, o aumento na osmolaridade plasmática pode também induzir natriurese. O mecanismo pelo qual o aumento da osmolaridade plasmática induz natriurese não está totalmente esclarecido, no entanto, um possível mecanismo envolvido é a liberação de ocitocina (OT), que é um hormônio liberado em situações de aumento da osmolaridade plasmática, responsável por induzir natriurese<sup>3,22,23,35</sup>. A OT por sua vez, além de promover diretamente natriurese, também promove a liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP), um potente hormônio natriurético<sup>19</sup>. Aumentos na pressão arterial<sup>8,17,40</sup>, na secreção de vasopressina<sup>1,8,10</sup> e na atividade simpática<sup>2,12,13,51</sup> são também observados quando há um aumento da osmolaridade plasmática.

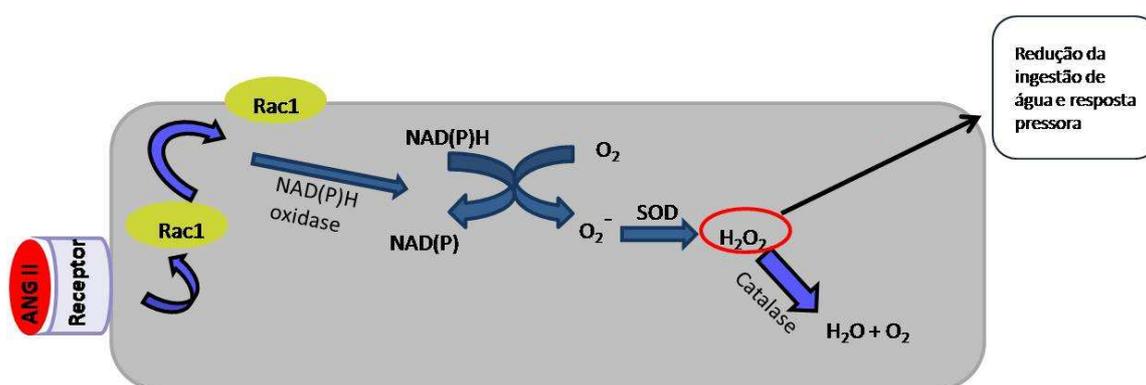
Existem várias abordagens experimentais para induzir aumento da osmolaridade plasmática, dentre elas estão a infusão intravenosa de salina hipertônica, privação hídrica por 24 a 48 horas, utilização de diuréticos ou sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Neste protocolo experimental a concentração de sódio e a osmolaridade plasmática aumentam 4%, sem alteração do volume plasmático pelo menos no período de 1 h após a administração intragástrica da solução hipertônica<sup>41</sup>.

## **Espécies reativas de oxigênio**

As espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas por suas propriedades microbicidas, compreendem espécies químicas endogenamente produzidas pelo organismo como os radicais livres superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )<sup>43,52</sup>. A alta capacidade oxidante destas espécies atribui-lhes propriedades destrutivas para as células, sendo freqüentemente associadas à morte celular e ao processo de apoptose<sup>24,25</sup>. Apesar de seu potencial citotóxico quando em altas concentrações, várias linhas de pesquisa têm demonstrado experimentalmente que tais espécies, quando em baixas concentrações, podem participar na sinalização intra e intercelular, agindo conjuntamente com mediadores químicos clássicos como a ANG II, noradrenalina e glutamato<sup>53</sup>.

No SNC, foi descrito que as ações dipsogênicas e cardiovasculares da ANG II, em camundongos, são dependentes do aumento da produção de radicais  $O_2^{\bullet-}$  por neurônios dos órgãos circunventriculares<sup>53,54</sup>. No mecanismo proposto, a ativação de receptores angiotensinérgicos, do subtipo  $AT_1$ , pela ANG II, desencadilha uma cascata bioquímica

intracelular que leva à ativação do complexo enzimático NADPH oxidase<sup>53,54</sup>. Uma vez ativada esta enzima catalisa a transferência de dois elétrons da molécula de  $\text{NAD(P)H}^+$  para duas moléculas de oxigênio formando, dessa maneira, dois radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O superóxido foi identificado como um EROs pivô nos efeitos centrais da ANG II utilizando um modelo de animal transfectado. Neste modelo animal (camundongo), partículas virais (adenovírus) carregando genes que codificam a enzima superóxido dismutase (SOD), uma enzima responsável pela dismutação do superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio, são transfectados em neurônios dos órgãos circunventriculares, por meio de injeção no ventrículo lateral. Como resultados, os neurônios transfectados passam a super-expressar a SOD diminuindo a disponibilidade do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formado quando o sistema NADPH oxidase é ativado pela ANG II<sup>53,54</sup>. A redução substancial tanto na resposta dipsogênica quanto nas cardiovasculares sugere fortemente que a geração de EROs dependente de ANG II é um evento importante para os efeitos biológicos da ANG II centralmente<sup>53,54</sup>. Entretanto, os autores que utilizaram esta técnica não levaram em consideração que apesar do aumento na atividade SOD diminuir, inquestionavelmente, a disponibilidade de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , também aumenta a disponibilidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  quando o complexo NADPH oxidase é acionado pela ANG II. Neste caso, é possível que os efeitos observados (redução da ingestão de água e resposta pressora à ANG II em ratos com superexpressão da SOD), sejam decorrentes de um aumento na disponibilidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Esquema 1).



Esquema 1- Esquema proposto para as ações inibitórias do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em células após a estimulação angiotensinérgica (adaptado de Zimmerman et al.<sup>53</sup> 2004).

De fato, estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que a resposta pressora induzida pela injeção central de ANG II foi fortemente reduzida pela injeção prévia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de 3-amino-1,2,4-triazole (inibidor da catalase), o qual aumenta os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno, sugerindo que o aumento nos níveis tanto exógeno quanto endógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulam a resposta pressora central da ANG II<sup>29</sup>.

Foi também descrito que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além da interação com o sistema angiotensinérgico, pode também interferir com o sistema colinérgico. Estudos em átrio isolado de rato demonstraram que a formação de EROs, incluindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovia uma redução dos efeitos do carbacol (agonista colinérgico) e acetilcolina no receptor muscarínico M2 cardíaco<sup>42</sup>. De maneira semelhante, estudos realizados em glândulas parótidas de ratos demonstraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atenuar a secreção de amilase induzida pelo carbacol por reduzir a mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular, que é essencial para o processo de excitação da amilase<sup>33</sup>. Esses dados sugerem que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula negativamente as ações do carbacol e da acetilcolina, seja por interferir diretamente no receptor muscarínico ou por reduzir os efeitos intracelulares decorrentes da ativação de receptores muscarínicos.

Dados da literatura sugerem que estimulação dos osmorreceptores centrais ativa vias colinérgicas e/ou angiotensinérgicas para promover seus efeitos no aumento da ingestão de água, na pressão arterial e atividade simpática e no aumento nos fatores de transcrição da família AP1, como por exemplo, a proteína c-Fos<sup>11,13,21,28,30,34,36,37</sup>. Portanto, uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula as ações angiotensinérgicas e colinérgicas é possível que também influencie a ingestão de água, a excreção renal de água e eletrólitos e a resposta pressora induzida por aumentos da osmolaridade plasmática. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula centralmente a ingestão de água, a excreção renal de água e eletrólitos e a resposta pressora induzida por aumentos da osmolaridade plasmática.

## **2 Objetivos**

Estudar os efeitos da injeção intracerebroventricular (icv) de  $H_2O_2$  sobre as respostas dipsogênica, natriurética, diurética e pressora induzidas pela administração intragástrica de NaCl 2 M.

### **3 Material e Método**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Holtzman, pesando entre 280 – 320 g fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Araraquara. Os animais foram mantidos com água de torneira e ração granulada *ad libitum* em gaiolas individuais. Os protocolos experimentais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP (processo no. 11/2012).

#### **3.2 Implante de cânulas no ventrículo lateral**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso corporal, Cristália, Itapira, SP, Brasil,) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil,) intraperitonealmente (i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o periósteo foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Após determinar o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável (10 x 0,6 mm d.i.), foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica. Através desse orifício, a cânula foi introduzida baseada nos parâmetros estereotáxicos do Atlas de Paxinos e Watson<sup>39</sup> (1986), a saber: AP = 0,1 mm rostral ao bregma; L= 1,4 mm lateral ao bregma; V = 3,3 mm abaixo da superfície do osso. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica e foram administradas uma dose profilática intramuscular (0,2 mL/rato) de pentabiótico veterinário – pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,1 mL/rato). Os experimentos iniciaram-se 6-7 dias após o implante de cânulas no VL.

### **3.3 Injeções no VL**

As injeções no VL foram realizadas com seringa de microlitro Hamilton (10 µl), conectada a uma cânula injetora de aço inoxidável com 12 mm de comprimento (2 mm a mais que a cânula guia implantada em direção ao VL), através de um tubo de polietileno (PE-10). O volume injetado foi de 1 µl em todos os protocolos experimentais.

### **3.4 Aumento da osmolaridade plasmática**

O aumento da osmolaridade plasmática foi feito com gavagem intragástrica (ig) de NaCl 2 M (2 ml), que produz elevação de 4% da osmolalidade plasmática e da concentração de sódio plasmático. Esse forte estímulo reduz a atividade da renina plasmática, mas não alteram os volumes plasmáticos, indicando que o volume do compartimento extracelular não é alterado por este procedimento<sup>41</sup>. No grupo controle foi utilizada a sobrecarga de NaCl isotônico (0,15 M; 2 ml). A sobrecarga foi administrada em animais conscientes e com pequena contenção de movimentos.

### **3.5 Drogas e soluções utilizadas**

- Peróxido de hidrogênio (2,5 µmol ou 5 µmol/ 1 µl);
- PBS (salina tamponada – veículo);
- NaCl 0,15 ou 2 M.

### **3.6 Medida da ingestão de líquido**

A quantidade ingerida de líquido nos protocolos experimentais foi quantificada através de buretas de vidro graduadas em 0,1 ml e adaptadas com um bico de metal.

### **3.7 Medida da ingestão de ração**

A quantidade ingerida de ração foi quantificada através de comedouros contendo ração que foram pesados numa balança de precisão.

### **3.8 Medida da excreção urinária**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada por gravidade em tubos graduados em 0,1 ml. As amostras de urina foram analisadas em um analisador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (NOVA 1, Nova Biomedical). A excreção total de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foi calculada como concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  multiplicado pelo volume urinário.

### **3.9 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca**

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados. No dia anterior ao experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a cateterização da artéria femoral, para o registro das variáveis cardiovasculares. Ao final da cateterização da artéria, o cateter foi exteriorizado no dorso do animal, na região próxima à escápula, e suturada na pele do mesmo. No dia seguinte, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão (Statham Gould, Cleveland, OH, USA), acoplado a um amplificador (ETH-200, CB Sciences Inc, Dover, NH, USA) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments, Sydney, AUS). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada e simultaneamente derivada da PAM a partir do sinal de PAP, a FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP.

### **3.10 Histologia**

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

### **3.11 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), de acordo com o indicado, associadas ao teste Student-Newman-Keuls, assumindo-se  $p < 0,05$ .

## **4 Protocolos Experimentais**

### **4.1 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL sobre a resposta dipsogênica induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M**

Os animais foram submetidos a 4 experimentos com um intervalo de pelo menos 3 dias entre eles e receberam os seguintes tratamentos: NaCl 0,15 M + PBS, NaCl 2 M + PBS, NaCl 0,15 M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaCl 2 M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NaCl 2 M ou 0,15 M foram administrados ig, enquanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou PBS foram injetados no VL.

Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos 4 experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos. Inicialmente, foi realizado o procedimento de gavagem ig de NaCl 2 M ou 0,15 M (2 ml). Após 1 h, foi feita microinjeção no VL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 ou 5 µmol/1 µl) ou PBS (salina tamponada, 1 µl). Imediatamente após a injeção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou PBS as buretas de água foram oferecidas aos animais e as medidas foram feitas aos 30, 60, 90, 120 minutos. Durante todo o experimento os animais não tiveram acesso à ração.

### **4.2 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de sacarose 2% ou ração.**

#### **4.2.1 Ingestão de sacarose 2% e água**

Os animais foram submetidos a dois experimentos com um intervalo de pelo menos três dias entre eles e receberam os seguintes tratamentos: PBS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL. Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos dois experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.

Os animais foram treinados a ingerir sacarose 2%, tendo acesso a essa solução diariamente por 2 h durante sete dias (sempre no mesmo horário), juntamente com acesso as buretas de água. No dia do experimento foi feita microinjeção no VL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 ou 5 μmol/1 μl) ou PBS (salina tamponada, 1 μl). Após 1 minuto buretas de água e sacarose foram simultaneamente oferecidas aos animais e as medidas foram feitas aos 30, 60, 90, 120 minutos. Durante todo o experimento os animais não tiveram acesso à ração.

#### **4.2.2 Ingestão de ração e água**

Os animais foram submetidos a dois experimentos com um intervalo de pelo menos três dias entre eles e receberam os seguintes tratamentos: PBS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL. Em cada experimento o grupo de animais foi dividido em dois, sendo que metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A seqüência dos tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos dois experimentos todos os ratos receberam todos os tratamentos.

Nesse grupo experimental, os animais foram privados de ração 24 horas antes da realização do experimento. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou PBS foi injetado 1 minuto antes dos animais receberem os comedouros de ração e buretas graduadas de água. A ingestão de ração e água foram mensuradas aos 30, 60, 90, 120 minutos.

#### **4.3 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL sobre a excreção renal de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e volume urinário em ratos tratados com gavagem de NaCl 2 M ou 0,15 M**

Os animais foram submetidos a 4 experimentos com um intervalo de pelo menos 3 dias entre eles conforme descrito anteriormente. Após 24 h de privação de alimento com água disponível, os animais foram submetidos à administração ig de NaCl 2 M ou 0,15 M (2 ml). Simultaneamente às gavagens foi realizada a microinjeção no VL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 ou 5 μmol/1 μl) ou PBS (salina tamponada, 1 μl), e os animais foram recolocados nas gaiolas metabólicas. A urina excretada foi coletada a cada 60 min, por um período de 120 min.

#### **4.4 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL sobre a resposta pressora induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M**

Os experimentos foram realizados no dia seguinte a canulação da artéria femoral em ratos não anestesiados. Após 20 min de registro basal da PAM e FC, foi feita a gavagem ig de NaCl 2 M ou 0,15 M. Um grupo recebeu NaCl 2 M, e logo após a gavagem, foi feita a microinjeção no VL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 µmol/1 µl), outro grupo recebeu NaCl 2 M seguida da microinjeção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µmol/1 µl) e outro grupo recebeu NaCl 2 M seguida da microinjeção de PBS (1 µl). O grupo que recebeu NaCl 0,15 M, apenas PBS (1 µl) foi injetado no VL. As variáveis cardiovasculares foram registradas por mais 60 min em todos os grupos após as injeções no VL.

## 5 Resultado

### 5.1 Localização histológica das cânulas no VL

A figura 1 mostra o local típico da microinjeção no VL. Conforme demonstrado pela análise histológica, a injeção no VL de  $H_2O_2$  não produziu nenhuma lesão no tecido neural que poderia afetar as respostas observadas.

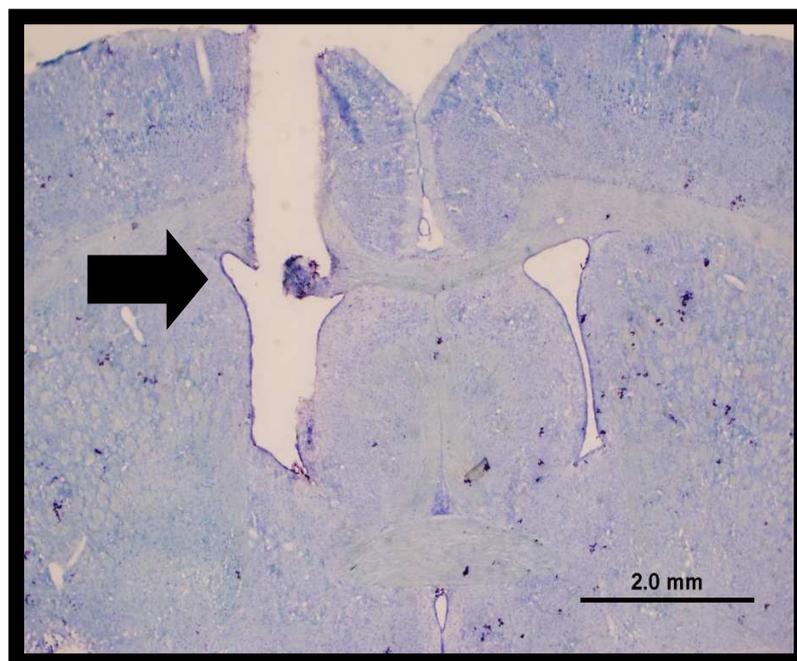


Figura 1- Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados mostrando o local da microinjeção, indicado pela seta, no ventrículo lateral (VL), (barra = 2,0 mm).

## 5.2 Efeitos da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL sobre a resposta dipsogênica induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M (2 ml)

A Figura 2 mostra que a injeção no VL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu significativamente a ingestão de água induzida pela gavagem ig de NaCl 2 M, na dose de 2,5 μmol (3,1 ± 0,7, vs. PBS 8,6 ± 1,0 ml/2 h), [F (3,21) = 29,791; p<0,05], (Figura 2A) ou na dose maior de 5 μmol (3,5 ± 1,1, vs. PBS 7,6 ml ± 0,5 ml/2 h), [F (3,18) = 18,8; p<0,05], (Figura 2B).

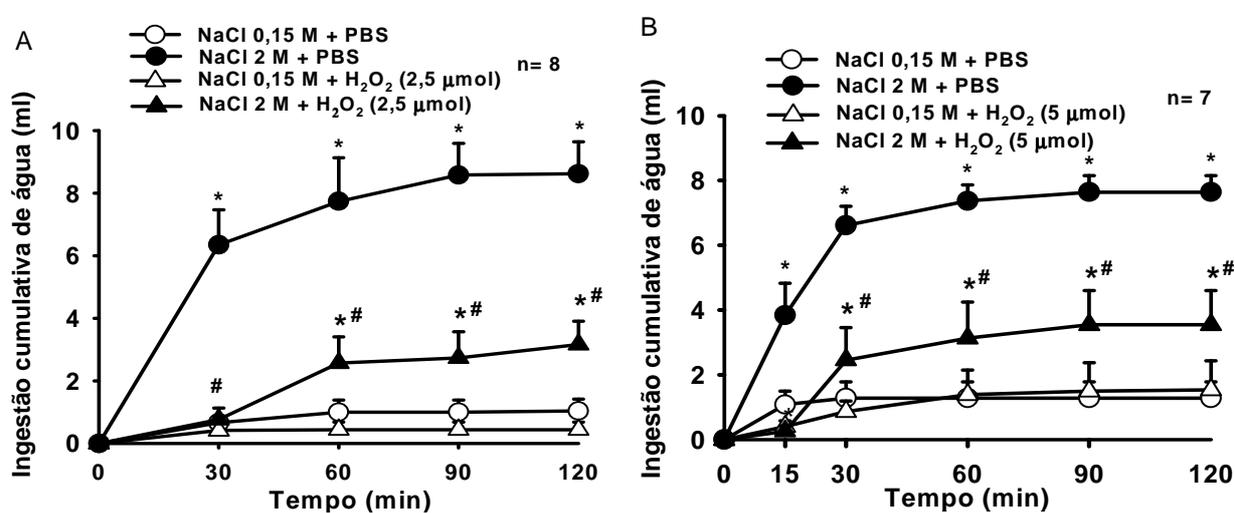


Figura 2 - Efeito do pré-tratamento com (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) ou PBS e (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) ou PBS no ventrículo lateral sobre a ingestão cumulativa de água após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS, # diferente de NaCl 2 M + PBS.

### **5.3 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de sacarose 2% ou ração**

#### **5.3.1 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de sacarose 2%**

Na figura 3A podemos observar que a injeção no VL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) não alterou a ingestão de sacarose 2% (3,3 ± 1,4, vs. PBS 5,4 ± 2,3 ml/2 h), bem como a ingestão de água (0,06 ± 0,06 ml, vs. PBS 0,3 ± 0,2 ml/2 h) que ocorreu concomitante à ingestão de sacarose 2% (Figura 3B). Por outro lado, na Figura 3C podemos observar que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) no VL reduziu a ingestão de sacarose 2% comparada a injeção de PBS (0,7 ± 0,4, vs. PBS 5,1 ± 1,6 ml/2 h), [ $F(1,4) = 8,338; p < 0,05$ ], sem alterar a ingestão de água (0,04 ± 0,02, vs. PBS 0,6 ml ± 0,3 ml/2 h), (Figura 3D).

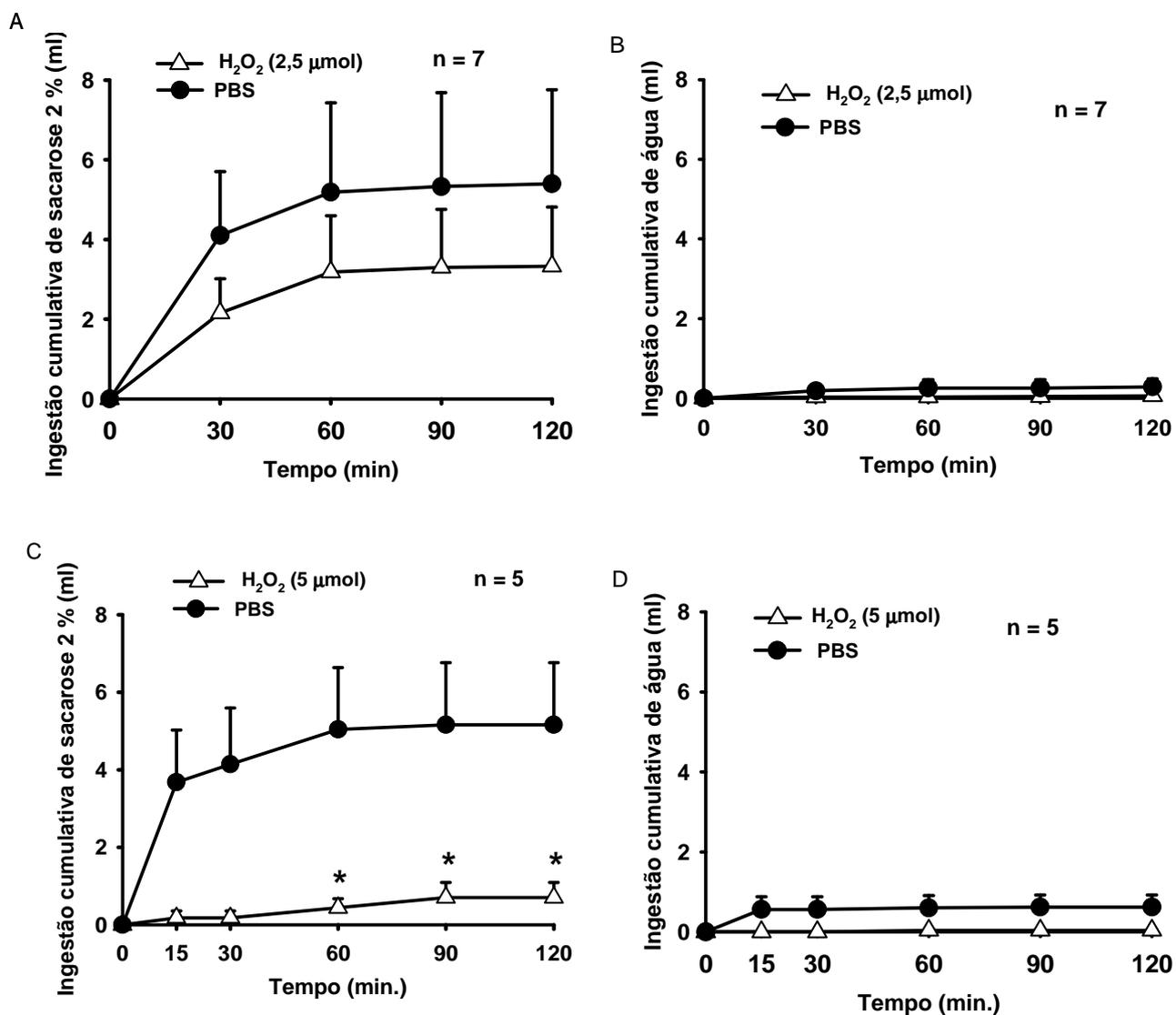


Figura 3 - Efeito do pré-tratamento com (A e B)  $H_2O_2$  (2,5  $\mu$ mol/1  $\mu$ l) ou PBS e (C e D)  $H_2O_2$  (5  $\mu$ mol/1  $\mu$ l) ou PBS no ventrículo lateral sobre a ingestão cumulativa sacarose 2% e água. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M., n= número de animais.

\* diferente de PBS.

### **5.3.2 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a ingestão de ração**

Nas Figuras 4A e 4B, respectivamente, podemos observar que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 µmol /1 µl), não alterou a ingestão de ração (8,2 ± 2, vs. PBS 11 ± 1,6 g/2 h), mas reduziu a ingestão de água que acompanha a ingestão de ração (4,9 ± 1,5, vs. PBS 11 ± 1,7 ml/2 h), [*F* (1,4) = 5,612; *p*<0,05]. De maneira semelhante, a injeção central de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µmol /1 µl) não alterou a ingestão de ração (10,3 ± 0,6, vs. PBS 10,7 ± 0,9 g/2 h), porém reduziu a ingestão de água associada a ingestão de alimento (8,2 ± 0,8, vs. PBS 12,7 ± 1,2 ml/2 h), [*F* (1,10) = 12,852; *p*<0,05], (Figura 4C e D, respectivamente).

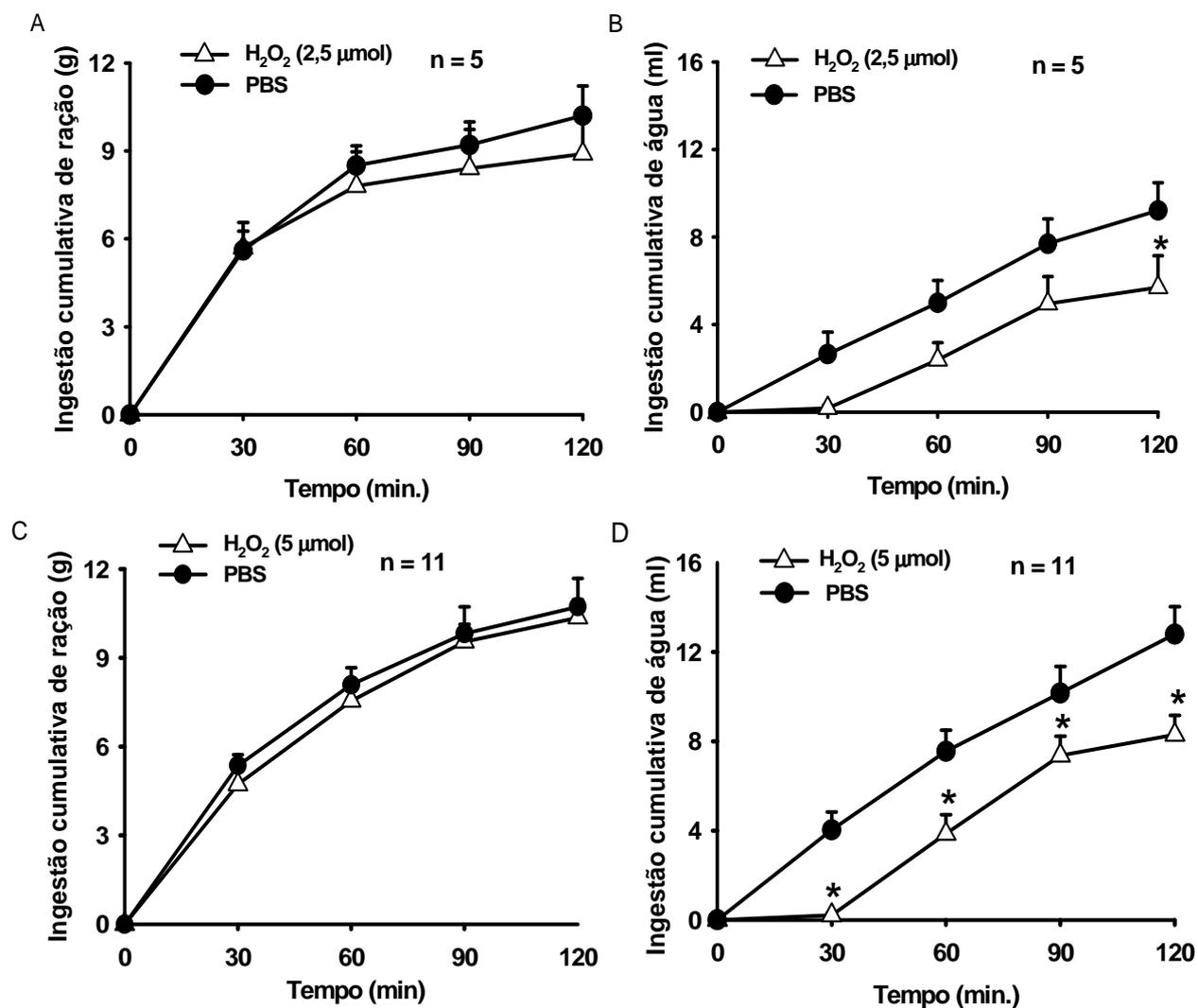


Figura 4 - Efeito do pré-tratamento com (A e B)  $H_2O_2$  (2,5  $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$ ) ou PBS e (C e D)  $H_2O_2$  (5  $\mu\text{mol}/1 \mu\text{l}$ ) ou PBS no ventrículo lateral sobre a ingestão cumulativa de ração e água em ratos privados 24 h de ração. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M., n= número de animais. \* diferente de PBS.

#### **5.4 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no ventrículo lateral sobre a excreção renal de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e volume urinário em ratos tratados ou não com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M**

A gavagem ig de NaCl 2 M promoveu um aumento no volume urinário, bem como, na excreção de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (Figuras 5 e 6). O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não alterou o volume urinário em nenhuma das doses utilizadas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol: 4,1 ± 0,5, vs. PBS 5 ± 0,6 ml/2 h e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 μmol: 5,2 ± 0,3, vs. PBS 5,7 ± 0,3 ml/2 h), (Figuras 5A e 6A). A injeção central de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atenuou significativamente a natriurese induzida pela gavagem ig de NaCl 2 M, tanto na dose de 2,5 μmol (609,2 ± 82,9, vs. PBS 876,4 ± 129,5 μEq/2 h), [ $F(3,21) = 39,025; p < 0,05$ ], (Figura 5 B), como na dose de 5 μmol (1.290,7 ± 80,5, vs. PBS 1.443,6 ± 67,5 μEq/2 h), [ $F(3,33) = 117,562; p < 0,05$ ], (Figura 6 B). Em relação à caliurese, apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2,5 μmol reduziu significativamente a excreção de K<sup>+</sup> (57,1 ± 10,7, vs. PBS 95,5 ± 18,1 μEq/2 h), [ $F(3,21) = 39,179; p < 0,05$ ], (Figura 5C).

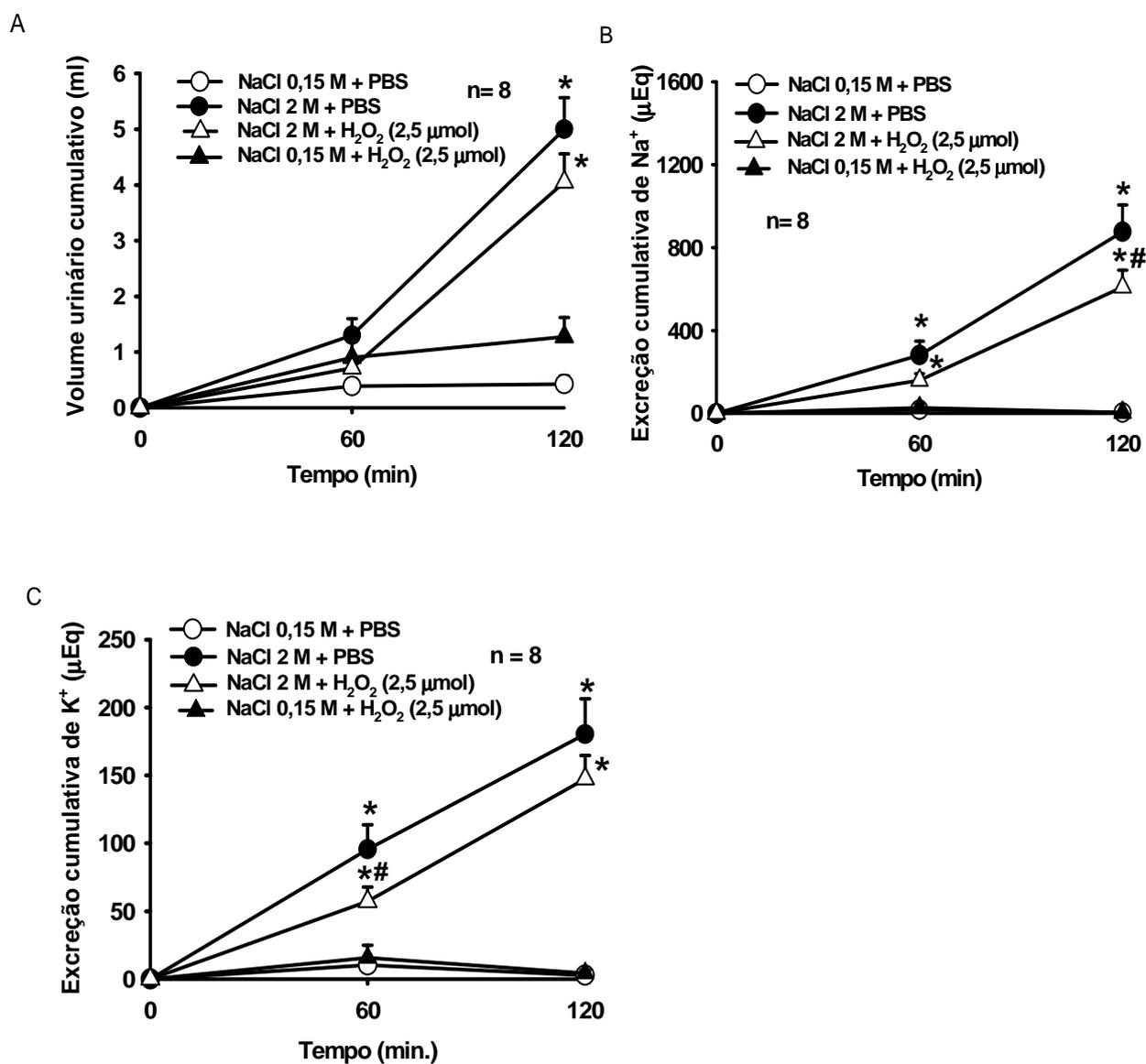


Figura 5- Efeito do pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 μmol/1 μl) ou PBS ventrículo lateral sobre as alterações no (A) volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) excreção de potássio após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS, # diferente de NaCl 2 M + PBS.

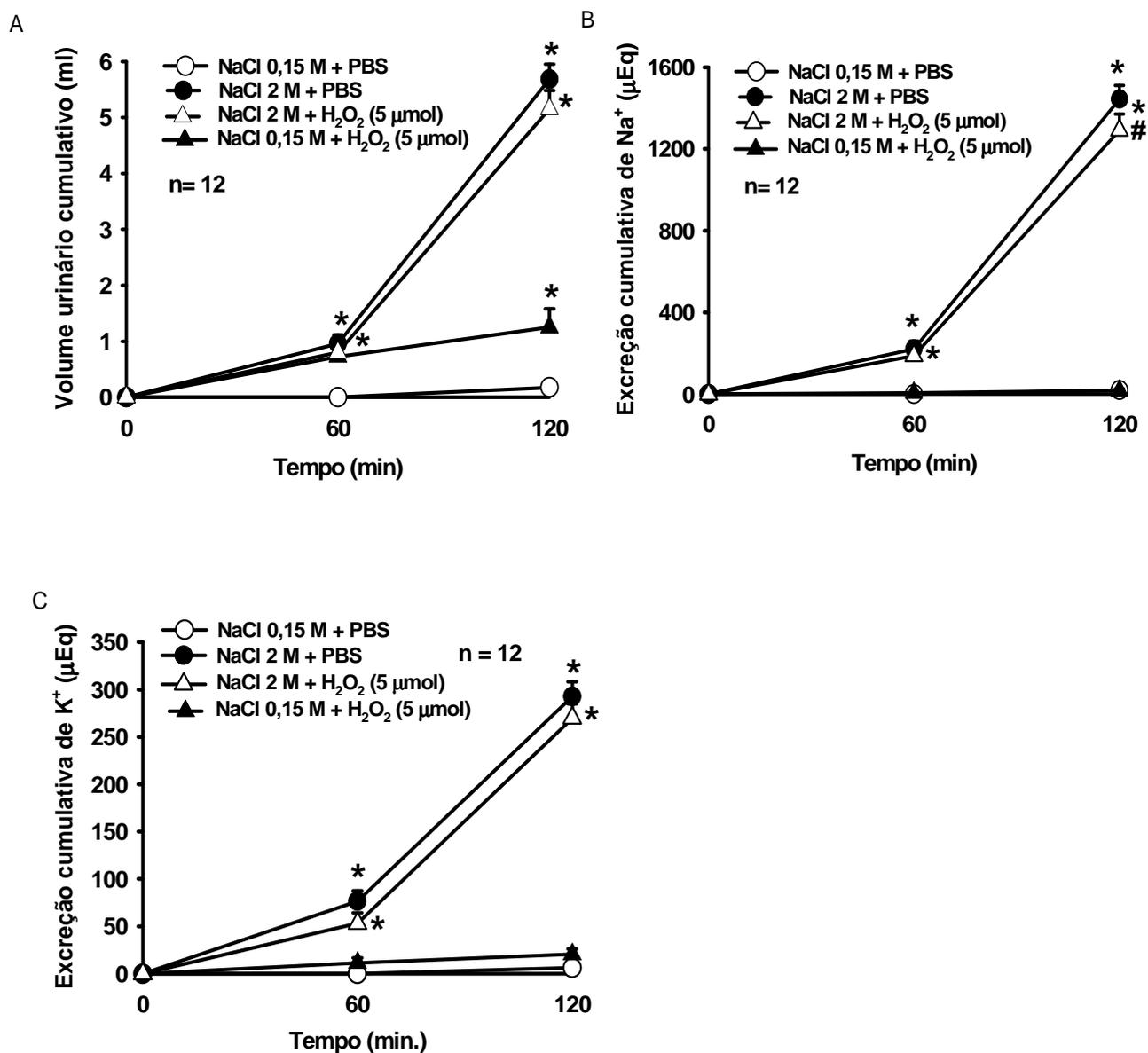


Figura 6- Efeito do pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μmol/1 μl) ou PBS ventrículo lateral sobre as alterações no (A) volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) excreção de potássio após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais. \* diferente de NaCl 0,15 M + PBS, # diferente de NaCl 2 M + PBS.

### 5.5 Efeito da administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL sobre a resposta pressora induzida pela gavagem intragástrica de NaCl 2 M

Na Figura 7A podemos observar que a gavagem ig de NaCl 2 M promoveu aumento significativo na PAM em animais tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou PBS no VL [ $F(3,216) = 18,240$ ;  $p < 0,05$ ]. A gavagem ig de NaCl 2 M não promoveu alterações significativas na FC dos ratos tratados com PBS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no VL [ $F(3,216) = 9,347$ ], (Figura 7B).

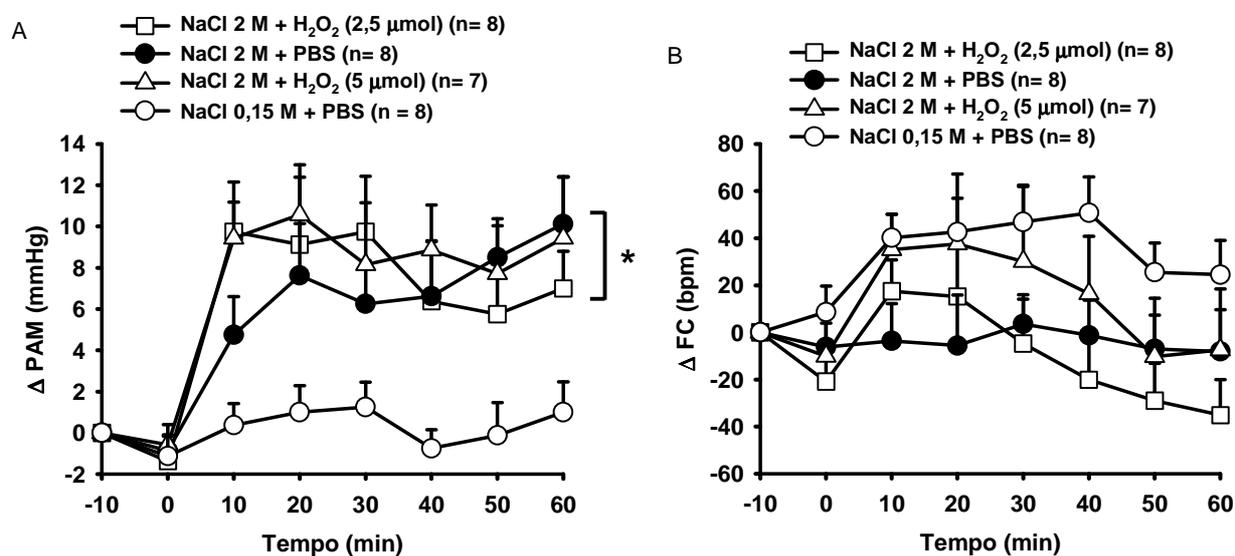


Figura 7- Efeito do pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,5 ou 5 μmol/1 μl) ou PBS ventrículo lateral sobre as alterações na (A) pressão arterial média e (B) frequência cardíaca após gavagem intragástrica de NaCl 2 M ou 0,15 M. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M., n= número de animais.\* diferente de NaCl 0,15 M + PBS.

## 6 Discussão

Os resultados do presente estudo mostram que injeções centrais de  $H_2O_2$  reduziram a ingestão de água e a natriurese induzidas por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. A resposta pressora bem como a diurese não foram alteradas pelo tratamento prévio com  $H_2O_2$ .

O aumento da osmolaridade plasmática induz ingestão de água devido à ativação dos osmorreceptores centrais, situados nos órgãos circumventriculares, como o OSF e o OVLT<sup>9,35</sup>. Dados da literatura demonstraram que a lesão do OSF reduz a ingestão de água induzida por aumento da osmolaridade plasmática<sup>46</sup> e a lesão da região anteroventral do terceiro ventrículo, que inclui o OVLT, também reduz a ingestão de água induzida por hiperosmolaridade<sup>26</sup>. Além da ativação direta de osmorreceptores pelo aumento da osmolaridade plasmática, dados da literatura demonstraram que parte da resposta dipsogênica da administração intragástrica com salina hipertônica é também dependente da ativação do sistema renina-angiotensina<sup>38,46</sup>, o qual promoveria ativação de seus receptores em locais livres de barreira hematoencefálica, como os órgãos circumventriculares, dentre eles o OSF e OVLT. Recentemente, Lauar et al.<sup>29</sup> (2010) demonstraram que  $H_2O_2$  no VL promovia redução da resposta pressora induzida pela ANG II. No presente estudo, demonstramos que a resposta dipsogênica da salina hipertônica também foi reduzida pelo tratamento prévio com  $H_2O_2$  no VL. Dessa forma, é possível que a redução da resposta dipsogênica em ratos pré-tratados com  $H_2O_2$  e submetidos ao aumento da osmolaridade plasmática seja decorrente da menor ativação das vias angiotensinérgicas centrais nesta situação. Devemos também lembrar que as vias colinérgicas centrais estão envolvidas com a resposta dipsogênica induzida pela ativação de osmorreceptores centrais<sup>30</sup>. Desta forma, uma vez que o peróxido de hidrogênio pode também interferir com o sistema colinérgico<sup>33,42</sup>, é possível que a redução na resposta dipsogênica nos animais pré-tratados com  $H_2O_2$  seja também decorrente da inibição de mecanismos colinérgicos centrais.

Para testar a especificidade das microinjeções de  $H_2O_2$  no VL em comparação a outros tipos de comportamentos ingestivos, foi investigado o efeito central do  $H_2O_2$  na ingestão de sacarose 2% e de alimento. Os resultados mostram que em doses maiores (no caso 5  $\mu$ mol), o  $H_2O_2$  pode atuar centralmente inibindo a ingestão de líquidos (água e sacarose), sugerindo que o  $H_2O_2$  injetado no VL pode reduzir de forma inespecífica o

comportamento ingestivo de líquidos. Em contrapartida, a menor dose de  $H_2O_2$  (2,5  $\mu$ mol) não foi suficiente em reduzir a ingestão de sacarose. Desta forma, em doses maiores, o  $H_2O_2$  parece ter uma influencia inibitória sobre outros sistemas de ingestão de líquidos ou mesmo de comportamento. Por outro lado, ambas as doses de  $H_2O_2$  não alteraram o comportamento ingestivo de ração, mas reduziram a ingestão de água associada à ingestão de alimento. A ingestão de água induzida pela ingestão de alimento está relacionada com a ativação do sistema renina-angiotensina, tanto por induzir uma hipovolemia devido à ingestão alimentar<sup>38</sup> ou mesmo sem induzir hipovolemia<sup>27</sup>. Ademais, a ativação do OSF, que é um órgão circunventricular, parece ser essencial para a ingestão de água pós-prandial<sup>47</sup>. Sendo assim, é lícito supor que a ingestão de água associada à ingestão alimentar deve de fato estar diminuída em uma situação onde há aumento de  $H_2O_2$ , possivelmente pela interação com o sistema angiotensinérgico central.

A ativação dos osmorreceptores centrais ativa vias colinérgicas centrais para promover seus efeitos natriurético<sup>14</sup>. Está claramente estabelecido que a secreção de hormônios neuro-hipofisários (OT e AVP) e do peptídeo natriurético atrial (ANP) são aumentadas pela estimulação osmótica, colinérgica e angiotensinérgica central<sup>3,28,37</sup>. No presente estudo observamos que a injeção central de  $H_2O_2$  não alterou o volume urinário, bem como, a excreção de potássio, porém houve uma redução significativa da natriurese induzida pela hiperosmolaridade plasmática, que possivelmente pode ser atribuída à alteração na secreção de OT e/ou ANP. A hiperosmolaridade aumenta a secreção de OT e ANP, e ambos são hormônios natriuréticos<sup>19</sup>. Uma vez que não houve alteração na diurese induzida pela gavagem com NaCl 2 M, é possível que a secreção de vasopressina induzida pela hiperosmolaridade não tenha sido alterada pelo tratamento com peróxido de hidrogênio.

O aumento na pressão arterial e da atividade simpática decorrente do aumento da osmolaridade plasmática está bem descrito pela literatura<sup>8,11-13,17,40</sup>. O aumento da pressão arterial causado por gavagem ig de NaCl 2 M é primariamente decorrente da secreção de vasopressina<sup>8</sup>. Sendo assim, o fato do  $H_2O_2$  não alterar a diurese e a resposta pressora causada pela hiperosmolaridade plasmática, vai ao encontro de que, nesta situação, talvez o  $H_2O_2$  não consiga reduzir a secreção de vasopressina, desta forma não houve a alteração da resposta pressora induzida pela hiperosmolaridade.

Sabe-se que o  $H_2O_2$  agindo centralmente é capaz de modular a excitabilidade neuronal atuando em vários mecanismos, por exemplo, alteração na liberação de neurotransmissores ou na ativação de canais iônicos. Vários estudos já demonstraram que o  $H_2O_2$  é capaz de atenuar a excitabilidade neuronal em decorrência da inibição do glutamato, ou por aumentar a liberação de GABA em neurônios pré-sinápticos, ou atuar em locais pós-sinápticos, por exemplo, no receptor  $GABA_A$  abrindo canais de cloreto, ou até mesmo pela ativação de canais de K dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ) causando hiperpolarização da célula<sup>5-7,44,49,55,56</sup>. Esse conjunto de fatores nos dá a ideia do quão díspar são as vias de ação e funções do  $H_2O_2$ , não como mediador de morte celular ou estresse oxidativo, mas sim como um importante agente sinalizador. O presente estudo não nos permite, entretanto saber qual o mecanismo que o  $H_2O_2$  está atuando para diminuir as respostas observadas. Além dos mecanismos propostos acima, outro possível mecanismo é que o  $H_2O_2$  tenha seus efeitos inibitórios por promover ativação do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), efeito já observado em células cardíacas e em neurônios<sup>20,50</sup>. O MIF é uma citocina que além de seus efeitos clássicos no sistema imunológico, como citocina pro-inflamatória, tem sido também descrito, que por sua ação oxidoreductase, essa citocina também teria ação sobre remoção das EROs do ambiente intracelular. Vários estudos têm caracterizado o MIF como uma “citoenzima” que atuaria contra-regulando as ações da ANG II<sup>13,16,31,45</sup>. A ANG II agindo no receptor angiotensinérgico do subtipo  $AT_1$  do SNC induz a formação de EROs (ver esquema 1 da Introdução), e embora o anion superóxido tenha sido descrito como um mediador das respostas dipsogênica e pressora induzidas pela ANG II (revisão em Zimmerman & Davisson<sup>53</sup> (2004)), o superóxido é metabolizado em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase<sup>48</sup>, e o  $H_2O_2$  conforme dados de nosso laboratório<sup>29</sup>, tem ações inibitórias sobre as ações da ANG II. Desta forma é possível que as ações inibitórias do  $H_2O_2$  sobre os efeitos da ANG II no SNC sejam decorrentes da ativação/aumento da expressão de MIF nestes neurônios, o qual por sua ação redox iria remover ânions superóxido, os quais são responsáveis pelas ações da ANG II. Ademais, também já foi descrito que a ativação de osmorreceptores centrais aumenta a expressão de MIF no PVN<sup>13</sup>. Sabendo que o aumento da osmolaridade plasmática ativa vias angiotensinérgicas centrais<sup>11,13</sup>, a qual aumentaria a produção de  $H_2O_2$ , que por sua vez ativa/aumenta a expressão de MIF, seria possível pensar que o aumento dos níveis icv de  $H_2O_2$  realizado em nosso trabalho, culmine na redução na

dipsogênese induzida por aumento da osmolaridade plasmática bem como na natriurese por aumentar os níveis de MIF intracelular. Apesar das possíveis hipóteses acima, mais estudos serão necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o  $H_2O_2$  reduz os efeitos da ANG II no sistema nervoso central, bem como das vias ativadas pelo aumento da osmolaridade plasmática.

## **7 Conclusão**

Os resultados do presente estudo mostram que injeções icv de  $H_2O_2$  reduziram a ingestão de água e a natriurese induzidas por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. A resposta pressora bem como a diurese não foram alteradas pelo tratamento com  $H_2O_2$ . Esses dados sugerem que o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  centralmente pode inibir os mecanismos facilitatórios que participam no desenvolvimento da sede e da natriurese decorrente da hiperosmolaridade plasmática.

## 8 Referências

1. ANDRADE C. A. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. *Neuroscience*. v 208, 69-78, Apr 2012.
2. ANTUNES, V. R. et al. A spinal vasopressinergic mechanism mediate hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol (Lond)*. 576: 569-83, Oct 2006.
3. ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Ver*. 84: 169-208, 2004.
4. ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Controle neuroendócrino da homeostase dos fluidos corporais. In *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*, eds. Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, & Castro M. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 81-115, 2005.
5. AVSHALUMOV, M. V. et al. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci*. 2005; 25: 4222-31.
6. BAO, G.; RANDHAWA, P. M.; FLETCHER, E. C. Acute blood pressure elevation during repetitive hypocapnic and eucapnic hypoxia in rats. *J Appl Physiol*. 82: 1071-8, 1997.
7. BAO, L.; AVSHALUMOV, M. V.; RICE, M. E. Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevation, not ATP depletion. *J Neurosci*. 25: 10029-40, 2005.
8. BLANCH, G. T. et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304: 531-42, 2013.
9. BOURQUE, C. W.; OLIET, S.H.; RICHARD, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol*. 15: 231-74, 1994.
10. CARLSON, S.H.; BEITZ, A.; OSBORN, J.W. Intra-gastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 272: 750-58, 1997.

11. CHEN, Q. H.; TONEY, G. M. AT(1)-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281: R1844-R53, 2001.
12. COLOMBARI, D. S. A. et al. Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. *The Journal of Physiology.* 589: 4457-71, 2011.
13. COLOMBARI, E. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt. *Hypertension.* 56: 956-63, 2010.
14. DA ROCHA, M. J. A.; FRANCI, C. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MSA) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). *Physiology & Behavior.* 34: 23-8, 1985.
15. DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 74: 323-64, 1994.
16. FREIRIA-OLIVEIRA, A. H. Macrophage migration inhibitory factor in the nucleus of solitary tract decreases blood pressure in SHR. *Cardiovasc Res.* 97: 153-160, 2013.
17. GARCIA-ESTAR, J. et al. Hemodynamic effects of hypertonic saline in the conscious rat. *Life Sci.* 44: 1343-50, 1989.
18. GROSSMAN, S. P. Cellular dehydration thirst. In *Thirst and Sodium Appetite*, ed. Grossman SP. 25-42. Academic Press, San Diego, 1990.
19. HAANWINCKEL, M. A. et al. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 7902-6, 1995.
20. HARRISON, R. A.; SUMNERS, C. Redox regulation of macrophage migration inhibitory factor expression in rat neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 390: 171-5, 2009.
21. HOHLE, S.; et al. Effect of angiotensin AT2 and muscarinic receptor blockade on osmotically induced vasopressin release. *Eur J Pharmacol.* 300: 119-23, 1996.

22. HUANG, W. et al. Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. *Am J Physiol* 270: 427-33, 1996.
23. HUANG, W.; LEE S. L.; SJOQUIST, M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol*. 268: 634-40, 1995.
24. IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*. 87: 179-83, 2000.
25. JIANG, B. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biol Int*. 27: 1026-31, 2003.
26. JOHNSON, A. K.; LOEWY, A. D. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In *Central regulation of autonomic functions*, eds. Loewy AD & Spyer KM. Oxford University Press, New York. 247-67, 1990.
27. KRALY, F. S.; KIM, Y. M.; TRIBUZIO, R. A. Renal nerve transection inhibits drinking elicited by eating and by intragastric osmotic loads in rats. *Physiol Behav*. 58: 1129-36, 1995.
28. LAUAND, F. et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience*. 147: 247-57, 2007.
29. LAUAR, M. R. et al. Inhibition of central angiotensin II-induced pressor responses by hydrogen peroxide. *Neuroscience*. 171: 524-30, 2010.
30. LEE, W. J. et al. Effect of brain angiotensin II AT1, AT2, and cholinergic receptor antagonism on drinking in water-deprived rats. *Regul Pept*. 66: 41-6, 1996.
31. LI, H. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the PVN attenuates the central pressor and dipsogenic actions of angiotensin II. *FASEB J*. 20: 1748-50, 2006.
32. LOEWY, A. D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. In *Progr. Brain Res.*, ed. Holstege G. Elsevier. pp: 253-68, 1991.

33. MATA A. et al. Effect of hydrogen peroxide on secretory response, calcium mobilisation and caspase-3 activity in the isolated rat parotid gland. *Mol Cell Biochem.* 319: 23-31, 2008.
34. MCKINLEY, M. J. Osmoreceptors for thirst. In *Thirst: physiology and psychological aspects*, eds. Ramsay DM & Booth DA. Springer-Verlag, London. pp: 77-92, 1991.
35. MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. *News Physiol Sci.* 19: 1-6, 2004.
36. MOELLENHOFF, E. et al. Central angiotensin AT1 and muscarinic receptors in ITF expression on intracerebroventricular NaCl. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 275: 234-44, 1998.
37. MORRIS, M.; MCCANN, S. M.; ORIAS, R. Role of transmitters in mediating hypothalamic control of electrolyte excretion. *Can J Physiol Pharmacol.* 55: 1143-54, 1977.
38. NOSE, H. et al. Continuous determination of blood volume on conscious rats during water and food intake. *Jpn J Physiol.* 36: 215-18, 1986.
39. PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Inc, San Diego. 1986.
40. PEDRINO, G. R. et al. Anteroventral third ventricle lesions impair cardiovascular responses to intravenous hypertonic saline infusion. *Auton Neurosc : Basic and Clinical.* 117: 9-16, 2005.
41. PEREIRA, D. T. et al. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav.* 76, 501-5, 2002.
42. PETERS, S. L. et al. Reactive oxygen species potentiate the negative inotropic effect of cardiac M2-muscarinic receptor stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 364: 166-171, 2001.
43. RHEE, S. G. et al. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol.* 14: 211-S15, 2003.

44. SAH, R. et al. Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem.* 80: 383-91, 2002.
45. SHI, P.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Brain Cytokines as Neuromodulators in Cardiovascular Control. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009.
46. STARBUCK, E. M.; FITTS, D. A. Effects of SFO lesion or captopril on drinking induced by intragastric hypertonic saline. *Brain Res.* 795: 37-43, 1998.
47. STARBUCK, E. M.; FITTS, D. A. Influence of the subfornical organ on meal-associated drinking in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280: 669-77, 2001.
48. STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 8: 243-70, 2006;.
49. TAKAHASHI, A.; MIKAMI, M.; YANG, J. p38 mitogen-activated protein kinase independent SB203580 block of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced increase in GABAergic mIPSC amplitude. *NeuroReport.* 18: 963-67, 2007.
50. TAKAHASHI, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 52: 438-45, 2001.
51. TONEY, G. M. et al. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand.* 177: 43-55, 2003.
52. WEINBERG, E. D. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev.* 22: 531-79, 1990.
53. ZIMMERMAN, M. C.; DAVISSON, R. L. Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 84: 125-49, 2004.
54. ZIMMERMAN, M. C. et al. Superoxide Mediates the Actions of Angiotensin II in the Central Nervous System. *Circ Res.* 91: 1038-45, 2002.

55. ZOCCARATO, F. et al. Modulation of glutamate exocytosis by redox changes of superficial thiol groups in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurosci Lett.* 274: 107-10, 1999.
  
56. ZOCCARATO, F.; VALENTE, M.; ALEXANDRE, A. Hydrogen peroxide induces a long-lasting inhibition of the Ca(2+)-dependent glutamate release in cerebrocortical synaptosomes without interfering with cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *J Neurochem.* 64: 2552-8, 1995.

Anexo



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 11/2012

Araraquara, 11 de Junho de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 06/06/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Aumento dos níveis intracerebroventricular de peróxido de hidrogênio: efeitos sobre a ingestão de água, excreção renal e alterações cardiovasculares induzidas por aumento da osmolaridade plasmática" (Proc. CEUA nº 11/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MAIO/2013.

Atenciosamente.

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI  
Coordenador da CEUA

À  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> DÉBORA SIMÕES DE ALMEIDA COLOMBARI  
DD. Pesquisadora Responsável  
Departamento de Fisiologia e Patologia

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 01 de abril de 2013.

REGIS CRISTIAN ZANELLA