



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE FARMÁCIA

Ana Caroline Gonçalves

**Participação central da apelina na expressão gênica de nNOS e HO-1 após estimulação osmótica em ratas fêmeas adultas e idosas.**

Florianópolis, SC

2024

Ana Caroline Gonçalves

**Participação central da apelinina na expressão gênica de nNOS e HO-1 após estimulação osmótica em ratas fêmeas adultas e idosas.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Wagner Luis Reis, Dr.

Florianópolis, SC

2024

Gonçalves, Ana Caroline

Participação central da apelina na expressão gênica de nNOS e HO-1 após estimulação osmótica em ratas fêmeas adultas e idosas. / Ana Caroline Gonçalves ; orientador, Wagner Luís Reis, 2024.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Sistema APL/rAPJ. 3. NO/nNOS. 4. envelhecimento. 5. CO/HO-1. I. Reis, Wagner Luís . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Ana Caroline Gonçalves

**Participação central da apelina na expressão gênica de nNOS e HO-1 após estimulação osmótica em ratas fêmeas adultas e idosas.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 19 de junho de 2024.



---

Coordenação do Curso

**Banca examinadora**



---

Prof. Wagner Luis Reis, Dr.  
Orientador



---

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



---

Prof. Alexandre Giusti-Paiva Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois a fé e a paciência Nele me concederam a força que precisava para realizar este sonho. Da mesma forma, sou grata a minha mãe Magda e meu pai Joacir, por sempre trabalharem para me promover essa oportunidade. À minha irmã Maria, cuja sinceridade e paz em pessoa me inspira a me tornar alguém melhor. Agradeço também aos meus familiares, por todas as orações, conselhos e incentivos.

Ao meu companheiro Henrique, sou grata por ser meu maior apoiador e meu porto seguro. Obrigada por estar comigo partilhando as conquistas e frustrações que a jornada acadêmica me promoveu.

Ao meu querido professor Dr. Wagner Reis, obrigada por me acolher em um momento muito difícil da minha vida e acreditar em mim. Por ser como um “pai” na ciência e me ensinar desde o mais básico, mas sem subestimar minha capacidade de desenvolvimento. Obrigada por todas as vezes que me chamou de “pesquisadora”. Hoje, graças ao senhor eu me sinto uma de verdade.

Agradeço a Jaíne, minha parceira neste projeto e que me acompanhou durante os desafios da graduação e deste trabalho de pesquisa, mesmo em tempos de pandemia. Sempre pude contar com sua disposição e nunca me deixou na durante os experimentos.

Aos integrantes do LENEK, obrigada pela contribuição até o presente momento com seu apoio e com muita experiência positiva sobre o dia a dia da pesquisa básica. Em especial, à doutoranda Tamires que sempre esteve disposta a me dar dicas e conselhos.

## RESUMO

O envelhecimento é acompanhado por diminuição da água corporal total e, associada a hiperosmolalidade plasmática, há diminuição da sensação da sede juntamente com aumento da atividade neuronal hipotalâmica relacionada ao equilíbrio hidroeletrólítico. Estudos recentes em animais adultos têm correlacionado a atividade de células produtoras de vasopressina (AVP) a expressão gênica de apelina (APL) e enzimas envolvidas na síntese de óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO). Há evidências de que o NO atue como inibidor da secreção de AVP e o CO exerça uma função oposta, controlando assim a ativação de células produtoras de AVP. Entretanto, o papel e a via de atuação de ambos no controle da neurosecreção não é bem conhecido, principalmente durante o processo de envelhecimento. Ainda, não há estudos que demonstrem a possível relação da APL com neurotransmissores durante o estresse osmótico. Portanto, este estudo buscou avaliar o impacto do envelhecimento e da privação hídrica (PH) na expressão de APL, óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e heme-oxigenase 1 (HO-1) no núcleo paraventricular (PVN) e no órgão subfornical (SFO), regiões que atuam na produção de AVP e como osmorreceptora, respectivamente. Nos animais em privação hídrica, avaliamos ainda os efeitos da administração intracerebroventricular (icv) de APL. O envelhecimento não afetou a expressão de APL e das enzimas avaliadas, mas quando submetidas a PH, ratas idosas apresentaram um déficit na produção de nNOS. O tratamento icv de APL reduziu a expressão de nNOS no animal adulto sob estimulação osmótica, enquanto no idoso, causou uma redução na expressão de HO-1. Nossos resultados sugerem que a APL pode estimular a síntese de AVP em situações de estresse via NO e ainda, que este efeito é perdido no indivíduo idoso.

**Palavras-chave:** *Sistema APL/rAPJ; NO/nNOS; CO/HO-1; privação hídrica; osmorreceptores; núcleo paraventricular.*

## ABSTRACT

Aging is accompanied by a decrease in total body water, and associated plasma hyperosmolality diminishes thirst sensation along with increased hypothalamic neuronal activity related to fluid-electrolyte balance. Recent studies in adult animals have correlated vasopressin-producing cell activity (AVP) with apelin gene expression (APL) and enzymes involved in nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) synthesis. Evidence suggests that NO acts as an inhibitor of AVP secretion while CO exerts the opposite effect, thereby regulating AVP-producing cell activation. However, the specific roles and pathways of both in neurosecretion control, particularly during aging, are not well understood. Furthermore, there are no studies demonstrating APL's potential relationship with gasotransmitters during osmotic stress. Therefore, this study aimed to evaluate the impact of aging and water deprivation (WD) on APL expression, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and heme oxygenase 1 (HO-1) in the paraventricular nucleus (PVN) and subfornical organ (SFO) regions involved in AVP production and osmoreception, respectively. In WD animals, we also assessed the effects of intracerebroventricular (icv) APL administration. Aging did not affect APL expression or the evaluated enzymes, but elderly rats subjected to WD showed a deficit in nNOS production. Icv APL treatment reduced nNOS expression in adult animals under osmotic stimulation, while in the elderly, it led to a reduction in HO-1 expression. Our results suggest that APL may stimulate AVP synthesis during stress via NO, and that this effect is lost in elderly individuals.

**Keywords:** *APL/rAPJ System; NO/nNOS; CO/HO-1; water deprivation; osmoreceptors; paraventricular nucleus.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão relativa de mRNA no PVN	25
Figura 2 – Expressão relativa de mRNA no SFO	26
Figura 3 – Expressão relativa de mRNA no PVN após privação hídrica	27
Figura 4 – Efeito da idade na expressão de mRNA no PVN após privação hídrica	28
Figura 5 – Expressão de mRNA no SFO após privação hídrica	28
Figura 6 – Efeito da idade na expressão de mRNA no SFO após privação hídrica	29
Figura 7 – Expressão de mRNA no PVN após tratamento com APL	30
Figura 8 – Expressão de mRNA no SFO após tratamento com APL	31



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO TEÓRICA .....</b>	<b>12</b>
2.1 ENVELHECIMENTO.....	12
2.2 SISTEMA APELINÉRGICO.....	13
2.3 NEUROTRANSMISSORES GASOSOS.....	15
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
5.1 ANIMAIS.....	20
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
5.2.1 Avaliação dos efeitos do envelhecimento na expressão hipotalâmica de APL, nNOS e HO-1 em ratas fêmeas.....	20
5.2.2 Avaliação dos efeitos da privação hídrica na expressão hipotalâmica de APL, nNOS e HO-1 em ratas fêmeas adultas e idosas.....	20
5.2.3 Avaliação dos efeitos da administração central de APL na expressão hipotalâmica de nNOS e HO-1 de ratas submetidas a estimulação osmótica.....	21
5.3 ANESTESIA E ANALGESIA.....	21
5.4 FÁRMACOS UTILIZADOS.....	21
5.5 PRIVAÇÃO HÍDRICA.....	21
5.6 CANULAÇÃO DO VENTRÍCULO LATERAL.....	22
5.7 IMPLANTE DA BOMBA OSMÓTICA.....	22
5.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E PCR EM TEMPO REAL.....	22
5.8.1 Análise Estatística.....	24
<b>7 RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A homeostase hidroeletrólítica refere-se à capacidade de um organismo manter as concentrações de água e eletrólitos dos compartimentos internos relativamente constantes, embora ocorram variações na ingestão de água ou sal. O limiar de osmolalidade em humanos é mantido próximo de 280 mOsmol/kg através de respostas neuroendócrinas, hemodinâmicas, renais e comportamentais. Na lâmina terminal, órgãos circumventriculares como o órgão subfornical (SFO) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) atuam como osmossensores (Bourque; Oliet, 1997). Ao detectarem alterações na osmolalidade plasmática, esses órgãos geram sinais elétricos que podem estimular ou inibir a sede e a neurosecreção hipotalâmica do hormônio antidiurético (vasopressina, AVP) e da ocitocina (OT) (Antunes-Rodrigues *et al*, 2013).

A síntese de AVP e OT ocorre principalmente em neurônios magnocelulares do paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON), cujos axônios conduzem os peptídeos produzidos até a neuro-hipófise através da eminência mediana (EM), onde alcançam a circulação sistêmica (Wiegand; Price, 1980). Como já bem estabelecido, o AVP promove um aumento na reabsorção de água ao induzir a expressão de canais aquaporina 2 (AQP2) nos túbulos renais, além de influenciar no controle cardiovascular através da vasoconstrição (Hesler *et al*, 2006). Por outro lado, o papel da OT na tonicidade plasmática envolve a estimulação do peptídeo natriurético atrial (ANP), intensificando a secreção urinária de sódio e inibindo a ingestão de sal (Verbalis *et al*, 1991; Haanwinckel *et al*, 1995).

Durante a estimulação osmótica por alteração de volume e/ou osmolalidade dos líquidos corporais, a excitabilidade dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos pode aumentar ou diminuir, e isso está diretamente relacionado aos níveis plasmáticos AVP e OT (Cazalis; Dayanithi; Nordmann, 1985). Assim, a estimulação osmótica causada pela privação hídrica (PH) eleva os níveis plasmáticos de AVP e OT, além de estimular o consumo de água (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). No indivíduo idoso há diversas características fisiológicas que são alteradas pelo processo natural de senescência, como a redução de massa corpórea e de água corporal total (Cowen; Hodal; Verbalis, 2013). Nesse sentido, é importante ressaltar que a percepção de sede é reduzida no idoso, promovendo um aumento na excitabilidade neuronal magnocelular (Blanchard *et al*, 2013). Além disso, há diminuição no consumo de líquidos que, quando associadas a hipertensão e/ou diabetes, por exemplo, podem aumentar o risco da desidratação e suas complicações clínicas em idosos (Cowen; Hodal; Verbalis, 2013).

Arieff *et al.* (1976) observou que alterações rápidas na osmolalidade do líquido extracelular por distúrbios agudos tem impacto principalmente neurológico, com sinais de

confusão mental, paralisia, coma e até crises convulsivas. Como o envelhecimento afeta a capacidade de autorregulação central e a percepção de sede, alterações hidroeletrólíticas agudas tornam os indivíduos idosos mais vulneráveis as consequências neurais promovidas por uma desidratação severa. Portanto, compreender o papel dos neurotransmissores envolvidos em respostas neuroendócrinas a desafios osmóticos, pode esclarecer o declínio desta função central na população idosa.

Muitos neurotransmissores envolvidos na regulação hidroeletrólítica central foram descritos em resposta ao estímulo osmótico. Tanto as proteínas quanto mRNAs desses neurotransmissores são encontrados em células neurosecretoras do hipotálamo e osmossensores. Dentre eles, destacam-se a apelina e gasotransmissores como o NO e CO, cuja função na regulação central da homeostase hidroeletrólítica ainda não está totalmente estabelecida.

Portanto, este trabalho busca evidenciar o papel do sistema apelinérgico central e sua relação com os gases neurotransmissores na regulação central da homeostase hidroeletrólítica, além de investigar o impacto do envelhecimento nessa interação.

## 2 REVISÃO TEÓRICA

### 2.1 ENVELHECIMENTO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a expectativa de vida em 2019 aumentou para 73,3 anos, o que é quase 7 anos a mais desde os anos 2000. Este aumento foi atribuído a redução nas taxas de natalidade, maior atenção na saúde materno-infantil, investimento em vacinação e ao tratamento contra doenças infecciosas, além do desenvolvimento socioeconômico e medicinal da última década (OMS, 2022). Assim, até a pandemia por coronavírus 2019 (Covid-19) em 2020, o cenário resultante era de aumento da população idosa mundial. Entretanto, estima-se que o progresso alcançado na saúde esteja comprometido até 2030, como resultado das complicações e da mortalidade causada pelo vírus nesta faixa e idade mais avançada (Woolf; Masters; Aron, 2021).

O envelhecimento está relacionado ao desequilíbrio de diversas funções fisiológicas que favorecem o surgimento de neoplasias, doenças cardiovasculares, renais e neurodegenerativas (Constantino; Paneni; Cosentino, 2016). Alterações hipotalâmicas e de outras vias associadas ao controle hidroeletrólítico, acarretam no declínio das funções de correção osmótica e de volume plasmático (Zamboni *et al*, 2003). Logo, uma redução na massa corpórea e na água corporal total são características comuns que acompanham o processo de senescência (Cowen; Hodal; Verbalis, 2013). Além de alterações no volume de água, o envelhecimento também afeta a homeostase de sódio, o que pode explicar a prevalência de hiponatremia em indivíduos mais velho (Borra; Beredo; Kleinfeld, 1995; Hawkins, 2003). O quadro de hiponatremia em idosos pode ocorrer por uma associação de fatores, incluindo endocrinopatias, menor excreção de água, diminuição da ingestão de sal, síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético (SIADH), uso de medicamentos diuréticos e antidepressivos, entre outros (Filippatos, 2017). Essa complexa interação de variáveis pode comprometer ainda mais a regulação osmótica, destacando a vulnerabilidade dos idosos a desequilíbrios hidroeletrólíticos.

A sensibilidade dos osmorreceptores pode estar alterada mesmo em pessoas saudáveis com idade superior a 65 anos. Quando submetidos à privação de água para elevar a osmolalidade do plasma, idosos apresentam uma menor percepção de sede e consomem menos água que indivíduos mais jovens (Phillips *et al*, 1984). Ainda, há evidências de os níveis plasmáticos e AVP são aumentados com a idade (Duggan *et al*, 1993), o que pode estar associado ao aumento gradual do tamanho do SON e PVN após 60 anos de idade observado (Davies *et al*, 1995). Além disso, idosos apresentam maior concentração periférica de OT enquanto no sistema nervoso central (SNC), os níveis podem ser menores (Fliers; Swaab, 1983;

Zbuzek *et al*, 1988) ou iguais a concentração plasmática e ao número de células OTérgicas de animais adultos (Melis *et al*, 1992; YU *et al*, 2006). Estes achados sugerem que o envelhecimento causa alterações no funcionamento de células magnocelulares que podem ser agravados durante distúrbios agudos

Alterações eletrolíticas em pacientes hospitalizados por Covid-19 foram frequentemente relatadas e correlacionadas ao mau prognóstico da infecção, destacando-se a hiponatremia como o distúrbio mais comum (Tezcan *et al*, 2020; Atila *et al*, 2021; Pazos-Guerra, 2023). Cabe ressaltar que a maioria dos casos de internação envolvia pessoas acima de 60 anos portadores de doenças pulmonares e/ou outras comorbidades (Atila *et al*, 2021; Pazos-Guerra, 2023). Portanto, é importante compreender os mecanismos que tornam os indivíduos idosos mais susceptíveis a complicações clínicas que envolvem o balanço hidroeletrólítico.

## 2.2 SISTEMA APELINÉRGICO

O'Dowd *et al* (1993) identificou pela primeira vez no cérebro de ratos um receptor órfão acoplado a proteína G que apresentava 54% de homologia com o receptor 1 de angiotensina II (AT1R), chamando-o de APJ (rAPJ). Anos mais tarde, a apelina (APL) ou ligante endógeno de rAPJ, foi isolada e caracterizada a partir do extrato de estômagos bovinos (Tatemoto *et al*, 1998), sendo associada a regulação de homeostase hidroeletrólítica pela ampla distribuição de APL e rAPJ em regiões hipotalâmicas (Matsumoto *et al*, 1996; De Mota; Lenkei; Llorens-Cortes, 2000; Hosoya, 2000). Mais recentemente, a APL e seus homólogos são estudadas no contexto de diagnóstico e tratamento de doenças como o infarto do miocárdio, hipertensão arterial e aterosclerose, por sua função cardioprotetora e anti-inflamatória (Wang *et al*, 2022; Gao; Chen, 2023).

A importância da APL na manutenção da homeostase hídrica é evidenciada em pacientes que sofrem com fisiopatologias como a síndrome de secreção inapropriada de hormônio antidiurético (SIADH), insuficiência cardíaca, infecções agudas, diabetes mellitus e hemorragias (Azizi *et al*, 2008; Cernaro *et al*, 2012; Sauvant *et al*, 2014). Nestes casos de alteração da osmolalidade, a APL exerceu função aparentemente oposta ao de AVP. Além disso, os níveis plasmáticos de apelina são inversamente correlacionados a concentração de AVP tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Reaux-Le Goazigo *et al*, 2004; De Mota *et al*, 2004). Por exemplo, o aumento da osmolalidade plasmática é acompanhado por um aumento dos níveis plasmáticos de AVP e pela redução da concentração sistêmica da apelina (Azizi *et al*, 2008; Cernaro *et al*, 2012). Ainda, a estimulação osmótica induzida pela desidratação reduz os estoques de AVP, enquanto aumenta a concentração de apelina nos neurônios magnocelulares (Azizi *et al*, 2008). Portanto, é plausível que a regulação antagonista

entre APL e AVP contribua na manutenção hidromineral do organismo, prevenindo perdas adicionais de água durante estados de elevação da osmolalidade plasmática.

No hipotálamo e no plasma foram identificadas diferentes isoformas endógenas de APL que podem ativar rAPJ. Dentre elas, a forma piroglutamilada (Pyr<sup>1</sup>)apelina-13 mostrou-se mais abundante e mais ativa (Tatemoto *et al*, 1998; De Mota *et al*, 2004). Embora a distribuição do RNAm dos genes da apelina e de seu receptor dentro do SNC seja relatada em alguns trabalhos, sua relevância funcional para cada região ainda é alvo de investigações. Além disso, poucos autores avaliam o papel do sistema apelinérgico em regiões osmossensoras.

A co-expressão de apelina e AVP ou OT foi demonstrada em núcleos hipotalâmicos e em fibras axonais da EM (Reaux-Le Goazigo *et al*, 2004; De Mota *et al*, 2004; Bordineau *et al*, 2011). Em adição, rAPJ foram colocalizados em neurônios produtores e AVP ou OT no hipotálamo (O'Carroll; Lolait, 2003; Tobin, 2008). Estes achados corroboram a hipótese de que a APL pode modular a atividade neuronal e liberação dos hormônios hipotalâmicos, embora os resultados obtidos até o momento sejam discordantes entre si (Reaux *et al*, 2001; Taheri *et al*, 2002; Reaux-Le Goazigo *et al*, 2004; De Mota *et al*, 2004). Utilizando neurônios do SON de ratas virgens, Tobin *et al*. (2008) demonstrou que a administração de apelina-13 em neurônios SON via microdiálise aumenta a atividade elétrica de células AVP, mas também reduz a liberação somato/dendrítica de AVP. Esses achados sugerem uma regulação diferencial entre axônios e dentritos na secreção de AVP induzida pela apelina. A ativação de neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos em ratas lactantes é inibida pela administração intracerebroventricular (icv) de APL (Bordineau *et al*, 2011), com importante redução na liberação de AVP (Reaux *et al*, 2001; De Mota *et al*, 2004). Em contraste, outros autores verificaram que a apelina foi capaz de aumentar a liberação de AVP em ratos e em explantes hipotalâmicos (Taheri *et al*, 2002), efeito que posteriormente também foi observado em ruminantes (Charles; Rademaker; Richards, 2006; Sato *et al*; 2012). Assim, a expressão do sistema apelinérgico (APL/rAPJ) em áreas críticas para o controle hidroeletrólítico sugere sua importância nesta regulação. Novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos da apelina na regulação da atividade neuronal e secreção de hormônios hipotalâmicos.

Interessantemente, a expressão proteica de APL e seu receptor em neurônios magnocelulares é aumentada durante a desidratação (Reaux-Le Goazigo *et al*, 2004; O'Carroll; Lolait, 2003). Nesse contexto, discutiu-se que a maior imunorreatividade de APL nesses neurônios está associado ao aumento na sua síntese bem como a maior liberação de AVP em resposta a privação hídrica. Por outro lado, a administração icv de altas doses de APL inibe a liberação de AVP tanto em ratos normohidratados quanto em ratos privados de água (Reaux *et*

*al.*, 2001), contrastando com dados posteriores de que a apelina pode estimular significativamente a liberação de vasopressina *in vitro* (Taheri *et al.*, 2002).

Como já discutido anteriormente, os mecanismos de regulação hidroeletrólítica são alterados pelo envelhecimento de modo que a resposta a desafios osmóticos é prejudicada nos idosos. Neste contexto, Sauvant *et al.* (2014) relatou concentrações plasmáticas de AVP mais elevadas em animais idosos em comparação com jovens, enquanto os níveis de apelina estão reduzidos na população mais velha. Embora o sistema apelinérgico seja o foco de estudos mais recentes envolvendo o envelhecimento cardiovascular e o estresse oxidativo (Zhou *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018), nenhum outro autor buscou esclarecer o envolvimento da APL na expressão neuronal de enzimas e outros componentes envolvidos na regulação central da homeostase hídrica durante o envelhecimento.

### 2.3 NEUROTRANSMISSORES GASOSOS

A descoberta de gases como mensageiros biológicos mudou completamente o conceito tradicional de sinalização celular. De um modo geral, os gases podem apresentar diversas vantagens em relação aos neurotransmissores convencionais, como o menor tempo de meia vida, fácil difusão pelas membranas celulares e a rápida produção sob demanda (Zhuo *et al.*, 1993; Wood; Ood; Garthwait, 1994; Motterlini, 1999). Gases como o óxido nítrico (NO), apesar da interação covalente com seus alvos, sofrem associação com ânion superóxido ou a proteínas de defesa logo após sua ação (Dawson; Snyder, 1994). Essas e outras características contribuem para a ideia de que gasotransmissores sejam mediadores de respostas rápidas e autorreguladas, as quais em situações de alterações de osmolalidade, podem instantaneamente comunicar o hipotálamo para iniciar a correção de tonicidade plasmática.

Inicialmente o óxido nítrico e o monóxido de carbono (CO) foram estudados por suas ações vasodilatadoras no sistema cardiovascular periférico (Furchgott; Jothianandan, 1991; Verma, 1993). Sua identificação no SNC (Dawson; Snyder, 1994) e especialmente no hipotálamo, foi relacionada a modulação da secreção de AVP e OT frente a estímulos osmóticos (Kadekaro, 2004; Reis *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012). O óxido nítrico está entre os primeiros gases sinalizadores descobertos no organismo, sendo amplamente estudado por apresentar funções na neurotransmissão, tônus vascular, transcrição de genes, tradução de mRNA e modificações pós-traducionais de proteínas (Dawson; Snyder, 1994). No organismo humano, é produzido a partir do aminoácido L-arginina, na presença de oxigênio e NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato), pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A expressão da isoforma neuronal da NOS (nNOS) em regiões hipotalâmicas como neurônios do

PVN e do SON, lâmina terminal e neuro-hipófise, é uma evidência importante de envolvimento na regulação da homeostase hidromineral (Ventura *et al*, 2002; Dawson; Snyder, 1994). Essa hipótese é apoiada por modelos de estimulação hiperosmótica crônica, em que a expressão de nNOS nos respectivos núcleos hipotalâmicos foi aumentada (Kadowaki *et al*, 1994; Ueta; Chowdrey; Lightman, 1995). A inibição da nNOS aumenta a liberação de AVP e também o aumento de sua expressão por estímulo osmótico inibe a secreção de AVP e OT (Ventura *et al*, 2005; Kadekaro, 2004; Reis *et al*, 2007; Reis *et al*, 2010). Ainda, a produção basal de NO inibe a secreção tônica de AVP via estimulação gabaérgica em neurônios do PVN e SON, como mecanismo de preservação da atividade neuronal (Da Silva; Ventura; Varanda, 2013; Ventura *et al*, 2008). Desta maneira, o NO preserva os estoques de AVP e pode impedir a hiperativação de células AVP e OT durante estimulação osmótica prolongada.

O monóxido de carbono é outro gás neurotransmissor que também exerce efeitos no controle da homeostase hidromineral. Similarmente ao NO, a enzima que sintetiza o CO (heme oxigenase, HO) foi observada em núcleos hipotalâmicos do PVN e SON, porém sua isoforma HO-1 é expressa apenas em situações de estresse fisiológico (Vincent; Maines, 1994). Além disso, a desidratação provoca um aumento na expressão da isoforma induzível da HO tipo 1 (HO-1) nessas regiões (Reis *et al*, 2012). O bloqueio de HO pode inibir a liberação de OT basal e estimulada osmoticamente (Gomes *et al*, 2010), assim como reduzir a atividade elétrica de neurônios magnocelulares do SON sob condições de restrição hídrica (Reis *et al*, 2012). Portanto, sugere-se que a regulação positiva do sistema HO/CO em estruturas magnocelulares hipotalâmicas é um mecanismo necessário para o aumento da atividade neuronal frente à desafios osmóticos.

Os efeitos centrais de NO e CO na liberação de AVP e OT indicam uma correlação entre os sistemas, principalmente em situações de estresse osmótico. Interessantemente, a inibição de HO além de reduzir a liberação de OT como mencionado anteriormente, também teve como efeito aumentar a atividade enzimática da NOS em fragmentos hipotalâmicos de ratos (Gomes *et al*, 2010). Apesar do NO e do CO exercerem efeitos opostos sobre a ativação neuronal magnocelular, a estimulação osmótica aumenta a expressão e atividade da nNOS e da HO-1 nos núcleos hipotalâmicos (Reis *et al*, 2012). Nesse sentido, é plausível supor que em situações de aumento da osmolalidade, o CO atue inibindo o sistema NO/nNOS a fim de aumentar atividade e liberação de AVP e OT.

A relação entre os sistemas apelinérgico e NO/nNOS periféricos já havia sido relatada, onde o uso de um inibidor da isoforma endotelial da NOS (eNOS), aboliu o efeito de hipotensor



da apelina (Tatemoto *et al*, 2001). Além disso, o mesmo grupo verificou que administração sistêmica de APL aumenta os níveis de nitrito/nitrato, cuja medição indica indiretamente a degradação de NO. Outra evidência interessante foi a perda dos efeitos hipoglicemiantes da APL observada em camundongos knockout para a NOS (Duparc *et al*, 2011), revelando a importância do sistema nitrárgico nas funções exercidas pela apelina.

Por fim, tendo os sistemas APL/rAPJ, NO/nNOS e HO/HO-1 localizados em regiões cruciais para manutenção da homeostase hidroeletrólítica, sugere-se há uma comunicação entre eles, assim como observado perifericamente. É possível propor uma interação funcional entre a apelina e os gases neurotransmissores (NO e CO) na regulação neurosecretória e comportamental durante condições de hiperosmolalidade.

Durante o processo de envelhecimento, alterações na regulação neurosecretória mediada pelos sistemas apelinérgico (APL/rAPJ), óxido nítrico (NO/nNOS) e monóxido de carbono (CO/HO-1) no hipotálamo contribuem para o desequilíbrio na homeostase hidroeletrólítica. Essas alterações podem predispor os idosos a uma menor percepção de sede, reduzida resposta osmorregulatória e maior incidência de distúrbios hidroeletrólíticos em idosos, impactando negativamente sua saúde geral e aumentando o risco de complicações associadas à desidratação. Nossa hipótese é que a redução do sistema apelinérgico em indivíduos idosos leva ao aumento da expressão de mediadores inibitórios, como o NO, e conseqüentemente, redução de CO. A reposição de apelina pode contribuir para restabelecer essa neuroregulação gasosa no nível hipotalâmico.

### 3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho investiga a interação entre os sistemas APL/rAPJ, neurotransmissores gasosos como NO e CO, e sua possível alteração durante o processo de senescência. Observa-se que, sob condições hiperosmóticas, há um aumento na expressão desses sistemas em núcleos hipotalâmicos envolvidos na homeostase hidroeletrolítica. Embora o papel da apelina e dos neurotransmissores gasosos na modulação neuronal magnocelular seja suportado por diversos estudos, a interação funcional específica entre eles no hipotálamo ainda não foi avaliada.

Durante o envelhecimento há um aumento na osmolalidade plasmática, uma redução na percepção de sede e um aumento na atividade neuronal magnocelular. Sugere-se que a disfunção do sistema apelinérgico central ao longo da idade possa contribuir para essas mudanças. É crucial investigar se há alterações na sinalização entre gases neurotransmissores, como o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO), e o sistema APL/rAPJ central durante o envelhecimento

Portanto, espera-se que este projeto contribua significativamente para o desenvolvimento de estratégias de pesquisa e potenciais tratamentos de disfunções fisiológicas relacionadas às variações na osmolalidade plasmática. Essa pesquisa visa prevenir complicações graves e reduzir o índice de mortalidade, especialmente entre a população idosa, que é mais vulnerável à desidratação.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal deste projeto foi estudar a interação do sistema apelinérgico central na expressão de mRNA para nNOS e HO-1 no hipotálamo de animais adultos e idosos submetidos a estimulação osmótica.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 - Avaliar os efeitos do envelhecimento na expressão hipotalâmica de APL, nNOS e HO-1 em ratas fêmeas;
  
- 2 - Avaliar os efeitos da privação hídrica na expressão hipotalâmica de APL, nNOS e HO-1 em ratas fêmeas adultas e idosas;
  
- 3 - Avaliar se a administração central de APL altera a expressão hipotalâmica de nNOS e HO-1 de ratas submetidas a estimulação osmótica.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas entre 3-4 meses (adultos,  $\pm 250$ g) de idade e ratas Wistar fêmeas com 18 meses (idosos,  $\pm 300$ g) de idade, mantidas no Biotério Setorial do CFS em caixas coletivas forradas com maravalha, aclimatados à temperatura controlada (ar condicionado,  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com exaustão de ar para fora e, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz, 06:00–18:00h) e livre acesso à água e alimento (ração industrial). Animais adultos foram solicitados ao Biotério Central da UFSC com o mínimo de uma semana antes dos experimentos. Entretanto, animais com 8-9 meses de idade utilizados pelo Biotério Central como matrizes de procriação, foram solicitados e mantidos em nosso Biotério Setorial até atingirem a idade de 18 meses. Os protocolos experimentais desenvolvidos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) sob número 637425021.

### 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### **5.2.1 Avaliação dos efeitos do envelhecimento na expressão hipotalâmica de APL, nNOS e HO-1 em ratas fêmeas**

Para avaliar o efeito do envelhecimento na expressão de mRNA de APL, nNOS e HO-1 em regiões hipotalâmicas específicas, ratas fêmeas Wistar adultas ou idosas foram mantidas semanas sob monitoramento em gaiolas individuais durante 2 semanas com acesso livre a água e alimento (ração comercial). Ao final, após a eutanásia os encéfalos foram coletados para a extração do mRNA total dos núcleos PVN e SFO. A análise da expressão relativa do mRNA de nNOS e HO-1 foi realizada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

#### **5.2.2 Avaliação dos efeitos da privação hídrica na expressão hipotalâmica de APL, nNOS e HO-1 em ratas fêmeas adultas e idosas**

Os efeitos do envelhecimento e da privação hídrica na expressão de mRNA de APL, nNOS e HO-1 no PVN e no SFO foram avaliados em ratas Wistar fêmeas adultas e idosas mantidas sob as mesmas condições descritas no item 1. Antes de finalizar as duas semanas, foi realizada a retirada dos bebedouros e grupos de animais foram submetidos ou não a privação hídrica por 48 horas. Durante este período, os animais também estiveram acondicionados em gaiolas individuais. Ao final, os encéfalos foram coletados para a extração do mRNA total dos núcleos PVN e SFO. A análise da expressão relativa do mRNA de nNOS e HO-1 foi realizada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

### 5.2.3 Avaliação dos efeitos da administração central de APL na expressão hipotalâmica de nNOS e HO-1 de ratas submetidas a estimulação osmótica

A participação central da APL na expressão de enzimas produtoras de NO e CO em ratas Wistar fêmeas adultas e idosas foi avaliada através da infusão contínua icv de apelina-13 (APL-13, 24 nM/dia) ou veículo (NaCl 0,15M) por meio de mini-bombas osmóticas ao longo de 2 semanas. Durante este período, os animais estiveram acondicionados em gaiolas individuais, com acesso livre a água e alimento (ração comercial). Após as 2 semanas de tratamento, foi realizada a retirada dos bebedouros de água para dar início a privação hídrica de 48 horas. Ao final, os encéfalos foram coletados para a extração do mRNA total dos núcleos PVN e SFO. A análise da expressão relativa do mRNA de nNOS e HO-1 foi realizada por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

### 5.3 ANESTESIA E ANALGESIA

Todos os animais submetidos a manipulações cirúrgicas e eutanásia (ao final dos protocolos experimentais) foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de uma mistura de Cetamina e Xilazina (90 e 60 mg/kg de peso corporal, respectivamente). Após o término das cirurgias, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Zoetis, 24.000 UI/Kg de peso corporal, via intramuscular) e uma dose de analgésico (Cetoprofeno, 5 mg/Kg de peso corporal, via subcutânea).

### 5.4 FÁRMACOS UTILIZADOS

Para a realização de micro infusões via icv, foi utilizada uma minibomba osmótica (Alzet, modelo 2002) acoplada a um tubo PE-10 de polietileno de 5 cm até o kit de infusão cerebral (Alzet, kit 1), com um fluxo contínuo de 0,5 µl/hora por 14 dias. Todos os fármacos foram diluídos em salina isotônica (NaCl 0,15M) livre de pirógenos. Os fármacos para a microinjeção icv foram: **a)** Salina Isotônica: NaCl 0,15M; **b)** Apelina-13 trifluoroacetate salt (APL-13): 24 nM/dia.

### 5.5 PRIVAÇÃO HÍDRICA

Este procedimento tem o intuito de induzir um aumento na osmolalidade plasmática. Animais foram submetidos à privação hídrica (PH) por 48 horas (Reis *et al*, 2014) através ds remoção de bebedouro de água de suas gaiolas individuais. Todos animais deste projeto permaneceram com livre acesso a ração comercial durante os protocolos.

## 5.6 CANULAÇÃO DO VENTRÍCULO LATERAL

Para os experimentos de micro infusão, no dia anterior ao início do experimento os animais receberam um implante de uma cânula intracerebroventricular (icv) por meio da cirurgia estereotáxica utilizando um aparelho estereotáxico (Kopf). A cânula de 0,4 mm de comprimento, com suporte externo é acoplada a um cateter ligado diretamente a uma minibomba osmótica (Alzet). Na realização do implante das cânulas, foi utilizada a metodologia descrita por Antunes-Rodrigues e McCann (1970) e adaptada para a canulação do ventrículo lateral (vl) direito. Com base no atlas de Paxinos e Watson (1997), uma pequena incisão na calota craniana foi realizada com o auxílio de uma broca cirúrgica, onde foi implantada a cânula respeitando as seguintes coordenadas: Ântero-Posterior (AP): - 0,6mm ao bregma; Latero-Lateral: 1,5mm à direita ao bregma; Vertical: 3,6mm abaixo da calota craniana. A cânula foi imobilizada por meio de uma resina de acrílico autopolimerizável (Simplex) e com o auxílio de parafusos de aço inoxidável, fixados sobre a calota craniana. O posicionamento correto da cânula foi verificado no final do protocolo experimental.

## 5.7 IMPLANTE DA BOMBA OSMÓTICA

O implante da minibomba osmótica (Alzet, modelo 2002), para os protocolos de infusão contínua de fármacos, foi realizado logo após a implantação da cânula icv, e portanto, sob mesmo plano anestésico da cirurgia estereotáxica. Após a assepsia da região dorsal do animal, uma pequena incisão foi realizada e a minibomba, alojada na porção subcutânea. Por meio de um trocater, o cateter conectado à minibomba osmótica foi conduzido pela porção subcutânea até a região superior da cabeça, onde ele foi conectado à cânula icv. Em seguida, a região dorsal foi suturada.

## 5.8 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E PCR EM TEMPO REAL

Para a extração do RNA total dos núcleos hipotalâmicos, os animais foram anestesiados, e após averiguação de ausência dos reflexos interdigital, palpebral e caudal, os encéfalos foram imediatamente removidos e congelados. Fatias cerebrais foram cortadas na espessura de 1500  $\mu\text{m}$ , utilizando um criostato. Com o auxílio de uma agulha de punch com 1,5 mm de diâmetro interno os núcleos PVN e SFO foram dissecados. As amostras foram homogeneizadas em 250  $\mu\text{l}$  1X PBS e em seguida, adicionado 750  $\mu\text{l}$  de solução monofásica de phenol/guanidinium thiocyanate (Trizol - Invitrogen, New Zealand) e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  de clorofórmio e 1  $\mu\text{l}$  de glicogênio gelado

(20mg/ml). As amostras foram posteriormente centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante contendo o RNA total foi transferido para outro tubo contendo 500 µl de álcool isopropílico, sendo incubado por 10 min e centrifugado por 10 min a 12.000 rpm a 4°C. Logo após, foi removido o álcool isopropílico e adicionado 1 ml de etanol 75% diluído em água tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC). A solução foi agitada e centrifugada por 5min a 7.500 rpm a 4°C. O etanol foi retirado e o tubo ficou exposto à temperatura ambiente para a secagem do material e, em seguida, foi ressuscitado com 15 µl de água DEPC. O material foi incubado por 10 min a 60°C no banho seco. Uma alíquota foi removida para verificar a integridade do RNA em uma eletroforese em gel agarose 1,2% durante 60 min a 80V, e foi considerada aceitável somente quando as bandas 18S e 28S do RNA ribossômico foram visualizadas no gel. O RNA total obtido foi quantificado utilizando um espectrofotômetro com absorvância de 260 nm. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 250 ng de RNA, utilizando kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Neste protocolo, foram utilizados os seguintes reagentes: 1,25 µl de 10X RT Buffer, 0,50 µl de 25X dNTP Mix (100mM), 1,25 µl de 10X RT Random Primers, 0,75 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase e 18,75 µl de água DEPC. A transcrição reversa foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 10 min a 25°C e 120 min a 37°C. O cDNA obtido foi diluído em água DEPC na proporção 1:4. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em duplicata utilizando 4 µl de cDNA e 8 µl de uma mistura contendo 6,25 µl de solução Taqman Fast Master Mix (Applied Biosystems), 0,65 µl de sonda específica e 1,60 µl de água DEPC. As sondas específicas para os genes alvo foram adquiridas da empresa Applied Biosystems: nNOS (Rn00583793), HO-1 (Rn01536933) e apelina (Rn00581093) que são marcadas com repórter fluorescente FAN. As reações foram realizadas em um equipamento Real-Time PCR System (Applied Biosystems) tendo uma desnaturação inicial de 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15s de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento e extensão a 60°C. A amplificação da sequência alvo foi detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorreu com a formação de dupla fita na região codificada pelo par de iniciadores. Foi utilizado um gene de referência (housekeeping gene) como controle endógeno: Beta-Actina (4352340E), marcada com repórter fluorescente VIC. A expressão relativa do gene alvo foi calculada baseando-se no threshold cycle (Ct). Os métodos foram analisados de acordo com o método  $\Delta\Delta Ct$ . A média geométrica do Ct dos genes de referência foi subtraída do Ct do gene de interesse para determinar o  $\Delta Ct$  de cada amostra. O  $\Delta Ct$  do calibrador (grupo controle) foi subtraído do  $\Delta Ct$  de cada amostra dos genes alvo para determinar o  $\Delta\Delta Ct$ . Este valor foi aplicado na equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , resultando na expressão relativa de RNAm.

### **5.8.1 Análise Estatística**

Todos os resultados obtidos nestes estudos foram expressos como médias  $\pm$  EPM. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism 9.5.0, onde foi aplicado o teste t student para comparação entre dois grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



## 7 RESULTADOS

### 7.1 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA DE APL, NOS NEURONAL E HO-1 EM RATAS FÊMEAS

A expressão de APL, nNOS e HO-1 foi avaliada no PVN e SFO de animais adultos e idosos normohidratados. Conforme demonstrado na figura abaixo, o envelhecimento não influenciou na expressão dos respectivos genes tanto no PVN (Fig.1 A-C,  $p > 0,05$ ), quanto no SFO (Fig.2 A-C,  $p > 0,05$ ).

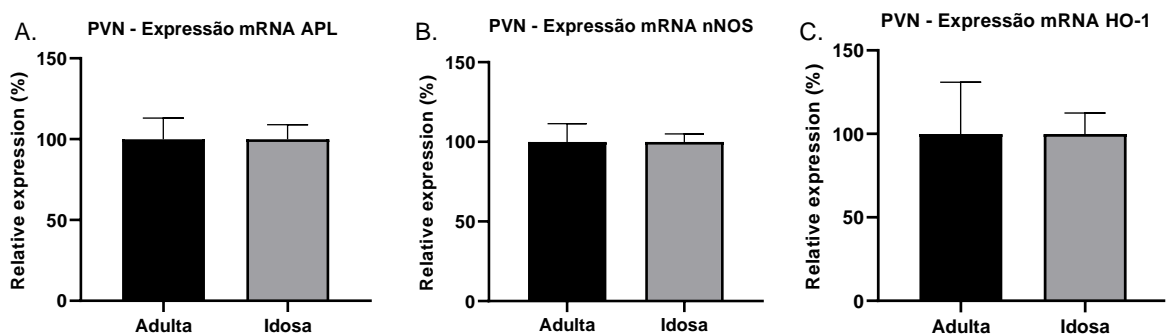


Figura 1: Expressão relativa de mRNA no PVN. Os genes apelina (APL, gráfico A,  $n = 5$ ), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico B,  $n = 4$ ), heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 3$ ) estão expressos em percentual relativo no núcleo paraventricular (PVN) de ratas fêmeas adultas (3 meses, coluna preta) e idosas (18 meses, coluna cinza) normohidratadas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi utilizado o teste T student entre os grupos.

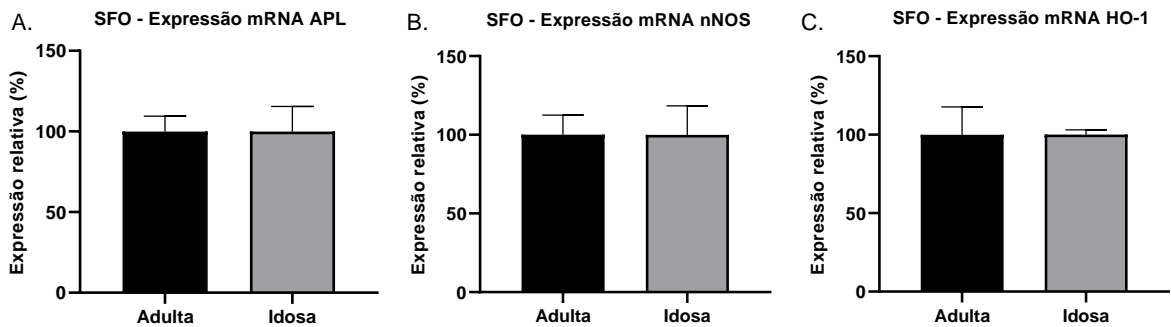


Figura 2: Expressão relativa de mRNA no SFO. Os genes apelina (APL, gráfico A,  $n = 4$ ), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico B,  $n = 4$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 3$ ) estão expressos em percentual relativo no órgão subfornical (SFO) de ratas fêmeas adultas (3 meses, coluna preta) e idosas (18 meses, coluna cinza) normohidratadas. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi utilizado o teste T student entre os grupos.

## 7.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO HÍDRICA NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA DE APL, NOS NEURONAL E HO-1 EM RATAS FÊMEAS ADULTAS E IDOSAS

Independentemente da idade, a expressão do gene APL não foi afetada ao longo da estimulação osmótica no PVN (Fig. 3A e 3D;  $p > 0,05$ ). Porém, detectamos uma variação positiva na expressão de apelina em ratas idosas durante a restrição hídrica (Fig. 3D, +36%). Além disso, a PH48h aumentou a expressão de nNOS no PVN de animais mais jovens (Fig. 3B,  $p < 0,05$ ), mas esse efeito não foi observado no animal idoso (Fig. 3E,  $p > 0,05$ ). Ainda, a expressão de mRNA de HO-1 também foi estimulada pela restrição hídrica somente no PVN de animais adultos (Fig. 3C,  $p > 0,05$ ). Fêmeas idosas não apresentaram alterações significativas de expressão gênica entre os genes pesquisados no PVN (Fig. 3D-F,  $p > 0,05$ ). Contudo, foram identificadas variações positivas na expressão de HO-1 (64%) no PVN de animais idosos após a PH (Fig. 3F).

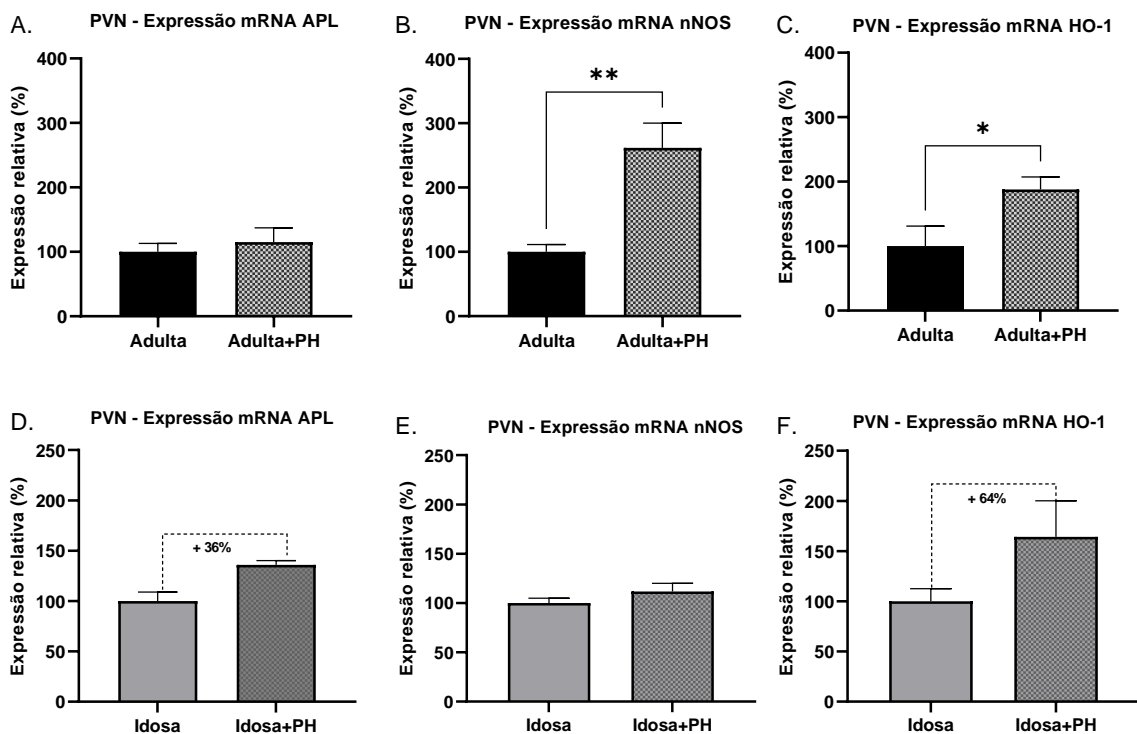


Figura 3: Expressão relativa de mRNA no PVN após privação hídrica. Os genes apelina (APL, gráfico A,  $n = 5$ ), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico B,  $n = 3$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 4$ ) estão expressos em percentual relativo no núcleo paraventricular (PVN) de ratas fêmeas adultas (3 meses, gráficos A-C) e idosas (18 meses, gráficos D-F) após 48 horas de privação hídrica (PH). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi utilizado o teste T. \* $p < 0,05$  (em relação a adulta); \*\*  $p < 0,01$  (em relação a adulta). Linha tracejada: percentual de aumento ou redução em relação ao controle (idosa) normohidratada.

Na figura 4 é possível visualizar uma comparação direta do efeito da idade na expressão dos respectivos genes no PVN de ratas fêmeas durante a estimulação osmótica. Nesse

contexto de privação hídrica, idosas apresentaram uma redução significativa na expressão de nNOS no PVN (Fig.4B,  $p>0,05$ ). Os demais genes não foram expressos diferentemente em animais jovens ou idosos, apesar da PH.

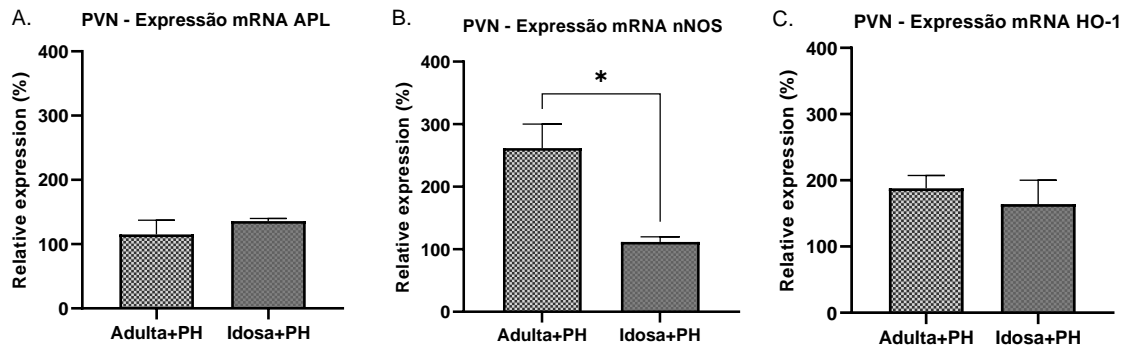


Figura 4: Efeito da idade na expressão de mRNA no PVN após privação hídrica. Os genes apelina (APL, gráfico A,  $n = 5$ ), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico B,  $n = 3$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 4$ ) estão expressos em percentual relativo no núcleo paraventricular (PVN) de ratas fêmeas adultas (3 meses, Adulta+PH) e idosas (18 meses, Idosa+PH) após 48 horas de privação hídrica (PH). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi utilizado o teste T student e ANOVA one way entre os grupos.  $*p<0,05$  (em relação a adulta em privação hídrica).

Nosso modelo de estresse osmótico não ocasionou alterações nos parâmetros de expressão de APL no SFO (Fig. 5A e 5D;  $p>0,05$ ). Contudo, a privação hídrica de 48 horas atenuou a expressão de HO-1 no SFO dos animais idosos (Fig. 5F,  $p<0,05$ ), efeito que não foi reproduzido no grupo adulto (Fig. 5C,  $p>0,05$ ). Ademais, apenas o gene para NOS neuronal exibiu uma tendência de variação positiva no SFO durante a estimulação osmótica promovida pela PH48h, independentemente da idade (Fig. 5B e 5E, +35 e +82%, respectivamente).

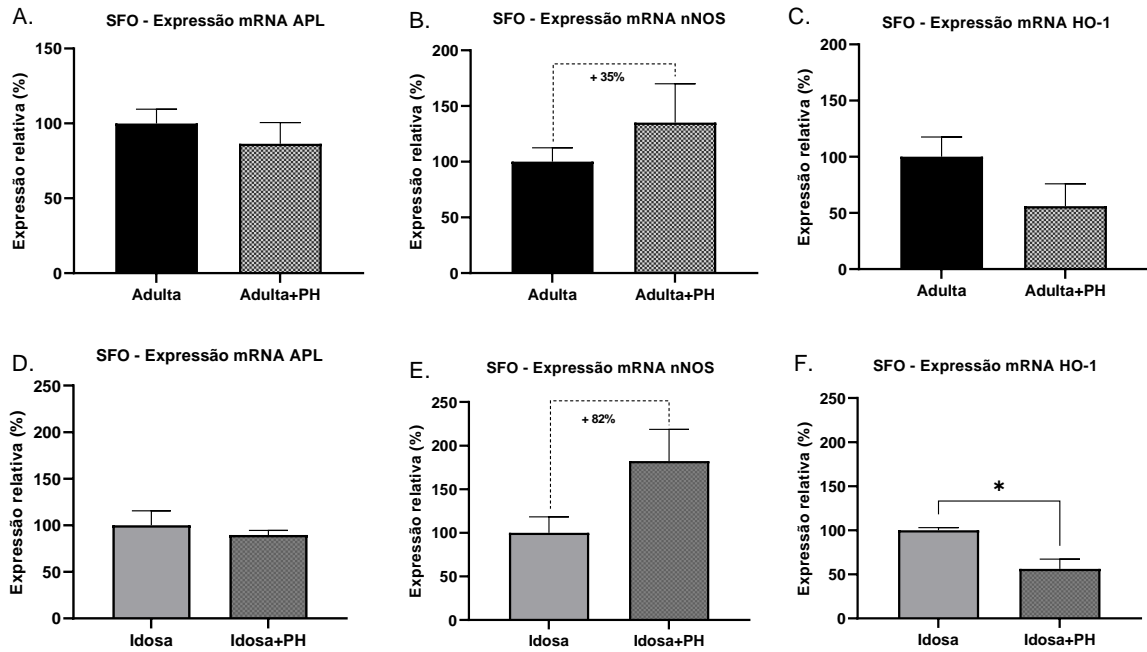


Figura 5: Expressão de mRNA no SFO após privação hídrica. Os genes apelina (APL, gráfico A,  $n = 4$ ), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico B,  $n = 3$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 4$ ) estão expressos em percentual relativo no órgão subfornical (SFO) de ratas fêmeas adultas (3 meses, gráficos A-C) e idosas (18 meses, gráficos D-F) após 48 horas de privação hídrica (PH). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi utilizado o teste T student. \* $p < 0,05$  (em relação a adulta/idosa). Linha tracejada: percentual de aumento ou redução em relação ao controle (adulta) normohidratada.

O envelhecimento não alterou a expressão relativa dos genes APL, nNOS e HO-1 no SFO de animais submetidos a privação hídrica (Fig. 6A-C). No entanto, igualmente observado no PVN, o SON apresentou uma alteração positiva maior na expressão de nNOS de ratas idosas, quando comparados as adultas (+47%, Fig. 6B).

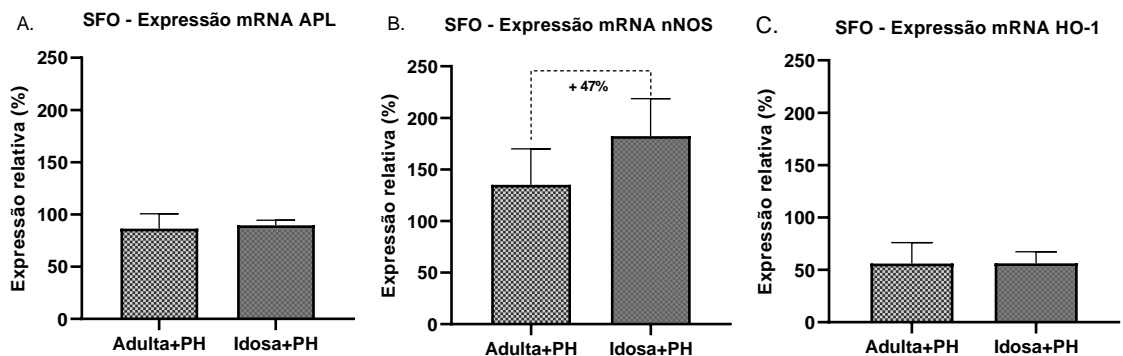


Figura 6: Efeito da idade na expressão de mRNA no SFO após privação hídrica. Os genes apelina (APL, gráfico A,  $n = 5$ ), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico B,  $n = 3$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 4$ ) estão expressos em percentual relativo no órgão subfornical (SFO) de ratas fêmeas adultas (3 meses, Adulta+PH) e idosas (18 meses, Idosa+PH) após 48 horas de privação hídrica (PH). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi

utilizado o teste T student. Linha tracejada: percentual de aumento ou redução em relação a adulta em privação hídrica.

### 7.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE APL NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA DE NOS NEURONAL E HO-1 DE RATAS SUBMETIDAS A ESTIMULAÇÃO OSMÓTICA

O papel do sistema apelinérgico foi investigado através da infusão contínua de APL ao longo do protocolo anteriormente descrito. Nesse sentido, animais adultos em privação hídrica apresentam um aumento na expressão de NOS neuronal no PVN quando tratados previamente com APL (Fig. 7A,  $p < 0,05$ ), enquanto nos animais idosos a expressão permaneceu inalterada (Fig. 7C,  $p > 0,05$ ). Interessantemente, o tratamento icv com APL atenuou significativamente a expressão de mRNA de HO-1 nos somente nos idosos após a PH (Fig. 7D,  $p < 0,05$ ).

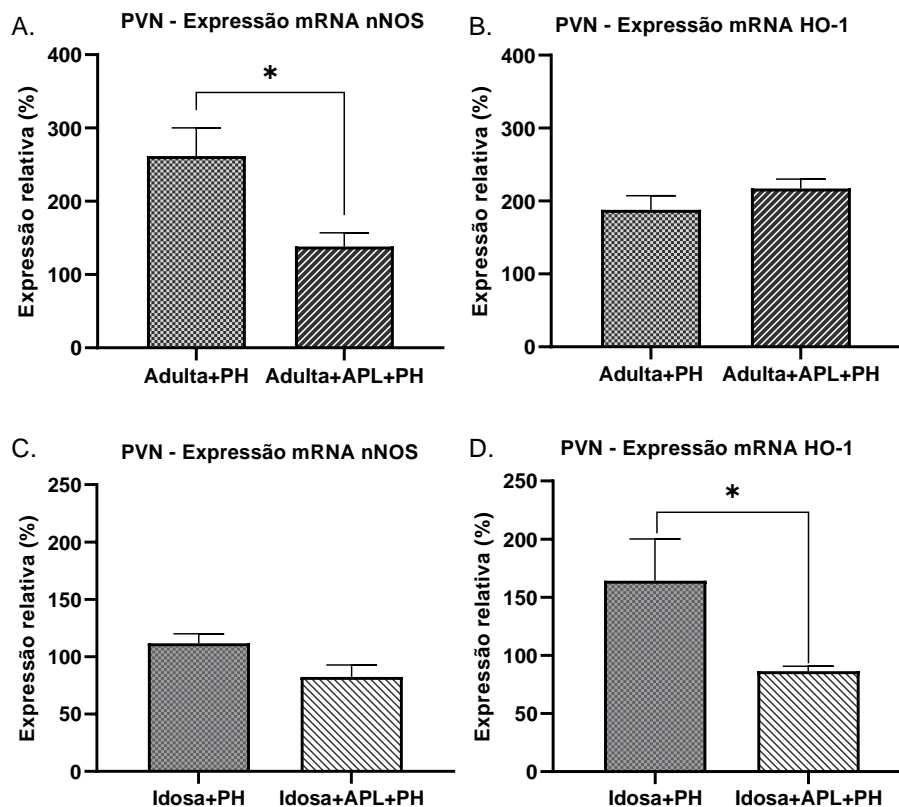


Figura 7: Expressão de mRNA no PVN após tratamento com APL. Os genes óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico A e C,  $n = 3$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 4$ ) estão expressos em percentual relativo no núcleo paraventricular (PVN) de ratas fêmeas adultas (3 meses, gráficos A e B) e idosas (18 meses, gráficos C e D) submetidas a privação hídrica (PH) de 48 horas após tratamento icv com veículo (NaCl 0,15M, Adulta+PH ou Idosa+PH) ou apelin-13 (APL-13, 24 nM/dia, Adulta+APL+PH ou Idosa+APL+PH). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Foi utilizado o teste T student. \* $p < 0,05$  (em relação a Adulta+PH ou Idosa+PH).

As análises estatísticas realizadas não foram capazes de detectar alterações significativas na expressão relativa de nenhum dos genes pesquisados no SFO de animais adultos e idosos privados tratados com APL centralmente (Fig. 8A-D,  $p>0,05$ ). Contudo, o tratamento com APL tende a reduzir a expressão de nNOS no SFO de ratas privadas e tratadas com APL, independentemente da idade (Fig. 8A e 8C, -51% e -76%, respectivamente).

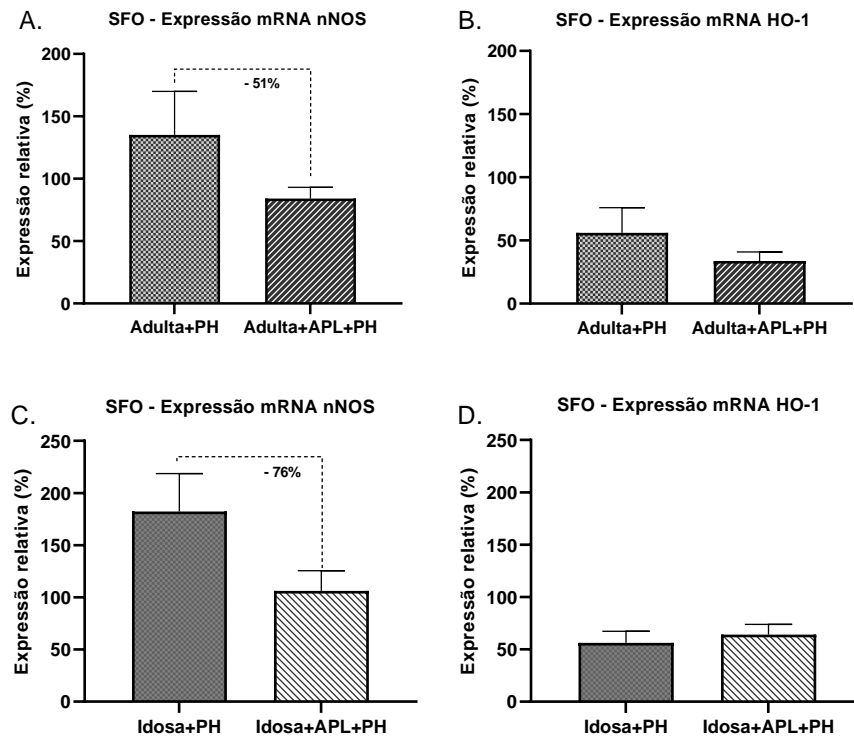


Figura 8: Expressão de mRNA no SFO após tratamento com APL. Os genes óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, gráfico A e C,  $n = 3$ ) e heme-oxigenase 1 (HO1, gráfico C,  $n = 4$ ) estão expressos em percentual relativo no órgão subfornical (SFO) de ratas fêmeas adultas (3 meses, gráficos A e B) e idosas (18 meses, gráficos C e D) submetidas a privação hídrica (PH) de 48 horas após tratamento icv com veículo (NaCl)

## 8 DISCUSSÃO

Na última década, a importância da apelina e seus homólogos foi evidenciada em estudos que avaliam a modulação central da homeostase hídrica, principalmente voltada para o controle da produção e liberação de AVP. A expressão gênica vem amplamente sendo utilizada para estudar mecanismos de atuação de gases neurotransmissores a fim de correlacioná-los aos seus níveis plasmáticos, neurorecepção e prováveis interações com outros mensageiros. Deste modo, inicialmente buscamos elaborar um perfil central das enzimas produtoras de NO e HO, bem como do gene para síntese de APL. Com base neste perfil, investigamos os efeitos do envelhecimento, da privação hídrica e do tratamento crônico de APL no hipotálamo e na lâmina terminal de ratas fêmeas.

Primeiramente, nosso grupo investigou a idade como um fator de influência sobre a expressão de genes envolvidos na sinalização hipotalâmica em animais normohidratados. Sauvant et al (2014) relatou um aumento nos níveis de hipotalâmicos APL e seu mRNA ao longo do envelhecimento em ratos machos com acesso a água, efeito que não foi observado no PVN e SFO dos animais de nosso estudo. Não encontramos outros autores que avaliaram especificamente a expressão de APL sob as mesmas condições e nas regiões hipotalâmicas analisadas por nosso grupo, tendo alguns resultados encontrados somente no SON. Como células magnocelulares do PVN e o SON exercem funções semelhantes na secreção de AVP e OT (Antunes-Rodrigues et al, 2004), esperava-se encontrar alterações similares no PVN. Por outro lado, o SFO é uma região conhecida especialmente pelo monitoramento da osmolalidade plasmática, ou seja, desempenha função distinta das células neurosecretoras. Nesse sentido, apenas um único estudo identificou um aumento na expressão de APL em órgãos circumventriculares (SFO, OVLT e área postrema), mas em ratos adultos espontaneamente hipertensos (Griffiths *et al*, 2020). A existências de poucos estudos envolvendo a expressão de APL sob condições semelhantes deste trabalho, dificulta a compreensão do seu papel durante o envelhecimento. Em relação a nNOS e HO-1, não encontramos na literatura quanto a expressão gênica destas enzimas em animais idosos sob condições basais de hidratação. Portanto, nossos achados sugerem que a idade não influencia diretamente na expressão de APL, HO-1 ou de NOS neuronal em células magnocelulares do PVN e na região osmossensora (SFO).

O envelhecimento é acompanhado por alterações neurosecretórias, anatômicas e comportamentais que limitam a capacidade de resposta do idosos durante desafios osmóticos (Zamboni *et al*, 2003; Constantino *et al*, 2016). Para avaliar se o declínio destas funções em situações de estresse osmótico está relacionado a expressão de APL e neurotransmissores gasosos, também utilizamos um grupo de animais em privação hídrica. Neste protocolo, não foram encontradas variações significativas na expressão de APL pelo PVN ou SFO. Este achado

é contrário as afirmações de que a PH modula positivamente o mRNA para o gene APL (O'Carroll; Lolait, 2003; Reaux-Le *et al*, 2004). Nossos resultados apenas sugerem que a privação hídrica exerce uma influência positiva na expressão de APL do PVN em animais mais velhos. Na literatura há indícios que idosos apresentam níveis hipotalâmicos de APL mais altos em relação a animais adultos normohidratados, enquanto os níveis plasmáticos são mais baixos e não alteram frente a desidratação (Sauvant *et al*, 2014). De acordo com Griffiths *et al*. (2020), rAPJ foi expresso de forma relativamente forte em todos os CVOs de ratos hipertensos, enquanto os níveis de mRNA da APL foram mais baixos (em relação a expressão do receptor) e uniformes entre essas regiões. Com base nestes achados, é plausível que ocorra uma disfunção na expressão do rAPJ em função dos elevados estoques de APL no idoso, o que pode ser associado a expressão inalterada de mRNA de APL durante a PH. Contudo nosso modelo experimental limitou-se a quantificação de mRNA para APL, sem avaliar a expressão de seu receptor ou os níveis centrais da molécula ativa. Demais aferições devem ser efetuadas para correlacionar e complementar os resultados promovidos por nosso trabalho.

O NO é uma molécula sinalizadora de rápida meia vida e que está intimamente relacionada ao estresse oxidativo e consequente neurotoxicidade (Dawson; Dawson, 1996; Manucha, 2017). Portanto, baixos títulos de mRNA da nNOS são esperados em condições basais, corroborando o resultado encontrado neste trabalho, em que a expressão permaneceu inalterada com a idade. Por outro lado, a estimulação osmótica promovida por nosso modelo experimental aumentou significativamente a produção de mRNA para nNOS no PVN de ratas adultas. Este efeito vai de encontro com resultados de outros autores em que a expressão de nNOS no PVN de animais adultos foi intensificada após a restrição hídrica ou alimentar (Ueta *et al*, 1995; O'Shea; Gundlach, 1996; Reis *et al*, 2012). Não verificamos aumento na expressão de nNOS em idosos, reforçando a hipótese de que o comprometimento da síntese de NO pela idade pode estar contribuindo adicionalmente na hiperatividade AVPérgica na população idosa. Além disso, as ratas idosas em PH apresentaram níveis mais baixos de nNOS em comparação com as ratas mais jovens. Este achado reforça a importância da função inibitória do NO durante situações prolongadas de restrição hídrica (Ventura *et al*, 2005; Kadekaro, 2004; Reis *et al*, 2007; Reis *et al*, 2010)

Por outro lado, a produção da HO-1 também foi estimulada pela privação hídrica no PVN do grupo mais jovem, efeito inverso observado no SFO dos animais idosos. Este resultado é esperado ao considerar o estresse como principal estímulo para a produção de CO via atividade da HO-1 (Wu; Wang, 2005; Reis *et al*, 2012). Sobretudo, como o CO pode atuar inibindo a nNOS, é plausível sugerir que em animais jovens este gás anule parte da inibição do NO sobre a secreção de AVP e OT, permitindo o equilíbrio entre as funções e consequente



reestabelecimento da homeostase durante distúrbios na osmolalidade. Assim, a produção de CO impediria a contrarregulação do NO sobre a secreção de AVP e consequente hiperatividade magnocelular em idosos. Para apoiar esta hipótese, apesar de não haver aumento estatisticamente significativo, detectamos uma tendência positiva na expressão de nNOS no SFO dos animais idosos, cuja expressão de HO-1 é reduzida pela estimulação osmótica neste mesmo núcleo. Novamente, são necessários novos estudos para correlacionar a transcrição destes sinais em produção efetiva de NO e CO pelo hipotálamo.

Interessantemente, descobrimos que a administração icv de APL-13 reduz a expressão de nNOS no PVN de animais adultos após a restrição hídrica. Além disso, também identificamos uma tendência de redução semelhante na expressão de NOS neuronal pelo SFO em adultos e idosos após o tratamento com APL. Este resultado parece contraditório quando comparado a literatura, pois a APL tende a inibir a atividade magnocelular (Bordineau *et al*, 2011) e diversos autores relatam que a expressão de nNOS é intensificada pela desidratação (Reaux-Le Goazigo *et al*, 2004; O'Carroll; Lolait, 2003). Como os níveis de mRNA de nNOS e HO-1 aumentam no adulto e tendem a aumentar no idoso durante a PH, é plausível sugerir que a APL central foi responsável pela inibição dos respectivos genes no idoso. Neste caso, conforme discutido anteriormente, ao reduzir a produção neuronal de NOS, o sistema apelinérgico central estaria anulando o efeito inibitório do NO sobre o hipotálamo e por sua vez, permitindo a secreção de AVP em situações de estresse osmótico. Portanto, é possível que em situações de estresse osmótico a APL melhora a secreção de AVP em animais jovens indiretamente por bloqueio da produção NO. Ainda no contexto, é válido ressaltar que os animais idosos demonstraram variações positivas na expressão de HO-1 quando submetido a PH, mas que esse efeito foi revertido pelo tratamento icv com APL. A apelina atenuou a expressão de HO-1 e consequente síntese de CO, o que pode ajudar a prevenir a hiperativação de células AVP. Mais importante ainda, embora a APL não tenha alterado a expressão de HO-1 no PVN do adulto em privação, idosos tiveram uma expressão menor de HO-1 sob estimulação osmótica, em comparação com os valores inalterados dos animais adultos. Portanto, nossos resultados sugerem que o efeito da APL nas células magnocelulares é comprometido pelo envelhecimento, uma vez que mesmo na presença de APL, houve diferenças na resposta de ratas jovens e idosas ao estresse osmótico. O grupo mais jovem respondeu a desidratação com maiores níveis de nNOS e HO-1, enquanto idosas tendem a responder com maior expressão de APL e HO-1, ou ainda, com redução efetiva de nNOS e HO-1 se tratadas com APL. Isso indica que o desequilíbrio hipotalâmico na regulação hídrica de animais idosos pode estar relacionado à queda nos níveis centrais de APL ou redução da

interação com seu receptor. Estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de ação e liberação da APL são necessários para esclarecer sua atuação na homeostase hidroeletrolítica.

É importante ressaltar que as diferenças entre nossos achados e a literatura podem ser diretamente relacionadas as regiões de extração do material genético, uma vez que a maior parte dos trabalhos investigam o PVN e o SON. Embora essas regiões estejam correlacionas a homeostase hidroeletrolítica, diferem em função do SFO e por isso, podem apresentar outras demandas de APL e das enzimas aqui estudadas. Ainda, como a PCR em tempo real é uma técnica muito sensível, a amplificação de material genético pode ser muito influenciada pelo número de animais ou execução técnica em si, uma vez que o erro analítico aumenta exponencialmente a cada ciclo de amplificação, o que pode mascarar alterações discretas na expressão. E nesse contexto, o número de animais idosos pode estar abaixo do necessário para obter alterações claras a nível estatístico. Ainda, alguns resultados foram referidos como tendência ou variações positivas/negativas. Isso porque apesar da análise estatística não considerar significância, uma variação na expressão de um gene pode sim ter valor biológico, principalmente considerando o conteúdo de mRNA para uma enzima produtora de gases neurotransmissores.

Por fim, grande parte dos estudos encontrados na literatura foram realizados com animais machos, excluindo os estrógenos como variável. Os estrógenos são moduladores centrais importantes no comportamento de ingestão de água (Almeida-Pereira *et al*, 2013; Vilhena-Franco *et al*, 2016) e, portanto, grupos com fêmeas devem ser incluídos para obtenção de dados mais representativos da população em geral.

## 9 CONCLUSÃO

Demonstramos pela primeira que o envelhecimento não altera o perfil de expressão de enzimas produtoras de NO e CO nas regiões de osmorecepção e neurosecreção investigadas. Contudo, idosas apresentam um déficit na sinalização para síntese de NO pelo PVN, além de níveis mais baixos de HO-1 durante o desafio osmótico, o sugere um desbalanço na neuromodulação de neurônios AVPérgicos que podem estar relacionadas as alterações na atividade e secreção magnocelular durante o envelhecimento.

Por fim, este trabalho demonstra a participação central do NO e do CO em núcleos hipotalâmicos envolvidos na homeostase hidroeletrólítica de ratas adultas e idosas submetidas a PH. Ainda, a administração hipotalâmica da apelina apresenta ações distintas entre ratas adultas e idosas durante a estimulação osmótica. Neste sentido, a apelina central deprime o sistema nitrérgico principalmente em ratas adultas, enquanto na via da produção de CO, a apelina agiu preferencialmente reduzindo a HO-1 em ratas idosas. Esses dados em conjunto demonstram que a APL pode facilitar a produção neuroendócrina por remover os efeitos inibitórios do NO em ratas adultas. Por outro lado, a redução da produção de CO central induzida pela apelina durante o envelhecimento dificulta a síntese hormonal.

Portanto, nossos resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos centrais envolvidos na homeostase hidroeletrólítica, acrescentando uma interface entre o sistema apelinérgico e dos gases neurotransmissores.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PEREIRA, G. et al. The role of estradiol in adrenal insufficiency and its interaction with corticosterone on hydromineral balance. *Hormones and behavior*, v. 64, n. 5, p. 847–855, 2013.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological reviews*, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, n. 4, p. 327–338, 2013.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M. Water, sodium chloride, and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle of the rat brain. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, v. 133, n. 4, p. 1464–1470, 1970.
- ARIEFF, A. I.; DEFRONZO, R. A. **Fluid, electrolyte and acid-base disorders**. 2. ed. Londres, England: Churchill Livingstone, 1995.
- ARIEFF, A. I.; GUISSANO, R. Effects on the central nervous system of hypernatremic and hyponatremic states. *Kidney international*, v. 10, n. 1, p. 104–116, 1976.
- ATILA, C. et al. Prevalence and outcome of dysnatremia in patients with COVID-19 compared to controls. *European journal of endocrinology*, v. 184, n. 3, p. 409–418, 2021.
- AZIZI, M. et al. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, v. 19, n. 5, p. 1015–1024, 2008.
- BLANCHARD, A. et al. An abnormal apelin/vasopressin balance may contribute to water retention in patients with the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (SIADH) and heart failure. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 98, n. 5, p. 2084–2089, 2013.
- BODINEAU, L. et al. Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology*, v. 152, n. 9, p. 3492–3503, 2011.

BORRA, S. I.; BEREDO, R.; KLEINFELD, M. Hyponatremia in the aging: causes, manifestations, and outcome. **Journal of the National Medical Association**, v. 87, n. 3, p. 220–224, 1995.

BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H. Osmoreceptors in the central nervous system. **Annual review of physiology**, v. 59, n. 1, p. 601–619, 1997.

CAZALIS, M.; DAYANITHI, G.; NORDMANN, J. J. The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe. **The journal of physiology**, v. 369, n. 1, p. 45–60, 1985.

CERNARO, V. et al. Apelin, plasmatic osmolality and hypotension in dialyzed patients. **Blood purification**, v. 33, n. 4, p. 317–323, 2012.

CHARLES, C. J.; RADEMAKER, M. T.; RICHARDS, A. M. Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep. **The journal of endocrinology**, v. 189, n. 3, p. 701–710, 2006.

COSTANTINO, S.; PANENI, F.; COSENTINO, F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. **The journal of physiology**, v. 594, n. 8, p. 2061–2073, 2016.

COWEN, L. E.; HODAK, S. P.; VERBALIS, J. G. Age-associated abnormalities of water homeostasis. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 42, n. 2, p. 349–370, 2013.

DA SILVA, M. P.; VENTURA, R. R.; VARANDA, W. A. Hypertonicity increases NO production to modulate the firing rate of magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats. **Neuroscience**, v. 250, p. 70–79, 2013.

DAVIES, I. et al. Age-associated alterations in thirst and arginine vasopressin in response to a water or sodium load. **Age and ageing**, v. 24, n. 2, p. 151–159, 1995.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 5147–5159, 1994.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 10, n. 3–4, p. 179–190, 1996.

DE MOTA, N. et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 28, p. 10464–10469, 2004.

DE MOTA, N.; LENKEI, Z.; LLORENS-CORTÈS, C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. **Neuroendocrinology**, v. 72, n. 6, p. 400–407, 2000.

DUGGAN, J. et al. The association of age with plasma arginine vasopressin and plasma osmolality. **Age and ageing**, v. 22, n. 5, p. 332–336, 1993.

DUPARC, T. et al. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1477–1496, 2011.

FILIPPATOS, T. D. et al. Hyponatremia in the elderly: challenges and solutions. **Clinical interventions in aging**, v. 12, p. 1957–1965, 2017.

FLIERS, E.; SWAAB, D. F. Activation of vasopressinergic and oxytocinergic neurons during aging in the Wistar rat. **Peptides**, v. 4, n. 2, p. 165–170, 1983.

FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. **Free radical research**, v. 31, n. 6, p. 459–475, 1999.

FURCHGOTT, R. F.; JOTHIANANDAN, D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. **Blood vessels**, v. 28, n. 1–3, p. 52–61, 1991.

GAO, S.; CHEN, H. Therapeutic potential of apelin and Elabela in cardiovascular disease. **Biomedicine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 166, n. 115268, p. 115268, 2023.

GOMES, D. A. et al. 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.

GRIFFITHS, P. R. et al. Increased apelin receptor gene expression in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0231844, 2020.

HAANWINCKEL, M. A. et al. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7902–7906, 1995.

HASLER, U. et al. Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 17, n. 6, p. 1521–1531, 2006.

HAWKINS, R. C. Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 337, n. 1–2, p. 169–172, 2003.

HOSOYA, M. et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. **The journal of biological chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21061–21067, 2000.

KADEKARO, M. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 441–450, 2004.

KADOWAKI, K. et al. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. **Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 1011–1017, 1994.

MANUCHA, W. Mitochondrial dysfunction associated with nitric oxide pathways in glutamate neurotoxicity. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis (English Edition)**, v. 29, n. 2, p. 92–97, 2017.

MATSUMOTO, M. et al. Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven-transmembrane receptor, APJ, in human brain. **Neuroscience letters**, v. 219, n. 2, p. 119–122, 1996.

MEDHURST, A. D. et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. **Journal of neurochemistry**, v. 84, n. 5, p. 1162–1172, 2003.

MELIS, M. R. et al. Oxytocin concentration changes in different rat brain areas but not in plasma during aging. **Neurobiology of aging**, v. 13, n. 6, p. 783–786, 1992.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. OMS divulga novas estatísticas mundiais de saúde. **Portal Nações Unidas Brasil**. Brasília, DF: 23 mai. 2022. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/183080-oms-divulga-novas-estat%C3%ADsticas-mundiaisde-sa%C3%BAde>. Acesso em: 20 out. 2023.

O'CARROLL, A.-M.; LOLAIT, S. J. Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli: Osmotic stimulation of APJ receptor mRNA in magnocellular neurones. **Journal of neuroendocrinology**, v. 15, n. 7, p. 661–666, 2003.

O'DOWD, B. F. et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. **Gene**, v. 136, n. 1–2, p. 355–360, 1993.

O'SHEA, R. D.; GUNDLACH, A. L. Food or water deprivation modulate nitric oxide synthase (NOS) activity and gene expression in rat hypothalamic neurones: correlation with neurosecretory activity? **Journal of neuroendocrinology**, v. 8, n. 6, p. 417–425, 1996.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1997.

PAZOS-GUERRA, M. et al. Inappropriate therapy of euvoletic hyponatremia, the most frequent type of hyponatremia in SARS-CoV-2 infection, is associated with increased mortality in COVID-19 patients. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, p. 1227059, 2023.

PHILLIPS, P. A. et al. Reduced thirst after water deprivation in healthy elderly men. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 12, p. 753–759, 1984.

REAUX, A. et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain: Physiological role of apelin. **Journal of neurochemistry**, v. 77, n. 4, p. 1085–1096, 2001.

REAUX-LE GOAZIGO, A. et al. Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4392–4400, 2004.

REIS, W. L. et al. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats: Central NO blocks antidiuresis and natriuresis. **Experimental physiology**, v. 92, n. 5, p. 903–911, 2007.

REIS, W. L. et al. Central nitrgenic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. **Behavioral and brain functions: BBF**, v. 6, n. 1, p. 64, 2010.

REIS, W. L. et al. Enhanced expression of heme oxygenase-1 and carbon monoxide excitatory effects in oxytocin and vasopressin neurones during water deprivation: Carbon



monoxide in magnocellular neurosecretory neurones. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 653–663, 2012.

SATO, K. et al. Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone, and growth hormone in the ruminant. **Domestic animal endocrinology**, v. 42, n. 3, p. 165–172, 2012.

SAUVANT, J. et al. Mechanisms involved in dual vasopressin/apelin neuron dysfunction during aging. **PLoS one**, v. 9, n. 2, p. e87421, 2014.

TAHERI, S. et al. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 291, n. 5, p. 1208–1212, 2002.

TATEMOTO, K. et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 251, n. 2, p. 471–476, 1998.

TATEMOTO, K. et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. **Regulatory peptides**, v. 99, n. 2–3, p. 87–92, 2001.

TEZCAN, M. E. et al. Baseline electrolyte abnormalities would be related to poor prognosis in hospitalized coronavirus disease 2019 patients. **New microbes and new infections**, v. 37, p. 100753, 2020.

TOBIN, V. A. et al. The effects of apelin on the electrical activity of hypothalamic magnocellular vasopressin and oxytocin neurons and somatodendritic Peptide release. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 6136–6145, 2008.

UETA, Y. et al. Water deprivation in the rat induces nitric oxide synthase (NOS) gene expression in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. **Neuroscience research**, v. 23, n. 3, p. 317–319, 1995.

VENTURA, R. R. et al. Nitrergic 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.

VENTURA, R. R. et al. Nitric oxide modulates the firing rate of the rat supraoptic magnocellular neurons. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 359–365, 2008.

VERBALIS, J. G.; MANGIONE, M. P.; STRICKER, E. M. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. **Endocrinology**, v. 128, n. 3, p. 1317–1322, 1991.

VERMA, A. et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5093, p. 381–384, 1993.

VILHENA-FRANCO, T. et al. Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. *The journal of endocrinology*, v. 231, n. 2, p. 167–180, 2016.

VINCENT, S. R.; DAS, S.; MAINES, M. D. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 223–231, 1994.

WANG, X. et al. Apelin/APJ system in inflammation. **International immunopharmacology**, v. 109, n. 108822, p. 108822, 2022.

WIEGAND, S. J.; PRICE, J. L. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 192, n. 1, p. 1–19, 1980.

WOOD, J.; GARTHWAITE, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1235–1244, 1994.

WOOLF, S. H.; MASTERS, R. K.; ARON, L. Y. Effect of the covid-19 pandemic in 2020 on life expectancy across populations in the USA and other high income countries: simulations of provisional mortality data. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 373, p. n1343, 2021.

WU, L.; WANG, R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 585–630, 2005.

YU, K.-L. et al. Age-related changes in oxytocin-, arginine vasopressin- and nitric oxide synthase-expressing neurons in the supraoptic nucleus of the rat. **Life sciences**, v. 78, n. 10, p. 1143–1148, 2006.

ZAMBONI, M. et al. Body composition changes in stable-weight elderly subjects: the effect of sex. **Aging clinical and experimental research**, v. 15, n. 4, p. 321–327, 2003.

ZBUZEK, V. et al. Neurohypophyseal aging: Differential changes in oxytocin and vasopressin release, studied in Fischer 344 and Sprague-dawley rats. **Neuroendocrinology**, v. 48, n. 6, p. 619–626, 1988.

ZHOU, Q. et al. Apelin/APJ system: A novel promising target for anti-aging intervention. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 487, p. 233–240, 2018.

ZHOU, Y. et al. Effects of apelin on cardiovascular aging. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 1035, 2017.

ZHUO, M. et al. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5116, p. 1946–1950, 1993.