

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Efeito da sede intracelular nas respostas exploratórias e análogas  
a ansiedade em ratos: possível participação dos receptores  
AVPR1a e OTR.**

**Viviane Felintro de Souza**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EFEITO DA SEDE INTRACELULAR NAS RESPOSTAS**  
**EXPLORATÓRIAS E ANÁLOGAS A ANSIEDADE EM RATOS:**  
**POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES AVPR1A E OTR.**

**VIVIANE FELINTRO DE SOUZA**

*Sob a Orientação do Professor*

**André de Souza Mecawi**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ  
Março de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S719e Souza, Viviane Felintro de, 1989-  
Efeito da sede intracelular nas respostas  
exploratórias e análogas a ansiedade em ratos: possível  
participação dos receptores AVPR1a e OTR / Viviane  
Felintro de Souza. - 2018.  
69 f.

Orientador: André de Souza Mecawi.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Ciências Fisiológicas/PPGCF, 2018.

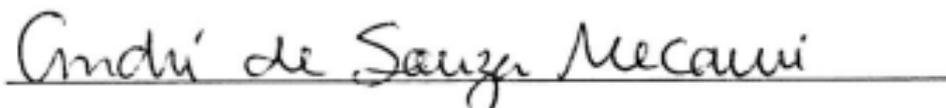
1. Sede. 2. Comportamentos análogos a ansiedade.  
3. Receptor para ocitocina. 4. Amígdala central. I.  
Mecawi, André de Souza, 1985-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Ciências Fisiológicas/PPGCF III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

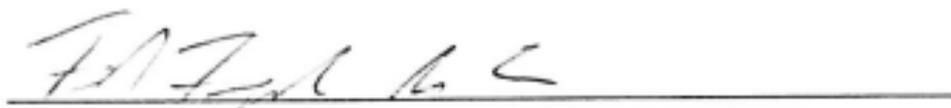
VIVIANE FELINTRO DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/03/2018



Prof Dr André de Souza Mecawi (Membro Interno – Orientador - UFRRJ)



Prof Dr Fabio Fagundes da Rocha (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr Danilo Lustrino Borges (Membro Externo – UFS)

*Dedico a minha família nordestina, aos meus pais e especialmente a minha avó Dona Beatriz, minhas tias avós Dona Maria e Dona Djanira que sempre tiveram o sonho de estudar, mas o árduo trabalho não permitiu, não até hoje. Formei-me por elas, me torno mestre por elas.*

## AGRADECIMENTOS

Gratidão é a palavra que define meu sentimento após esses dois anos de Mestrado.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos animais que foram utilizados nesse estudo, sem eles nada teria saído do papel. Tenho imensa gratidão e respeito por todos.

Agradeço a meus pais, Felinto e Risonete pelo amor incondicional, compreensão e boas conversas, muito mais que pais, grandes amigos. Vocês são meu exemplo de amor, superação e trabalho, como bons nordestinos, arretados que só, mas com o coração que não cabe no peito. Obrigada por me aceitarem do jeito que sou, sei que posso contar com vocês em qualquer momento da minha vida, meus portos seguros. Sou quem sou por vocês, meus pais.

Aos meus irmãos, Marciano, Michele, Filipe e Guilherme. Especialmente ao Lipe, por ter tido a imensa honra (risos) de viver comigo toda sua infância, adolescência e parte da vida adulta. Amo vocês maninhos mesmo com toda a distância.

As minhas “coroas”, vó Beatriz e minhas tias Maria e Djanira. Não tenho nem palavras para descrever o que sinto por vocês. São meus exemplos de mulheres fortes, nordestinas, negras e trabalhadoras, me encho de orgulho de ter o cabelo, a cor, o sangue de vocês. Nesse mundo que ainda enfrenta a desigualdade de gênero vocês são meus maiores exemplos de mulheres, minhas DIVAS. E o que falar do meu vô de coração, meu velho guerreiro mais conhecido como seu barriga ou tio Falcão. Cada tijolinho lá de casa tem um pouco do seu suor e cada vez que chego lá na rua o senhor grita - Magrela, vou arrancar essas tatuagens. E eu respondo - e eu vou arrancar essa barriga. Porque se não for pra gritar no meio da rua, eu nem vou pra São Gonçalo. Amo vocês.

Agradeço também aos meus amigos que me suportaram durante dois anos, o que seria de mim sem vocês? Provavelmente estaria surtada. Não me atrevo a citar um a um, pois não quero arrumar problemas, né? Vai que esqueço o nome de alguém (sou dessas), mas cada um sabe a participação que teve e que tem na minha vida, mesmo os amigos que estão agora a muitos quilômetros de distância.

Aos amigos do Laboratório, obrigada pela ajuda nos experimentos, boas conversas, companhia pra tomar café na Tia Cida praticamente todos os dias e, é claro, por não me deixarem matar ninguém durante esses dois anos, brincadeira sou um amor de pessoa. Quero agradecer ao Raoni (careca), Lívia (de menor), Claudinho (Claudionor), Evandro (Bodybuilding), Quezia (Amorê), Bruno (menino culto - entendedores entenderão), Verônica (Vevê), Sabrina (Jovem) e os mais recentes membros Edgard (Zezinho) e Mayra (Vi-a-da). Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, pelos bons momentos, risadas e reclamações (somos *experts* nisso). Agradeço também aos amigos que não eram do grupo de pesquisa, mas sempre estavam dispostos a ajudar, em especial o César, a Carlinha e a Bruninha Sban.

As nossas técnicas Bruna e Raquel, especialmente a Quel pelo bom papo e diversão.

Aos funcionários da Secretária do Departamento e da Pós-graduação, Vicente, Diones e Franklin.

Ao seu Juca pelo cuidado com os animais do Biotério, pelas acerolas e conversas, aos demais funcionários do biotério que cuidam dia a dia dos animais.

Ao meu orientador, André Mecawi (moço) pela orientação, amizade, paciência e alguns puxões de orelha, sei que tudo que fez foi para meu crescimento profissional e pessoal, afinal sou sua primogênita da Pós-graduação (risos).

A todos os grandes Mestres do DCFis, especialmente ao Mestre Luís Carlos Reis (seu Lula/Mestrão), pelo exemplo de amor à ciência e pelas memoráveis reuniões/almoços e jantares. Inspiro-me no senhor.

Agradeço também as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ que viabilizaram financeiramente este trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço imensamente a minha namorada Thaís Charles, pelo amor, paciência e companheirismo. Não sei o que seria da minha trajetória até aqui se não fosse você, meu ponto de equilíbrio. Te amo.

**Esse título não é só meu, é de todos. Minha eterna gratidão!**

## RESUMO

SOUZA, Viviane Felintro. **Efeito da sede intracelular nas respostas exploratórias e análogas a ansiedade em ratos: possível participação dos receptores AVPR1a e OTR.** 2018. 69p. Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A sede é uma sensação que induz a ingestão de água. Esse comportamento é essencial para a manutenção da vida, e os vertebrados recorrem a um conjunto de mecanismos neuro-humorais que regulam constantemente os teores de água e sódio corporais. Diferentes estímulos osmóticos, como privação de água e sobrecarga salina, desencadeiam a liberação de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) e, conseqüentemente, suas ações sistêmicas. Recentes estudos demonstraram que os neurônios paraventriculares vasopressinérgicos magnocelulares se projetam para regiões extraipotalâmicas, que incluem a habênula lateral e a amígdala central. Sendo assim, é possível que essas estruturas e neuropeptídeos também estejam envolvidos com as mudanças nos comportamentos análogos à ansiedade em condições de hiperosmolalidade. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da hiperosmolalidade induzida pela desidratação em comportamentos semelhantes à ansiedade e na expressão gênica de receptores para AVP e OT, bem como, enzima glutamato descarboxilase (GAD) e o transportador de glutamato vesicular (vGLUT) na amígdala e habênula. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar (~ 300g) separados em cinco grupos: controle (CT), privação hídrica por 24 horas (PH24) e 48 horas (PH48) e sobrecarga salina com NaCl 1,8% por 24 horas (SS24) e 48 horas (SS48). Os grupos foram submetidos ao teste de campo aberto (CA) seguido pelo labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto outro grupo de ratos foi submetido a caixa claro e escuro (CCE). Todos os testes foram realizados no período noturno. Para verificar a influência da desidratação na expressão gênica nós usamos RT-qPCR. Todos os dados são descritos como média  $\pm$  erro padrão da média e a significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ . A osmolalidade plasmática aumentou significativamente nos grupos PH48 ( $p = 0,0039$ ) e SS48 ( $p = 0,0176$ ) enquanto o hematócrito aumentou apenas no grupo WD48 ( $p = 0,0003$ ). No LCE houve aumento da porcentagem do tempo despendido nos braços abertos em PH48 ( $p = 0,00124$ ) e SS48 ( $p < 0,0001$ ), assim como, maior porcentagem de entradas nos braços abertos, PH48 ( $p = 0,0143$ ) e SS48 ( $p < 0,0001$ ), indicando uma resposta ansiolítica. Adicionalmente, a regressão linear demonstrou uma correlação diretamente proporcional entre a osmolalidade plasmática e o tempo de permanência nos braços abertos ( $p = 0,0142$ ;  $r = 0,3631$ ). No CA, nenhuma diferença foi observada, indicando que os animais não aumentaram a atividade locomotora espontânea. Já na CCE, apenas o grupo PH48 ( $p = 0,0424$ ) apresentou aumento no tempo de permanência na área clara. Em relação à expressão gênica, observamos aumento significativo na expressão do receptor para OT ( $p = 0,0103$ ) na amígdala central e para vGLUT2 ( $p = 0,0430$ ) na habênula, ambos no grupo PH48. Nossos dados demonstram que a hiperosmolalidade plasmática induzida por 48 horas de privação hídrica e sobrecarga salina desencadeia um comportamento ansiolítico em ratos, independentemente da atividade locomotora. Este comportamento ansiolítico é provavelmente essencial para a busca de água em animais desidratados e pode envolver a participação da sinalização da OT na amígdala central.

**Palavras chaves:** Sede, comportamentos análogos à ansiedade, receptor para ocitocina, amígdala central.

## ABSTRACT

SOUZA, Viviane Felintro. **Effect of intracellular thirst on exploratory and anxiety-like responses in rats: possible participation of AVPR1a and OTR receptors**. 2018. 69p. Dissertation (master's degree in Physiological Sciences). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Thirst is a sensation that induces water intake. This behavior is essential for the maintenance of life, and the vertebrates resort to a set of neurohumoral mechanisms that constantly regulate the body water and sodium content. Different osmotic stimuli, such as water deprivation and salt loading, trigger the release of vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) and, consequently, their systemic actions. Recent studies have demonstrated that magnocellular vasopressinergic paraventricular neurons project to extrahypothalamic regions, which include the lateral habenula and central amygdala. Thus, it is possible that these structures and neuropeptides are involved with the changes in anxiety-like/motivated behaviors under conditions of hyperosmolality. The objective of this study was to analyze the effect of the hyperosmolality induced by dehydration on anxiety-like behaviors and gene expression of the AVP and OT receptors as well as, the enzyme glutamate decarboxylase (GAD) and the vesicular glutamate transporter (vGLUT) in amygdala and habenula. For this purpose, we used Wistar rats (~300g) separated into five different groups: control (CT), water deprivation for 24 hours (WD24) and 48 hours (WD48) and salt loading with NaCl 1.8% for 24 hours (SL24) and 48 hours (SL48). These groups were submitted to the open field test (OF) followed by the elevated plus maze (EPM) while another set of rats underwent the light/dark box test (LDB). All tests were carried out in the night period. To verify the influence of dehydration in gene expression we used RT-qPCR. All data are described as mean  $\pm$  standard error of the mean and statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Plasma osmolality increased significantly in the PH48 ( $p = 0.0039$ ) and SS48 ( $p = 0.0176$ ) groups while hematocrit increased only in the WD48 group ( $p = 0.0003$ ). In the EPM there was an increase in the percentage of time spent in the open arms in WD48 ( $p = 0.00124$ ) and SL48 ( $p < 0.0001$ ), as well as, increased percentage of entries in the open arms, WD48 ( $p = 0.0143$ ) e SL48 ( $p < 0.0001$ ), indicating an anxiolytic response. In addition, the linear regression analysis showed a positive correlation between the increase in osmolality and the time spent in the open arms ( $p = 0.0142$ ;  $r = 0.3631$ ). In the OF test, no differences were observed, indicating that animals had no increase in spontaneous locomotor activity. Already in the LDB, only WD48 group increased the time in light area ( $p = 0.0424$ ). In relation to, gene expression we observed a significant increase in mRNA for OTR ( $p = 0.0103$ ) in WD48 in the central amygdala, as well as also increased vGLUT expression in habenula ( $p = 0.0430$ ). Our data demonstrate that the plasma hyperosmolality induced by 48 hours of water deprivation and salt loading induces an anxiolytic-like behavior in rats independently of locomotor activity. This anxiolytic behavior was probably essential for the search for water in dehydrated animals and may involve the participation of OT signaling in the central amygdala.

**Key words:** Thirst, anxiety-like behaviors, oxytocin receptor, central amygdala.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental.....	11
Figura 2. Representação ilustrativa do aparato utilizado no teste do campo aberto.....	13
Figura 3. Representação ilustrativa do aparato utilizado no teste de labirinto em cruz elevado.14	
Figura 4. Representação ilustrativa do aparato utilizado no teste da caixa claro e escuro. ....	15
Figura 5. Hematócrito dos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina.. .....	20
Figura 6. Osmolalidade plasmática dos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas.....	21
Figura 7. Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste do campo aberto em animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas. ....	23
Figura 8. Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste do labirinto em cruz elevado nos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas. ....	25
Figura 9. Regressãolinear entre a osmolalidade plasmática e o tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.. .....	26
Figura 10. Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste da caixa claro e escuro em animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas. ....	28
Figura 11. Efeitos da privação hídrica e da sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA na amígdala central.. .....	30
Figura 12. Efeito da privação hídrica e sobrecarga salina na expressão relative de mRNA na amígdala basolateral.....	32
Figura 13. Efeito da privação hídrica e da sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA na habênula.....	34
Figura 14. Esquema hipotético das interações entre o aumento da osmolalidade plasmática e a alteração comportamental no labirinto em cruz elevado.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência e eficiência dos <i>primers</i> utilizados.....	17
Tabela 2. Sondas utilizadas para o <i>taqman</i> . .....	17
Tabela 3. Médias dos Cts dos genes controles endógenos para cada núcleo .....	18

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABL	Amígdala basolateral
ACe	Amígdala central
ACeL	Amígdala central porção lateral
ACeM	Amígdala central porção medial
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análise da variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP	Área postrema
AQP	Aquaporina
ATV	Área tegmental ventral
AVP	Arginina vasopressina
AVPR1a	Receptor para vasopressina do tipo 1a
AVPR1b	Receptor para vasopressina do tipo 1b
AVPR2	Receptor para vasopressina do tipo 2
CA	Campo aberto
CCE	Caixa claro e escuro
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar ao mRNA
DCFis	Departamento de Ciências Fisiológicas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPM	Erro padrão da média
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
EUA	Estados Unidos da América
GAD	Enzima glutamato descarboxilase
GAD67	Enzima que sintetiza GABA, isoforma 67
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
HbL	Habênula lateral
HbM	Habênula medial
HD	<i>Head dipping</i>
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

LCE	Labirinto em cruz elevado
LEC	Líquido extracelular
LIC	Líquido intracelular
OCVs	Órgãos circunventriculares
OT	Ocitocina
OTR	Receptor de para ocitocina
OVL	Órgão vasculoso da lâmina terminal
PVN	Núcleo paraventricular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Enzima que cliva o ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SAP	<i>Stretched attend posture</i>
SNC	Sistema nervoso central
SFO	Órgão subfornicial
SON	Núcleo supraóptico
TA	Temperatura ambiente
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
vGLUT	Transportador vesicular de glutamato
vGLUT2	Transportador vesicular de glutamato, isoforma 2

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
<b>3 OBJETIVO</b> .....	9
3.1 Objetivo geral.....	9
3.2 Objetivo específico .....	9
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
4.1 Animais e apreciação bioética .....	10
4.2 Grupos experimentais .....	10
4.3 Delineamento experimental .....	11
4.4 Análises comportamentais .....	12
4.4.1 Campo aberto .....	12
4.4.2 Labirinto em cruz elevado .....	13
4.4.3 Caixa claro e escuro .....	14
4.4 Coleta de plasma e encéfalos .....	15
4.5 Análises plasmáticas .....	15
4.6 Análise da expressão relativa de mRNA de GAD67 e vGLUT2 e dos receptores AVPR1a e OTR na amígdala central, amígdala basolateral e habênula.....	16
4.7 Análise estatística .....	19
<b>5 RESULTADOS</b> .....	20
5.1 Análises plasmáticas.....	20
5.2 Análises comportamentais .....	22
5.2.1 Efeito da privação hídrica e sobrecarga salina por 24 e 48 horas na locomoção espontânea .....	22
5.2.2 Efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina nos parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado.....	24
5.2.3 Efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina sobre os parâmetros analisados na caixa claro escuro .....	27
5.3 Análise dos efeitos da desidratação na expressão relativa de mRNA .....	29
5.3.1 Análise dos efeitos da privação hídrica e da sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA para GAD67, vGLUT2, OTR e AVPR1a na amígdala central.....	29
5.3.2 Análise dos efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas na expressão relativa de mRNA para vGLUT2, GAD67, GAD67 e vGLUT2 na amígdala basolateral .....	31
5.3.3 Análise dos efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas na expressão relativa de mRNA para vGLUT2, GAD67, GAD67 e vGLUT2 na habênula .....	33
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	42

<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>9 ANEXO</b> .....	54

# 1 INTRODUÇÃO

As quantidades de água e sódio no corpo devem ser mantidas em uma faixa muito estreita de valores, tendo em vista que a água perfaz mais da metade da massa dos seres vivos. A água e o sódio atuam na manutenção de funções biológicas vitais, desta forma, os vertebrados possuem mecanismos adaptativos que controlam com maestria suas quantidades e proporções no corpo. O controle da homeostase hidrossalina envolve diversos sistemas fisiológicos, dentre eles o sistema hipotálamo-neuroipofisário, responsável pela secreção de ocitocina (OT) e vasopressina (AVP). Este sistema recebe constantemente informações acerca do estado osmótico do organismo, o que permite com que mecanismos compensatórios sejam ativados a fim de corrigir possíveis alterações no metabolismo dos fluidos corporais. Essas informações partem, dentre outras fontes, de células especializadas localizadas nos órgãos circumventriculares (OCVs) sensoriais, que percebem pequenas alterações plasmáticas e enviam essas informações para neurônios magnocelulares encontrados no núcleo paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo, além de outras regiões relacionadas ao controle autonômico, comportamental e hidroeletrolítico. A hiperosmolalidade e a hipovolemia são capazes de deflagrar a liberação de AVP e OT do PVN e do SON, além disso, em condições de hipervolemia a OT também é secretada. A AVP e a OT atuam periféricamente na regulação do balanço hidrossalino e cardiovascular. Além disso, centralmente AVP e OT podem modular os comportamentos análogos à ansiedade, possuindo papéis antagônicos, no qual AVP possui ação ansiogênica e OT ansiolítica. Isso demonstra que os sistemas vasopressinérgicos e ocitocinérgicos além de atuarem na manutenção da homeostase da água e do sódio também contribuem para a regulação do comportamento.

Recentes estudos demonstraram que neurônios magnocelulares vasopressinérgicos do PVN se projetam para regiões encefálicas que incluem: a área pré-óptica medial e lateral, núcleo supraquiasmático, habênula lateral, amígdala medial e central. Concomitantemente, os neurônios magnocelulares ocitocinérgicos também se projetam para outras regiões, que incluem o núcleo *accumbens* e a amígdala central. Em contraste, neurônios parvocelulares se projetam para diferentes núcleos do tronco encefálico e regiões da medula que controlam o tônus autonômico, entre outras funções. Esse substrato neuroanatômico, pode fomentar a base para o entendimento das ações da AVP e OT na gênese de diferentes comportamentos. Tanto as áreas encefálicas responsáveis pelo balanço hidrossalino quanto às relacionadas ao componente motivacional e autonômico apresentam conexões entre si, formando uma complexa rede neural que integra informações entre ambos os sistemas neuroendócrino e comportamental.

Desta maneira, dada esta integração entre ambos os sistemas, neste trabalho analisamos os efeitos da desidratação induzida pela sobrecarga salina e privação hídrica sobre as possíveis alterações comportamentais e na expressão gênica. Buscando uma melhor compreensão da relação entre alterações hidroeletrolíticas e comportamentais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A água compõe grande parte da massa de todos os seres vivos e, está distribuída por todo o organismo, sendo responsável por 55% a 75% da massa corporal dos vertebrados adultos, variando de acordo com a idade, sexo, habitat, quantidade de gordura corporal, entre outros fatores. Além disso, o teor de água de um organismo está dividido em dois grandes compartimentos, didaticamente separados em: compartimento intracelular e compartimento extracelular. O líquido intracelular (LIC) difere do extracelular, devido a sua composição e ao seu maior volume. O LIC contém grandes quantidades de íon potássio, magnésio e fosfato, enquanto o líquido extracelular (LEC) contém grandes quantidades de íon sódio e cloreto, além de nutrientes necessários para manter a viabilidade celular (Verbalis, 2003).

Os seres vivos estão sob constante influência do meio ambiente. Nesse sentido, os mecanismos osmorregulatórios e pressóricos se especializaram, de modo que, fosse possível a transição do meio aquático para o terrestre e, conseqüentemente, a expansão dos *habitats* (Takei *et al.*, 2007; Takei, 2015). Esse processo adaptativo foi importante para combater os problemas de dessecação que acometeram, majoritariamente, os animais que passaram do ambiente aquático para o ambiente terrestre, a fim de manter a capacidade do organismo de sustentar uma pressão osmótica dentro de um exíguo intervalo de variação, sendo este fator crucial para a conservação da vida na terra (Takei *et al.*, 2007).

Os vertebrados mantêm um sistema coordenado para a obtenção e conservação de sódio e água, a julgar por suas perdas diárias através da sudorese, respiração e, sobretudo, pela excreção urinária (Takei, 2000; Verbalis, 2003). A constância da composição do meio interno e do volume do fluido extracelular é mantida basicamente pelo controle da ingestão e excreção renal de água e eletrólitos (especialmente sódio) (Mecawi *et al.*, 2015). Para evitar a desidratação e suas conseqüências fisiológicas e comportamentais, os mamíferos mantêm a osmolalidade plasmática numa faixa muito estreita de regulação, em torno de 290 mOsm/kgH<sub>2</sub>O, de maneira que, desvios acentuados desse valor afetam a pressão osmótica a qual as células estão submetidas e podem gerar condições deletérias para a perfusão tecidual e metabolismo celular podendo levar até mesmo a morte (Bourque, 2008). Aumento da osmolalidade plasmática acima dessa faixa é provavelmente o sinal homeostático mais importante para influenciar a sensação de sede. Essa sensação, por sua vez, é suficiente para orientar as ações dos vertebrados em direção ao objetivo de encontrar e consumir água (Leib *et al.*, 2016). No entanto, existem evidências de que a sede ocorre de maneira antecipatória, precedendo algum desafio fisiológico, esta resposta pode ser promovida pelo aumento da temperatura corporal, ingestão alimentar e também por sinais do relógio circadiano. Tais sinais de antecipação também são importantes mediadores da saciedade, inibindo a sede bem antes que o estado fisiológico seja restaurado pela ingestão de água (Gizowski e Bourque, 2018). O controle do estado estacionário dos fluidos corporais é conseguido através da regulação de muitas respostas fisiológicas e comportamentais, que são orquestrados com maestria para manter a osmolalidade e o volume dos fluidos intra- e extracelulares próximos do seu *set point* ideal (Gizowski e Bourque, 2018).

Uma rede neural complexa é responsável por mediar às respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas em condições de desidratação. Nesta rede, diferentes núcleos encefálicos são recrutados para que, em conjunto, orquestram respostas adequadas para restabelecer a condição de hidratação apropriada (Smith *et al.*, 2015). Existem vários tipos de desidratação, com causas e tratamentos distintos, porém, de maneira geral, a desidratação é

caracterizada pela diminuição da porcentagem de água no organismo, ocorrendo quando ela decai em comparação a valores normais, ou seja, quando a perda de água é maior que a sua restituição. Essa condição geralmente vem acompanhada da perda de eletrólitos, notadamente sódio e potássio. Além disso, didaticamente a desidratação pode ser dividida em intra- e extracelular (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

A sede intracelular é decorrente da depleção de água no LIC (Mckinley e Johnson, 2004). Um aumento na osmolalidade do LEC (isto é, um aumento na concentração de sódio que pode ser desencadeada, por exemplo, pelo aumento da ingestão de alimentos/líquidos com alto teor de sódio) cria um gradiente osmótico que retira água do LIC para restabelecer a osmolalidade (Thornton, 2010). Osmorreceptores, tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto da periferia, detectam o aumento da osmolalidade. Essa hiperosmolalidade plasmática estimula os osmorreceptores centrais (através da deformação do tamanho do neurônio) que induzem o consumo de água e aumentam a liberação de AVP na circulação sistêmica. Quando a osmolalidade do sangue retorna ao seu valor basal, a ativação dos osmorreceptores diminui e isso diminui a liberação de AVP e a ingestão de líquidos (Mckinley e Johnson, 2004).

A sede extracelular se manifesta por uma diminuição no volume sanguíneo (hipovolemia), que é tipicamente acompanhada por uma diminuição na pressão arterial (hipotensão) (Leib *et al.*, 2016). O volume do líquido extracelular pode ser reduzido de forma seletiva, sem produzir uma redução do compartimento do LIC (Mckinley e Johnson, 2004). A sede extracelular pode ser desencadeada por hemorragia, perda de sódio ou sequestro localizado do líquido extracelular (edema), diminuição do volume do sangue e do líquido intersticial (Mckinley e Johnson, 2004). A resposta imediata à hipovolemia é a ativação de componentes dos sistemas nervoso autônomo e endócrino, de maneira que atenua as consequências da redução do débito cardíaco e queda da pressão arterial gerados pela hipovolemia (Mckinley e Johnson, 2004). Existem detectores de estiramento especializados, ou mecanorreceptores, nas artérias e grandes veias cuja atividade rastreia essa diminuição no volume sanguíneo. Este tráfego neural atinge um grupo de neurônios que é distinto das áreas que respondem à hipertensão. Esta área funciona através de circuitos hipotalâmicos envolvendo os núcleos PVN e SON para aumentar a liberação de AVP da neuroipófise, a qual vai atuar favorecendo a reabsorção renal de água. O aparelho justaglomerular, um receptor de volume semelhante encontrado no rim, reage à diminuição da perfusão, liberando a enzima renina no sangue, que ativa o sistema renina-angiotensina, a renina vai catalisar o angiotensinogênio à angiotensina I, e em última análise, esta será convertida à angiotensina II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), principalmente nos pulmões e rins, a ativação desse sistema é uma das respostas mais importantes a hipovolemia e hipotensão (Leib *et al.*, 2016). A ANG II tem múltiplos efeitos fisiológicos, incluindo atuação no cérebro, para promover a dipsogênese e apetite ao sódio, e ações no sistema cardiovascular. A ANG II atua no sentido de aumentar a resistência vascular periférica e a volemia para restabelecer a queda da pressão arterial (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

A privação hídrica gera perda de água dos compartimentos intra- e extracelulares, caracterizando a desidratação absoluta (De Luca *et al.*, 2010). Nessa condição, a privação de líquidos resulta em diminuição progressiva do volume no LEC e conseqüente aumento da osmolalidade plasmática. Com o LEC hipertônico (por haver mais moléculas de soluto do que solvente em comparação aos valores basais), as células perdem água por osmose do LIC para o LEC, equilibrando a tonicidade entre estes compartimentos. Com o passar do tempo, esta perda hídrica de ambos os compartimentos causará a desidratação intra- e extracelular (De Luca *et al.*, 2010). Em contrapartida, a administração de solução salina hipertônica leva ao aumento na tonicidade plasmática, criando um gradiente osmótico que move a água do LIC

para o LEC aumentando a pressão e o volume sanguíneo (Smith *et al.*, 2015). É importante destacar que condições em que o animal é submetido à sobrecarga salina como único fluido disponível, não ocorre à diminuição do volume plasmático, pois o mesmo apesar de excretar grandes quantidades de urina diluída para reduzir a concentração e conteúdo de sódio no organismo, também ingere altas quantidade dessa solução hipertônica em relação a um animal controle (Greenwood *et al.*, 2015). Salienta-se a diferença ocasionada pela desidratação intracelular e a absoluta: a desidratação intracelular produz preferencialmente a sede, e vai ativar mecanismos para estimular a ingestão de água e inibir a ingestão de sódio; por outro lado, na desidratação absoluta ou na extracelular, os mecanismos envolvidos são capazes de estimular não somente a sede, mas também o apetite ao sódio (Smith *et al.*, 2015). Ou seja, uma gama de respostas compensatórias é empregada quando ocorre depleção do compartimento intra- ou extracelular, a fim de minimizar as alterações no volume, osmolalidade e composição dos fluidos corporais.

Alterações na osmolalidade plasmática são reconhecidas por osmorreceptores periféricos e centrais. Os osmorreceptores periféricos estão localizados principalmente na região da veia porta hepática e transmitem sua informação através de aferências vagais para o sistema nervoso central (Adachi *et al.*, 1976; Chwalbińska-Moneta, 1979; Bourque *et al.*, 1994), também são encontrados estrategicamente em outros locais, como cavidade orofaríngea, trato gastrointestinal, e fígado (Bourque, 2008). Além das aferências vagais, as alterações na osmolalidade plasmática ativam osmorreceptores presentes em CVOs sensoriais, especificamente órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), área postrema (AP) e órgão subfornicial (SFO), que transmitem essa informação para outras regiões do encéfalo (Johnson e Gross, 1993; Bourque *et al.*, 1994) que incluem células produtoras de AVP e OT no PVN e SON (Johnson e Gross, 1993). Sendo assim, os CVOs desempenham importante papel na homeostase dos fluidos corporais (Miyata, 2015).

O sistema hipotálamo-neuroipofisário é fundamental para o controle do metabolismo hidrossalino, participando da regulação do volume e da osmolalidade plasmática. Esse sistema é composto por neurônios magnocelulares que possuem seus pericárdios localizados nos núcleos PVN e SON do hipotálamo e seus axônios seguem até a neuroipófise. No SON, alterações osmóticas evocadas por hiperosmolalidade e informações neuroendócrinas relativas a hipovolemia desencadeiam uma resposta hormonal apropriada, aumentando a liberação de AVP e OT (Ludwig *et al.*, 1994; Greenwood *et al.*, 2015). O SON contém neurônios magnocelulares que produzem OT e AVP, além de células gliais e outros neurônios que produzem neurotransmissores, como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA), por exemplo (Brown, 2016). Embora os neurônios ocitocinérgicos se agrupam mais anterodorsalmente e os neurônios vasopressinérgicos mais posteroventralmente, há uma sobreposição considerável dos dois tipos dentro do SON (Swaab *et al.*, 1975).

O PVN é um importante núcleo integrador da função autonômica e neuroendócrina (Swanson e Sawchenko, 1980) e se comunica ainda com diversos outros núcleos. Dentre eles podem ser destacados o núcleo dorsal da rafe, *locus coeruleus*, núcleo parabraquial lateral, núcleo ambíguo, núcleo do trato solitário, núcleo ventrolateral rostral do bulbo, AP, SFO, SON, pré-óptico mediano, amígdala e dorsal motor do vago (Geerling *et al.*, 2010). Adicionalmente, o PVN possui duas subpopulações de neurônios, os parvocelulares e os magnocelulares (Swanson e Sawchenko, 1980). Neurônios magnocelulares apresentam corpos celulares bem maiores quando comparados aos parvocelulares e se projetam para a neurohipófise sendo responsáveis pela liberação de OT e AVP para corrente sanguínea (Swanson e Sawchenko, 1980; Brown, 2016). A secreção de AVP e OT pelos neurônios magnocelulares é desencadeada por excitação dependente do aumento das concentrações de cálcio, que por sua vez é impulsionado pela chegada de potenciais de ação nesses neurônios

que abre canais de cálcio voltagem dependentes (Brethes *et al.*, 1987). Os neurônios parvocelulares do PVN também sintetizam AVP, OT, hormônio liberador de tireotrofina (TRH), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e somatostatina, esses neurônios projetam seus axônios para a eminência mediana, controlando a adenoipófise dependendo do neuropeptídeo a ser liberado. Além disso, existem os neurônios parvocelulares pré-autonômicos que se projetam para centros de controle autonômico, como núcleo do trato solitário, medula ventrolateral rostral, coluna intermédio lateral (Swanson e Sawchenko, 1980; Sawchenko e Swanson, 1982; Ferguson *et al.*, 2008; Alvarez-Bolado, 2018).

Classicamente, OT atua controlando ações de suma importância no contexto reprodutivo, que vão garantir as contrações uterinas e a ejeção do leite nos mamíferos em resposta a estímulos mecânicos exercidos sobre o colo do útero e a mama, respectivamente (Kimura e Saji, 1995; Gimpl e Fahrenholz, 2001). Nos ratos machos a OT é um potente estimulador de ereções espontâneas e está envolvido na ejaculação (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Além desse efeito no sistema reprodutor, a OT é um importante regulador da ingestão calórica e do metabolismo, atuando de modo a reduzir a ingestão calórica, induzindo a lipólise e a oxidação da gordura (Lawson, 2017). Ainda, a OT plasmática também exerce um importante papel sobre o metabolismo corporal de água e sódio, onde possui um efeito natriurético renal (Haanwinckel *et al.*, 1995). O efeito natriurético da OT se dá por ativação da enzima óxido nítrico sintase, que libera óxido nítrico, seguida da produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), onde o GMPc vai causar uma diminuição da reabsorção tubular de sódio, que por sua vez, inibe o transporte acoplado de sódio da luz tubular ao longo do seu segmento proximal (Soares *et al.*, 1999). A OT também estimula a produção de ANP que aumenta o GMPc (Soares *et al.*, 1999). As ações de OT são mediadas por seu receptor específico OTR, que está amplamente distribuído pelo organismo, incluindo o rim, coração, timo, pâncreas, adipócitos e cérebro.

Os OTR são acoplados funcionalmente a proteína  $G_{q/11\alpha}$  que estimula o complexo  $G_{\beta\gamma}$  a ativar a fosfolipase C. Isto leva à geração de trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). Por sua vez, o aumento na concentração de IP3 causa a liberação de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático, enquanto o DAG estimula a proteína quinase C, que está envolvida na cascata de fosforilação e transdução de sinais. Por fim, em resposta a um aumento da  $[Ca^{2+}]$  intracelular, uma variedade de eventos celulares é iniciada. Nas células neurosecretoras, o aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  controla a excitabilidade celular, isto é, modula os padrões de disparo dos neurônios neurosecretorese leva à liberação do transmissor (Gimpl e Fahrenholz, 2001). Por outro lado, em alguns tecidos a OT pode interagir com os receptores associados à proteína  $G_i$  promovendo a redução dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Reversi *et al.*, 2005). Recentes estudos sugerem que, OT e AVP podem interagir sobre os receptores uns dos outros de maneira potencialmente importante, a julgar por sua similaridade estrutural (Song e Albers, 2017). Ambos possuem sequência de nove aminoácidos, diferindo um do outro em apenas duas posições (Donaldson e Young, 2008). Os genes que codificam tanto AVP quanto OT possuem alta homologia (Young e Gainer, 2003), além disso, é provável que AVP e OT tenham co-evoluído, sendo altamente relacionados filogeneticamente (Donaldson e Young, 2008).

A ação mais pronunciada da AVP é seu efeito antidiurético por aumentar a reabsorção renal de água. As ações periféricas e centrais da AVP são mediadas por seus receptores do tipo V2 (AVPR2), V1a (AVPR1a) e V1b (AVPR1b – também conhecido como AVPR3) (Zingg, 1996), onde os receptores AVPR1a e AVPR1b estão acoplados a proteína  $G_q$ , que ativam a fosfolipase C e aumentam o cálcio livre do citosol, ao passo que o receptor AVPR2 se acopla a proteína  $G_s$  e ativa a via da adenilatociclase (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). A

ação antidiurética da AVP se dá graças à interação da AVP com o receptor AVPR2, que estão localizados na membrana basolateral das células epiteliais do ducto coletor renal, essa interação resulta em aumento da síntese de AMPc e fosforilação da região C-terminal dos canais de água, conhecidos como aquaporinas (AQP), especificamente as AQP do tipo 2 nas células tubulares do néfron distal (Sasaki *et al.*, 1998). O aumento dos níveis de AMPc estimula a síntese de mRNA de AQP do tipo 2, modulando tanto o número quanto o perfil de distribuição dos canais de AQP no ducto coletor. Esse maior aporte de AQP do tipo 2 na membrana apical da célula do ducto coletor, desencadeia um aumento na permeabilidade da água (Sasaki *et al.*, 1995). Embora já tenha sido relatada a presença de receptores AVPR2 no cérebro, ainda não se tem evidências que assegurem sua participação mediando os efeitos centrais da AVP de maneira significativa (Kato *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 2009).

Periféricamente, além da sua ação antidiurética a AVP possui ação vasoconstritora em situações de hipotensão arterial exercendo seu papel na musculatura lisa dos vasos, que resulta em contração da parede arteriolar e aumento da resistência periférica total (Fujiwara *et al.*, 2012). Esse efeito se dá pela sua interação com AVPR1a, que está localizado principalmente na musculatura lisa vascular, fígado, plaquetas e encéfalo (Zingg, 1996; Koshimizu *et al.*, 2012). Embora, o AVPR1a periféricamente atue sobretudo de maneira vasoconstritora, no SNC ela pode mediar diferentes respostas, como a comportamental (Zingg, 1996; Koshimizu *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2016). No SNC, AVPR1a está amplamente distribuída em diferentes regiões como a área septal, amígdala, BNST, núcleo *accumbens*, núcleo supraquiasmático, NTS, AP, PVN, SON entre outros (Dumais e Veenema, 2016). Ao passo que, a AVPR1b parece ter uma distribuição mais restrita em comparação a AVPR1a, estando distribuído na neurohipófise, no bulbo olfatório, hipocampo, giro dentado, córtex piriforme, córtex entorenal, girodentado, amígdala, PVN e SON (Zingg, 1996; Hernando *et al.*, 2001; Corbani *et al.*, 2018). Um dos principais papéis da interação AVP com o receptor AVPR1b é estimular a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir da adenoipófise. Nesse sentido, a AVP juntamente com o hormônio liberador da corticotrofina (CRH), participa do estímulo de liberação de ACTH e, conseqüentemente, do cortisol/corticosterona em situações de stress (Saito *et al.*, 1995; Zingg, 1996). Sendo assim, tanto AVPR1a quanto AVPR1b podem mediar as respostas relacionadas ao comportamento análogo à ansiedade.

Além dos seus efeitos clássicos, diversos estudos sugerem a participação de OT e AVP nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade (Landgraf *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2016; László *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Sendo OT potencialmente ansiolítica, ao passo que, AVP é potencialmente ansiogênica (Mak *et al.*, 2012). Neumann e Landgraf (2012) sugerem que o desequilíbrio entre AVP e OT pode contribuir para déficits sociais que acompanham as psicopatias. De fato, a administração periférica de OT desencadeia uma resposta ansiolítica no labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto AVP desencadeia uma respostas ansiogênica neste modelo (Mak *et al.*, 2012). Adicionalmente, a ANG II, outro hormônio produzido após privação hídrica também participa de respostas relacionadas à ansiedade, possuindo um papel ansiogênico (Saavedra, 2017). Além disso, recentes estudos vêm demonstrando a importância do equilíbrio do sódio e da água no contexto comportamental (Krause *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Isso indica que, desafios para a homeostase dos fluidos corporais podem ter um importante impacto na modulação dos níveis de ansiedade em resposta ao estresse osmótico.

A ansiedade é uma sensação relacionada ao comportamento de avaliação de risco, que normalmente ocorre em situações de ameaça potencial, como em um novo contexto

ambiental, alertando o indivíduo de possíveis perigos, através do desencadeamento de uma série de alterações neuroquímicas, neuroendócrinas e comportamentais, que podem garantir a sua sobrevivência, pois permitem evitar situações potencialmente prejudiciais (Gross e Hen, 2004). Nesse sentido, os transtornos de ansiedade podem ser considerados como desordens defensivas onde a avaliação de perigo potencial é feita de maneira equivocada, deflagrando assim comportamentos defensivos exagerados (Rodgers e Dalvi, 1997). Diversos estudos demonstraram que a amígdala (Davis e Whalen, 2001; Tovote *et al.*, 2015; Fadok *et al.*, 2018) e a habênula (Jacinto *et al.*, 2017) desempenham um papel importante na ansiedade.

A amígdala é uma importante região do sistema límbico envolvida em uma ampla gama de funções comportamentais normais e em condições psiquiátricas (Davis e Whalen, 2001). Anatomicamente, de acordo com a classificação de Sah *et al.*, (2003), os núcleos da amígdala são divididos em três grupos principais: 1) Basolateral, que inclui o núcleo lateral, núcleo basal e núcleo basal acessório; 2) o grupo superficial ou cortical, que inclui os núcleos corticais e núcleo do trato olfatório lateral; 3) o grupo centromedial, composto pelos núcleos mediano e central. E existe ainda um conjunto separado de núcleos que não se enquadram facilmente em nenhum dos três grupos supracitados e foram classificados separadamente. Em relação à ansiedade, em humanos parece envolver, sobretudo, as subregiões centrais (ACe) e basolaterais (ABL) (Davis e Whalen, 2001).

A ABL recebe informações sensoriais e se projeta para ACe que, por sua vez, envia projeções para diferentes áreas do hipotálamo e para o tronco encefálico, que medeiam diretamente sinais endócrinos e autonômicos da ansiedade, ou seja, a ACe parece estar envolvida sobretudo com as respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas decorrentes da ansiedade (Davis e Whalen, 2001). A ACe difere da ABL em alguns aspectos, um deles é quanto a valência de seus estímulos, a ABL consiste principalmente em neurônios glutamatérgicos e interneurônios inibitórios que expressam GABA. Em contrapartida, os neurônios da ACe são principalmente GABAérgicos, esses neurônios inibitórios da região lateral da amígdala central (ACeL) projetam-se para a região medial (ACeM) inibindo-a (Janak e Tye, 2015). Interessantemente, essa inibição por GABA da atividade glutamatérgica nesta região promove uma redução dos comportamentos análogos à ansiedade (Linden *et al.*, 2004). Ademais, uma bainha interconectada de neurônios GABAérgicos, denominada células intercaladas, também é encontrada interposta entre a ABL e a ACe, fornecendo uma importante fonte de inibição entre os dois núcleos (Janak e Tye, 2015).

Assim como a amígdala, a habênula também participa de diferentes respostas ao estresse (Proulx *et al.*, 2014). Em mamíferos, a habênula é uma estrutura bilateral simétrica e compreende dois núcleos bem definidos, habênula medial (HbM) e a habênula lateral (HbL), e cada um desses núcleos possui outras subregiões com conectividade neural distinta. Essa região recebe aferências dos núcleos da base e participam de muitas funções, incluindo a seleção de ações com a área tegmental ventral (ATV) entre várias outras regiões (Herkenham e Nauta, 1979; Proulx *et al.*, 2014). A habênula é uma estrutura filogeneticamente preservada durante toda a evolução dos vertebrados, sendo encontrada em diversos animais, como lampreias, peixes, répteis e mamíferos, sugerindo que participa da regulação de processos importantes para sobrevivência (Stephenson-Jones *et al.*, 2012). A participação da habênula nas respostas ao estresse foi inicialmente atribuída à observação de que os neurônios habenulares eram ativados por uma gama de estímulos aversivos ou desagradáveis (Proulx *et al.*, 2014). Yang *et al.*, (2008) demonstraram que lesões na HbL após um protocolo de estresse poderia aliviar alguns sintomas comportamentais e fisiológicos imediatos do comportamento depressivo. Ademais, estudos de Murphy *et al.*, (1996) mostraram que lesões habenulares levavam os animais a aumentarem os comportamentos análogos à ansiedade no

teste de labirinto em cruz elevado, assim como aumento da locomoção no campo aberto. Além disso, os sistemas de neurotransmissores encontrados na HbL e HbM podem ser categorizadas como predominantemente glutamatérgicas através da presença do transportador vesicular de glutamato do tipo 2 (vGLUT2) (Aizawa et al., 2012).

O glutamato é o mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC, enquanto GABA é o principal neurotransmissor inibitório (Walker, 1983). O transportador vesicular de glutamato (vGLUT) é o responsável por translocar o glutamato sintetizado para o lúmen da vesícula. Existindo três isoformas diferentes (vGLUT1, vGLUT2, vGLUT3). Esse transporte é fundamental para neurotransmissão glutamatérgica (Herzog *et al.*, 2006). O GABA, em contrapartida é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos adultos (Müller *et al.*, 2015; Janik *et al.*, 2016). A enzima glutamato descarboxilase (GAD) converte glutamato em GABA e possui duas isoformas (GAD65 e GAD67) codificadas por diferentes genes o *gad2* e o *gad1*, respectivamente (Pinal e Tobin, 1998). Sendo, GAD67 a principal enzima no cérebro, constitutivamente ativa no SNC (Asada *et al.*, 1997) e está localizada no citoplasma, desempenhando papel crítico na manutenção de reservas intracelulares de GABA para atividade metabólica e outras funções (Soghomonian e Martin, 1998). Ao passo que, GAD65 está localizada na membrana sináptica e parece exercer sua ação de modo a liberar GABA sinápticamente (Lange *et al.*, 2014). Diferentes estudos demonstram que a redução da transmissão GABAérgica está associada a um perfil semelhante ao ansiogênico em roedores (Truitt *et al.*, 2009; Tasan *et al.*, 2011). Desta maneira, compreende-se que o sistema GABAérgico e o glutamatérgico estejam envolvidos com alterações nos comportamentos análogos à ansiedade em ratos.

Todos esses dados em conjunto, reforçam a importância da habênula e da amígdala nas respostas comportamentais, bem como as ações de AVP, OT e seus receptores, e também a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica para alterar os comportamentos análogos à ansiedade em ratos. Apesar dos diversos estudos a respeito das ações da AVP e da OT na ansiedade, pouco ainda se sabe acerca da ligação real entre a desidratação e o *drive* motivacional que objetiva a busca e consumo da água, sendo assim, tornam-se necessários estudos no sentido de elucidar como a desidratação intracelular pode afetar o sistema comportamental. Dada a importância das alterações osmóticas nesse contexto estudamos a influência da privação hídrica e da sobrecarga salina, estímulos capazes de causar desidratação intracelular e hiperosmolalidade extracelular, nos comportamentos análogos à ansiedade em ratos.

## **3 OBJETIVO**

### **3.1 Objetivo geral**

Analisar o efeito do aumento da osmolalidade plasmática nos comportamentos exploratório e análogos à ansiedade em ratos submetidos à privação hídrica e a sobrecarga salina, bem como seus efeitos na expressão de genes relacionados à neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica (vGLUT2 e GAD67, respectivamente) e para os receptores AVPR1a e OTR na amígdala basolateral, amígdala central e habênula.

### **3.2 Objetivo específico**

I – Avaliar o comportamento exploratório no campo aberto dos animais submetidos à desidratação, ocasionada pela privação hídrica e sobrecarga salina durante 24 e 48 horas;

II – Analisar o comportamento análogo à ansiedade dos animais submetidos à desidratação, ocasionada pela privação hídrica e sobrecarga salina durante 24 e 48 horas;

III – Correlacionar às respostas comportamentais observadas com alterações na osmolalidade plasmática;

IV – Analisar a expressão gênica para AVPR1a, OTR, vGLUT2 e GAD67 na amígdala central, amígdala basolateral e habênula após privação hídrica e sobrecarga salina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e apreciação bioética

Foram utilizados ratos adultos (~290g) da linhagem Wistar, oriundos do Biotério de Criação do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), mantidos em caixas coletivas (contendo 4 animais cada) no Biotério de Manutenção do DCFis (ICBS – UFRRJ), ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes acesas entre às 06:00 e às 18:00 horas), com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e com acesso *ad libitum* a água e a ração. Ao todo foram utilizados 114 animais. Todos os procedimentos estão de concordância com o Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Protocolo número = 001/2017) e com a legislação vigente (Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008).

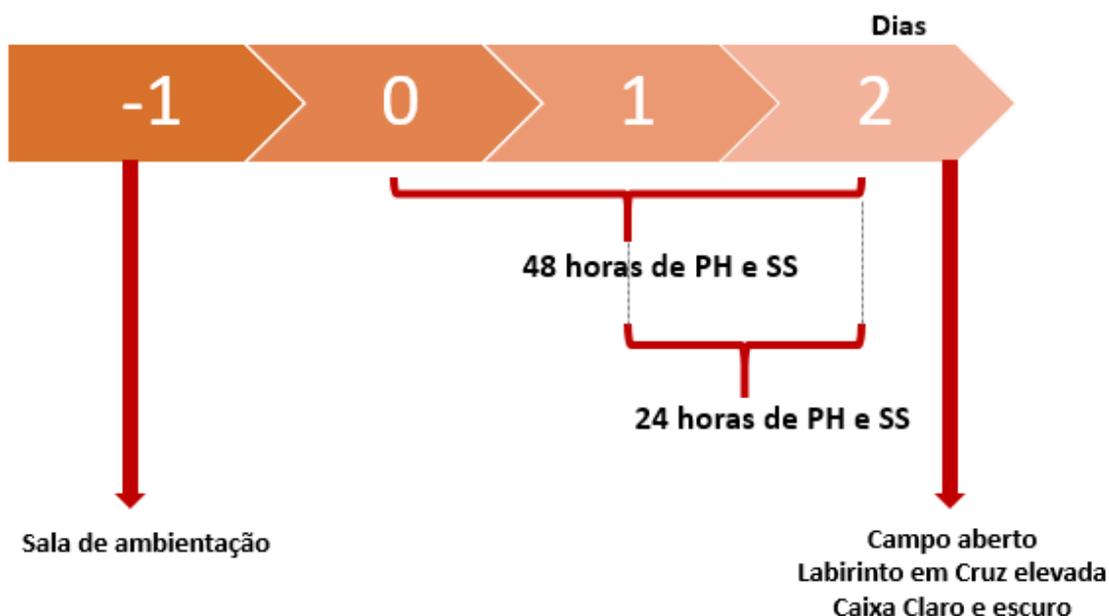
### 4.2 Grupos experimentais

Os animais foram separados em cinco grupos distintos:

- I) Controle (**CT**): com livre acesso à água filtrada (23 ratos);
- II) Privação hídrica (**PH24h**): água removida pelo período de 24 horas antecedentes ao experimento (23 ratos);
- III) Sobrecarga salina (**SS24h**): solução de NaCl à 1,8% por 24h como único líquido disponível (22 ratos);
- IV) Privação hídrica (**PH48h**): água removida pelo período de 48 horas antecedentes ao experimento (24 ratos);
- V) Sobrecarga salina (**SS48h**): solução de NaCl à 1,8% por 48h como único líquido disponível (22 ratos).

### 4.3 Delineamento experimental

Os animais foram alocados em mini-isoladores de polieterimida transparente (Alesco), dimensões (48,3 cm x 33,7 cm x 26,5 cm), com área de piso de 1154 cm<sup>2</sup>. Em cada mini-isolador permaneceram apenas 4 animais. Quando os mesmos alcançavam o peso adequado eram separados para a realização dos experimentos comportamentais, seguido da coleta dos tecidos para posterior análise. A Figura 1 representa a linha do tempo do experimento de privação hídrica e sobrecarga salina, seguido dos testes comportamentais.



**Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental.** PH, privação hídrica; SS, sobrecarga salina.

O primeiro experimento realizado foi o campo aberto seguido do labirinto em cruz elevado. Em outro momento, outro grupo de animais foi submetido ao teste da caixa claro e escuro. Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de guilhotina, para coleta de sangue e encéfalo. O método de decapitação por guilhotina apesar de restrito é o mais indicado neste protocolo experimental, pois, o uso de agentes anestésicos altera a expressão de mRNA de diversos genes, incluindo AVP e OT (Pan *et al.*, 2011), bem como, podem influenciar a liberação de AVP (Reed *et al.*, 2009). Esse processo foi realizado por pesquisador experiente utilizando guilhotina apropriada e em boas condições de uso conforme recomendado pelas normas vigentes.

Para minimizar o estresse inespecífico, os animais foram manuseados pelo menos três vezes durante a semana anterior aos experimentos. Além disso, todos os testes comportamentais foram realizados no período noturno, entre às 18:00 e 23:00 horas, horário de maior atividade exploratório, reduzindo assim, prováveis interferências da variação circadiana (Andrade *et al.*, 2003).

Os experimentos foram divididos em duas etapas:

*Etapa I:* Consistiu em avaliar o efeito da privação hídrica e sobrecarga salina, nos comportamentos relacionados à ansiedade. Após as luzes se apagarem (às 18:00 horas) aguardávamos em torno de 1 hora para os animais se adaptarem a nova condição afótica e então às 19:00 horas começávamos a realização dos testes comportamentais. Todavia, antes do dia do teste, os animais permaneceram 48 horas em sala de ambientação, com o objetivo de reduzir o estresse inespecífico, e acomodá-los a nova condição ambiental. Todos os testes foram gravados com a câmera infra-vermelha TopWay Collor ccd (Topway do Brasil, São Paulo-SP, Brasil), e utilização do software GeoVision GV 800 System (Geovision do Brasil, São Paulo-SP, Brasil). As gravações foram feitas para que posteriormente pudéssemos efetuar a análise manualmente ou através do software para análise de vídeos comportamentais ANY-Maze versão 5.1 (Stoelting Co., Wheat Dale, IL, USA). No primeiro momento realizamos uma bateria de testes, primeiramente o campo aberto seguido do labirinto em cruz elevado, e em outro momento, outro grupo de animais foi submetido ao teste da caixa claro e escuro. Ao final de cada ensaio comportamental individual, foi feita a limpeza do aparato com álcool a 10%, evitando com que pistas olfatórias pudessem interferir no ensaio subsequente.

*Etapa II:* O segundo experimento teve por objetivo analisar a expressão de AVPR1a e OTR, assim como, GAD67 e vGLUT2 na amígdala basolateral, amígdala central e habênula, para isso, foi realizada a análise da expressão relativa de mRNA pela técnica de RT-qPCR. Através dessa técnica pudemos analisar se ocorreu alteração na expressão gênica relativa dos receptores para AVP e OT e de GAD67 e vGLUT2 nas regiões estudadas. Para isso, utilizamos os cérebros coletados após o teste da caixa claro escuro, a fim de, minimizar a utilização de animais nesse trabalho, se baseando nos conceitos bioéticos dos 3Rs (*replace, reduce e refine*).

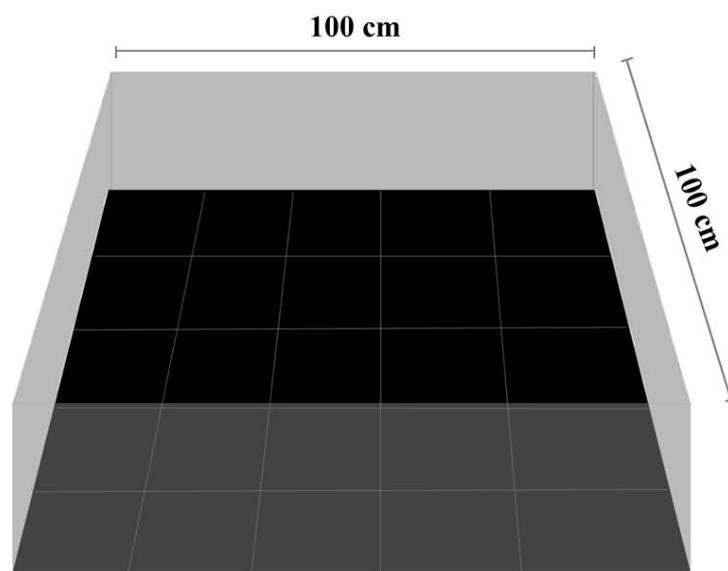
#### **4.4 Análises comportamentais**

Os testes de ansiedade em geral consistem em expor os animais a uma nova situação a partir da qual aumentam as respostas ao estresse (Misslin *et al.*, 1989). Assim, neste trabalho, o teste de campo aberto foi realizado para analisar a locomoção espontânea dos animais, bem como o labirinto em cruz elevado e a caixa claro e escuro para medir comportamentos semelhantes à ansiedade.

##### **4.4.1 Campo aberto**

O teste do campo aberto (CA) foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade locomotora espontânea dos animais. Esse teste comportamental é baseado no trabalho de Hall (1934) que sugeriu que a defecação e urina seriam indicadores do seu estado emocional. O campo aberto tornou-se um teste muito utilizado para medir não apenas comportamentos semelhantes à ansiedade, mas também para análise da sedação e da atividade locomotora. Além disso, seu uso foi estendido para um grande número de espécies, não apenas roedores (Prut e Belzung, 2003).

O aparato consiste em uma caixa de acrílico (100 cm x 100 cm) dividido em 25 quadrantes iguais (20 cm x 20 cm) com fundo preto e linhas divisórias brancas, com paredes transparentes de 40 cm de altura, 9 quadrantes compoem a área central e 16 quadrantes compoem a área periférica, conforme podemos visualizar na Figura 2.

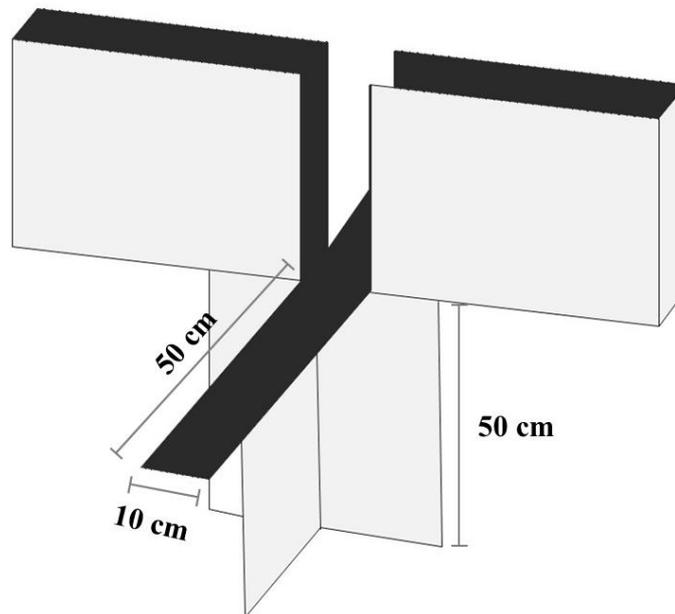


**Figura 2. Representação ilustrativa do aparato utilizado no teste do campo aberto.**

Os animais foram colocados no centro do campo aberto e avaliados durante 5 minutos. Para análise do campo aberto foi utilizado o Software ANY-maze e os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida, distância percorrida na área central, número de entradas na área central, tempo na área central, levantamentos (*Rearing*) para a avaliação da atividade locomotora horizontal e o tempo gasto realizando autolimpezas (*Grooming*). Nesse teste a defecação não foi mensura, já que o protocolo de privação hídrica altera esse parâmetro.

#### **4.4.2 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos principais aparatos utilizados para o estudo da ansiedade, sendo os roedores os animais mais utilizados (Rodgers e Dalvi, 1997). Esse modelo foi validado por Pellow *et al.*, (1985). A utilização do LCE se baseia no conflito entre a exploração e a aversão natural de roedores por espaços abertos (Handley e Mcblane, 1993). O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos e opostos (50 x 10 cm cada um), e outros dois braços também opostos do mesmo tamanho, mas fechados com paredes laterais de 40 cm de altura. Os braços abertos e fechados cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz, delimitada por uma área central de 10 x 10 cm. O aparato como um todo estava elevado a 50 cm do solo como representado na Figura 3.

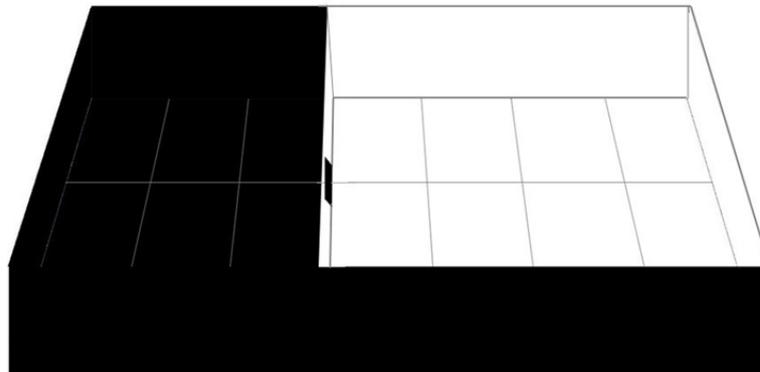


**Figura 3. Representação ilustrativa do aparato utilizado no teste de labirinto em cruz elevado.**

Cada animal era colocado na área central, sempre com a cabeça virada para o braço fechado e podia explorar livremente o aparato durante 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos, tempo gasto e número de entradas nos braços fechados; mergulhos de cabeça (*Head dipping*) e estiramentos (*Stretched attend postures – SAP*) totais realizados.

#### **4.4.3 Caixa claro e escuro**

Este teste foi realizado para análise do conflito natural que ocorre quando os animais são expostos a um ambiente que não é familiar, neste caso, o animal é colocado no meio de uma caixa com iluminação aversiva. O procedimento experimental da caixa claro e escuro (CCE) foi elaborado por Crawley e Goddwin em 1980, consiste em um aparato com dois compartimentos, sendo um deles iluminado e o outro escuro ou pouquíssimo iluminado (Crawley e Goodwin, 1980). Uma abertura liga os compartimentos permitindo o livre acesso entre ambos, conforme é representado na Figura 4.



**Figura 4. Representação ilustrativa do aparato utilizado no teste da caixa claro e escuro.**

Neste teste o animal foi colocado no centro da parte clara do aparato, voltado para a parede contrária da abertura de comunicação dos ambientes e seu comportamento avaliado por 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: número de transições e tempo para a primeira transição do compartimento claro para o escuro (latência), quadrantes totais, tempo na área clara e número de episódios de *SAPs*. Na área clara é colocada uma fonte de luz que faz com que a iluminação nesta porção do aparato seja de 400 lux e na porção escura de aproximadamente 4 lux.

#### **4.4 Coleta de plasma e encéfalos**

Logo após os testes comportamentais os animais foram submetidos à eutanásia através do método de guilhotina/decapitação e o sangue foi coletado em tubos falcon contendo heparina (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) para aferir a osmolalidade plasmática e em tubos de micro-hematócrito para a avaliação do hematócrito. Os encéfalos foram coletados imediatamente após a decapitação sendo rapidamente congelados em gelo seco. Todos os encéfalos foram acondicionados em ultrafreezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . O plasma foi obtido após centrifugação (20 minutos, 3000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ ) e acondicionado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento dos procedimentos específicos para as dosagens plasmáticas.

#### **4.5 Análises plasmáticas**

Para aferição do hematócrito, o sangue foi coletado em tubos de microhematócrito e centrifugado (CENTROBIO Hematocrit) durante cinco minutos. Em seguida, foi utilizada uma escala de microhematócrito para determinação da porcentagem dos elementos figurados presentes no sangue.

Para analisar a osmolalidade plasmática foram utilizadas alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  de plasma a partir das amostras dos animais, utilizando o osmômetro de bancada (O S M E T T E II<sup>TM</sup>, modelo 5005© Precision Systems Inc.). Antes de qualquer análise o aparelho foi calibrado com as soluções padrões, a amostra então era inserida e a leitura se dava de forma automática

em mOsm/KgH<sub>2</sub>O. Esse aparelho se baseia na depressão do ponto de congelamento, que é alterado pela concentração de solutos presentes em determinada solução.

#### **4.6 Análise da expressão relativa de mRNA de GAD67 e vGLUT2 e dos receptores AVPR1a e OTR na amígdala central, amígdala basolateral e habênula.**

A expressão gênica dos receptores AVPR1a e OTR, assim como de GAD67 e vGLUT2 foram realizadas através da técnica de transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR). Para isso, foram realizados *punchs* das áreas de interesse, seguido da extração do RNA total, produção do DNA complementar (cDNA) para finalmente ser feita a RT-qPCR.

Os encéfalos foram cortados em criostato (Leica Biosystemns, CM 1860) em fatias de 100 µm e o auxílio de uma agulha estéril específica para *micro-punchs* com diâmetro de 1mm a microdissecção dos núcleos de interesse foi realizada em cada corte. As coordenadas dos núcleos cerebrais estudados foram retiradas do Atlas estereotático Paxinos e Watson (2005). Foram coletadas 15 *micro-punchs* da amígdala central (coordenada Bregma -1,80 até -3,30 mm), 20 *micro-punchs* da amígdala basolateral (coordenada Bregma -1,80 até -3,80) e 24 *micro-punchs* da habênula (coordenada Bregma -2,30 até -4,70). É importante salientar que esses núcleos são bilaterais e ambos os lados foram retirados. Após os *micro-punchs* das áreas de interesse, as amostras coletadas foram alocadas em eppendorfs *RNAse free* contendo 500 µl de reagente QIAzol® (QIAzol®, QIAGEN Cat N° 79306). Logo após, as amostras eram armazenadas em ultra freezer -80°C até a extração do RNA.

No dia da extração as amostras eram mantidas em gelo até o descongelamento (em torno de 15 minutos) em seguida cada amostra foi “vortexada” e mantida na temperatura ambiente (TA) em torno de 24°C por 10 minutos, passado esse tempo, foi adicionado 100 uL de clorofórmio puro (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias-RJ Brasil) em cada amostra, vortexando-as novamente por 15 segundos e em seguida aguardamos o prazo de 5 minutos à TA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga 5430 R® eppendorff, Hamburgo, Alemanha) por 15 minutos à 4°C com rotação de 12.000 g. O sobrenadante obtido (fase clara superior) foi retirado (250 µl) e acrescentado a novos tubos eppendorfs *RNAse free*, juntamente foram adicionados 250 uL de álcool 70% *RNAse free* (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias-RJ Brasil) em cada amostra, homogeneizando a mistura por 15 segundos, após homogeneização manual essa mistura foi transferida para as colunas respectivas e centrifugadas por 15 segundos a partir do momento em que a centrífuga atingia a rotação estabelecida de 8.000 g à TA. O volume que passou pela coluna era descartado e adicionada 700 µl de tampão RW1 em cada coluna, novamente as colunas eram centrifugadas por 15 segundos a 8.000 g à TA. O volume era novamente descartado e 500 µl de tampão RPE era adicionado em cada coluna, aguardando o tempo de 5 minutos, à TA. Passados os 5 minutos, as colunas eram novamente centrifugadas por 15 segundos a 8.000 g à TA e o volume que passou pela coluna descartado, mais uma vez o tampão RPE era adicionado na coluna, porém não havendo a necessidade de aguardar os 5 minutos, as colunas eram então centrifugadas por 2 minutos a 8.000 g à TA, o volume obtido foi novamente descartado, e os tubos eppendorfs foram então trocados por novos tubos coletores *RNAse free* mantendo as colunas com o material biológico intactas, agora as amostras foram mais uma vez centrifugadas por 1 minuto a 20.000 g à TA. Por fim, as colunas foram colocadas em novos tubos eppendorfs *RNAse free*, na qual as colunas foram mantidas abertas durante o tempo de 5 minutos com o objetivo de evaporar o etanol residual. Finalmente, após retirada do etanol,

os precipitados foram resuspenso em 30 µl de água ultrapura diretamente na coluna e em seguida centrifugada por 1 minuto a 8.000 g à TA.

O RNA total foi quantificado no nanoespectrofotômetro (DS-11® Denovix inc. Wilmington-DE, Estados Unidos da América). A síntese de cDNA foi feita a partir de 500 ngdo RNA total, que foram submetidos à transcrição reversa para a produção de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante, neste protocolo utilizamos os seguintes reagentes (1 uL Quantiscript Reverse Transcriptase + 4 uL Quantiscript RT Buffer 5x + RT Primer Mix 1 uL). Em seguida, as amostras foram incubadas no Termociclador (modo “cDNA” do equipamento) para realização da transcrição reversa, nas seguintes condições de incubação de 30 minutos a 42°C, seguido de 3 minutos a 95°C. O cDNA obtido foi diluído numa proporção de 1:3 e foi armazenado a -20°C.

No nosso estudo analisamos a expressão relativa de mRNA através de Taqman e SYBR. O RT-qPCR foi realizado com o equipamento QuantStudio 3® da (Thermo Fisher Scientific). Para amplificar os transcritos gênicos utilizamos sondas Taqman pré-sintetizados para cada gene, *primers* SYBR *green*, Master Mix Power SYBR® *Power Green* PCR e Master Mix para Taqman, ambos fabricados por Thermo Fisher Scientific. A avaliação da expressão dos genes dos receptores AVPR1a e OTR por RT-qPCR se deu por detecção do agente ligante de DNA SYBR *Green*®, sendo o gene controle o RPL19. Já para os genes de GAD67 e vGLUT2 foram usadas sondas Taqman e o gene controle foi a β-actina, a água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Na Tabela 1 é possível visualizar os *primers* e na Tabela 2 as sondas utilizadas.

**Tabela 1. Sequência e eficiência dos *primers* utilizados.**

Alvos	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	Efic. (%)
<b>RPL19</b>	5'-GCGTCTGCAGCCATGAGTA-3'	5'-TGGCATTGGCGATTTCGTTG-3'	110,9
<b>OTR</b>	5'-CTTCATCCAACCCTGGGGAC-3'	5'-TCTTGAAGCTGATGAGGCCG-3'	112,3
<b>AVPR1a</b>	5'-ATCTGCTACCACATCTGGCG-3'	5'-TTATGAAAGGGACCCACGGC-3'	108,14

**Tabela 2. Sondas utilizadas para o *taqman*.**

Alvos	Sondas
<b>β-ACTINA</b>	Rn00667869_m1
<b>GAD67</b>	Rn00690300_m1
<b>vGLUT2</b>	Rn00584780_m1

Cada ensaio foi realizado em triplicata, e o valor mais afastado da média foi eliminado, apenas quando o desvio padrão era maior que 0,2 (cts). Para realização do RT-qPCR em triplicata, foram utilizados para a reação Taqman: 4µl de cDNA da amostra e 8 µl de uma mistura contendo 6,25 µl de solução Taqman Master Mix, 0,65 µl de sonda específica para o gene em questão e 1,60 µl de água RNase free. Enquanto para a reação de SYBR, foram utilizados 2µl de cDNA da amostra e 8µl de uma mistura contendo 5µl de SYBR Master Mix, 0,3µl de *primer forward*, 0,3µl de *primer reverse* e 2,4µl de água ultrapura, a concentração dos *primers* foi de 300pmol. Todos os dados apresentados mostram a expressão do mRNA dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

A quantificação relativa foi determinada pelo método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Para cada amostra, o ciclo limiar (*the shold cycle* - Ct) foi determinado e normalizado pelo controle endógeno ( $\Delta$ Ct = Ct alvo - Ct gene referência), depois foi calculado o  $\Delta\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct da amostra - média do  $\Delta$ Ct do grupo em questão) e para calcular a razão relativa da abundância dos transcritos de cada gene em relação à abundância de transcritos na amostra de referência foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ Ct, ( $2 - \Delta\Delta$ Ct da amostra) que parte do princípio que a cada ciclo da PCR a quantidade de produto dobra, sendo então necessário contemplar que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado a potência do inverso de  $\Delta\Delta$ Ct. Todos os dados apresentados mostram a expressão do mRNA em relação ao grupo controle. Na Tabela 3 estão descritos os valores médios dos Cts dos genes controles para cada núcleo, evidenciando que não houve alterações na expressão dos controles endógenos entre os grupos.

**Tabela 3. Médias  $\pm$  erro padrão da média dos Cts dos genes controles endógenos para cada núcleo.**

<b>Amígdala central</b>		
<b>Grupos</b>	<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>RPL19</b>
CT	21,5 $\pm$ 0,109	18,7 $\pm$ 0,144
PH48h	21,1 $\pm$ 0,232	19,1 $\pm$ 0,284
SS48h	21,2 $\pm$ 0,215	18,6 $\pm$ 0,294
<b>Amígdala basolateral</b>		
<b>Grupos</b>	<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>RPL19</b>
CT	20,3 $\pm$ 0,136	17,5 $\pm$ 0,119
PH48h	19,8 $\pm$ 0,102	17,4 $\pm$ 0,060
SS48h	19,9 $\pm$ 0,084	17,3 $\pm$ 0,039
<b>Habênula</b>		
<b>Grupos</b>	<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>RPL19</b>
CT	18,9 $\pm$ 0,110	18,3 $\pm$ 0,128
PH48h	19,2 $\pm$ 0,114	18,3 $\pm$ 0,127
SS48h	18,9 $\pm$ 0,077	18,2 $\pm$ 0,113

Tendo em vista que apenas os grupos submetidos à desidratação por 48 horas apresentaram alterações comportamentais significativas, realizamos o RT-qPCR apenas nas amostras de 48 horas de privação hídrica, sobrecarga salina e grupo controle. Das amostras que obtivemos a partir dos *punchs* realizados, apenas 6 de cada grupo foram submetidas ao ensaio de RT-qPCR.

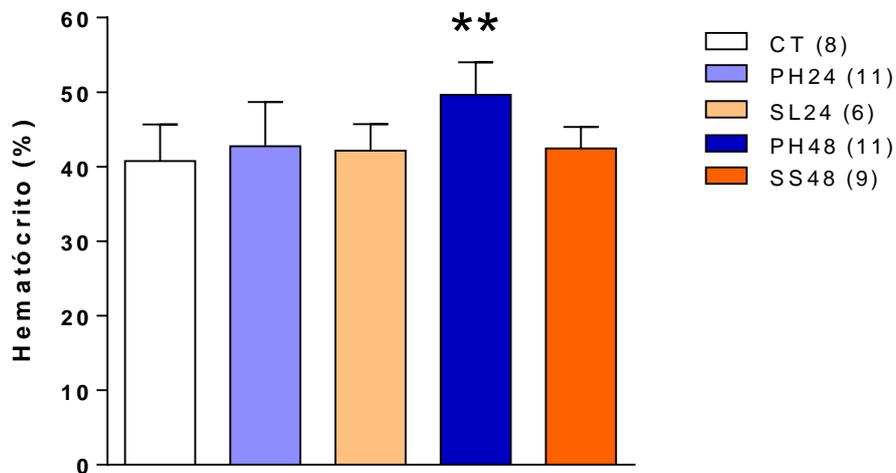
#### **4.7 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey, utilizando o software estatístico *GraphPad Prism* (versão 6.0). Utilizamos o teste de regressão linear para avaliar a correlação entre a osmolalidade plasmática e o tempo de permanência dos animais no braço aberto. Os resultados obtidos são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Maiores detalhes a respeito da análise estatística de cada resultado são representados nas legendas das respectivas figuras.

## 5 RESULTADOS

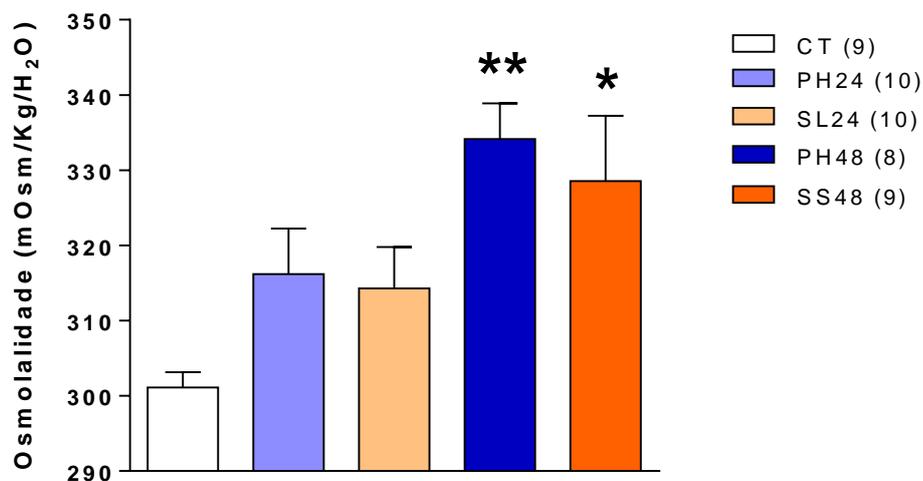
### 5.1 Análises plasmáticas

Nossos dados demonstram que houveram alterações significativas da porcentagem de células sanguíneas em relação ao plasma nos animais submetidos à desidratação ( $F_{4,40} = 5,866$ ;  $p = 0,008$ ). A análise do pós-teste de Tukey revelou um aumento significativo do hematócrito apenas no grupo submetido ao protocolo de privação hídrica por 48 horas em relação ao grupo controle ( $p = 0,0014$ ; Figura 5).



**Figura 5. Hematócrito dos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas.** O número de animais por grupo está descrito na figura entre parênteses. Cada barra representa média ± EPM; Teste ANOVA de uma via; \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo com controle.

Em relação à osmolalidade plasmática (Figura 6), medida indicativa do *status* de desidratação intracelular, o ANOVA demonstrou que houve alteração significativa ( $F_{4,41} = 4,586$ ,  $p = 0,0037$ ). O pós-teste de Tukey indicou aumento significativo nos grupos privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas, respectivamente (PH48h  $p = 0,0039$  e SS48h  $p = 0,0176$ ). Contudo, os grupos que foram submetidos aos protocolos de privação e sobrecarga por 24 horas não apresentaram alterações na osmolalidade plasmática de maneira significativa em relação ao grupo controle.

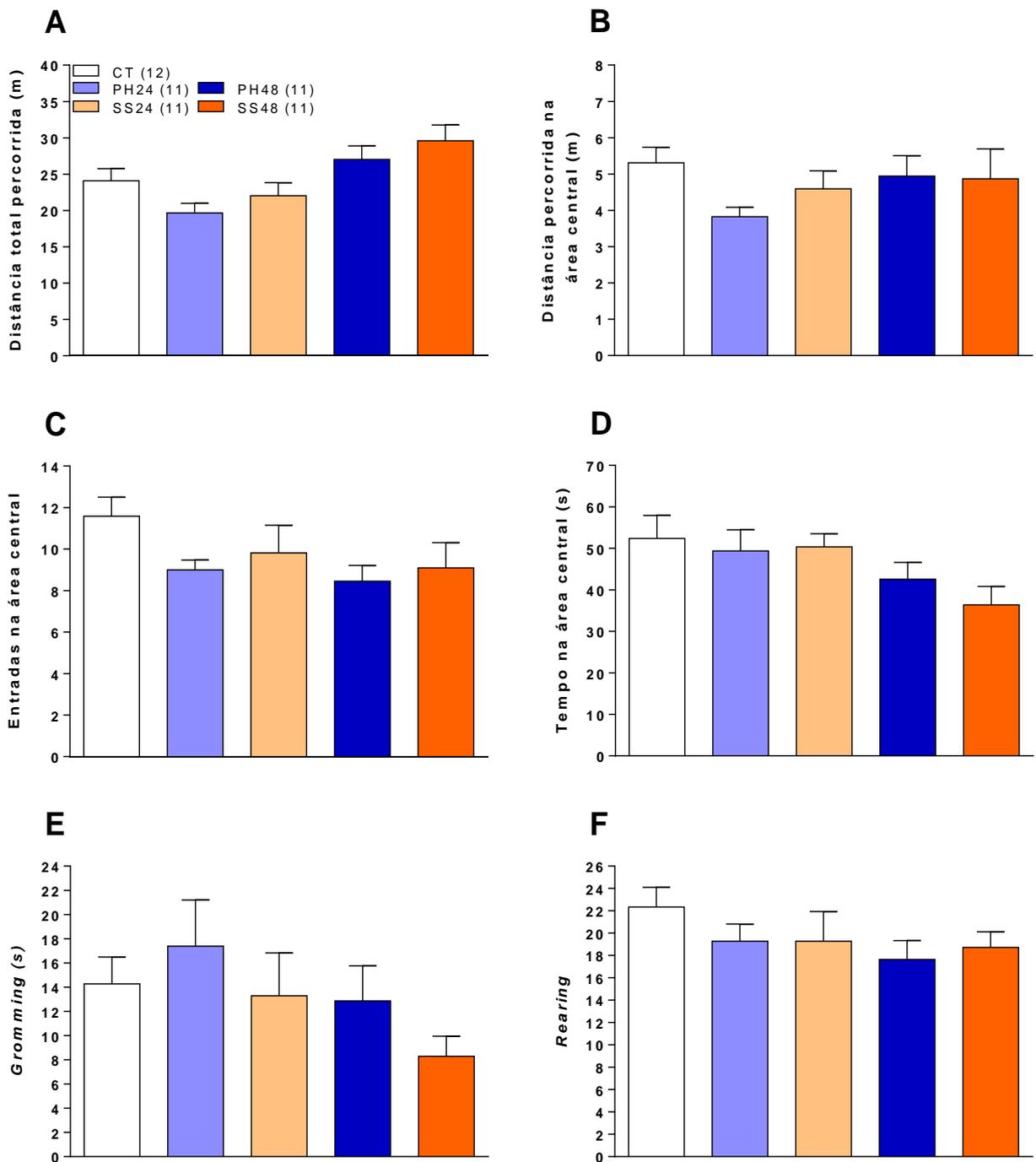


**Figura 6. Osmolalidade plasmática dos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas.** O número de animais por grupo está descrito na figura entre parênteses. Cada barra representa média  $\pm$  EPM; teste ANOVA de uma via; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle.

## **5.2 Análises comportamentais**

### **5.2.1 Efeito da privação hídrica e sobrecarga salina por 24 e 48 horas na locomoção espontânea**

Neste teste, os animais submetidos à privação hídrica por 24 e 48 horas, assim como, os animais submetidos à sobrecarga salina pelos mesmos períodos, não apresentaram diferenças significativas em comparação aos animais controles, em nenhum parâmetro observado, conforme apresentado na Figura 7. Indicando que esses animais não alteraram a locomoção mesmo após submetidos a protocolos de desidratação. Vale a pena ressaltar, que os resultados obtidos nesse teste foram avaliados tanto manualmente quanto através do *software* ANY-maze. Quando comparados os resultados manuais e os obtidos pelo *software* ANY-maze, o *software* mostrou alta confiabilidade, sendo então utilizado no lugar das análises manuais realizadas por pesquisador experiente na área.

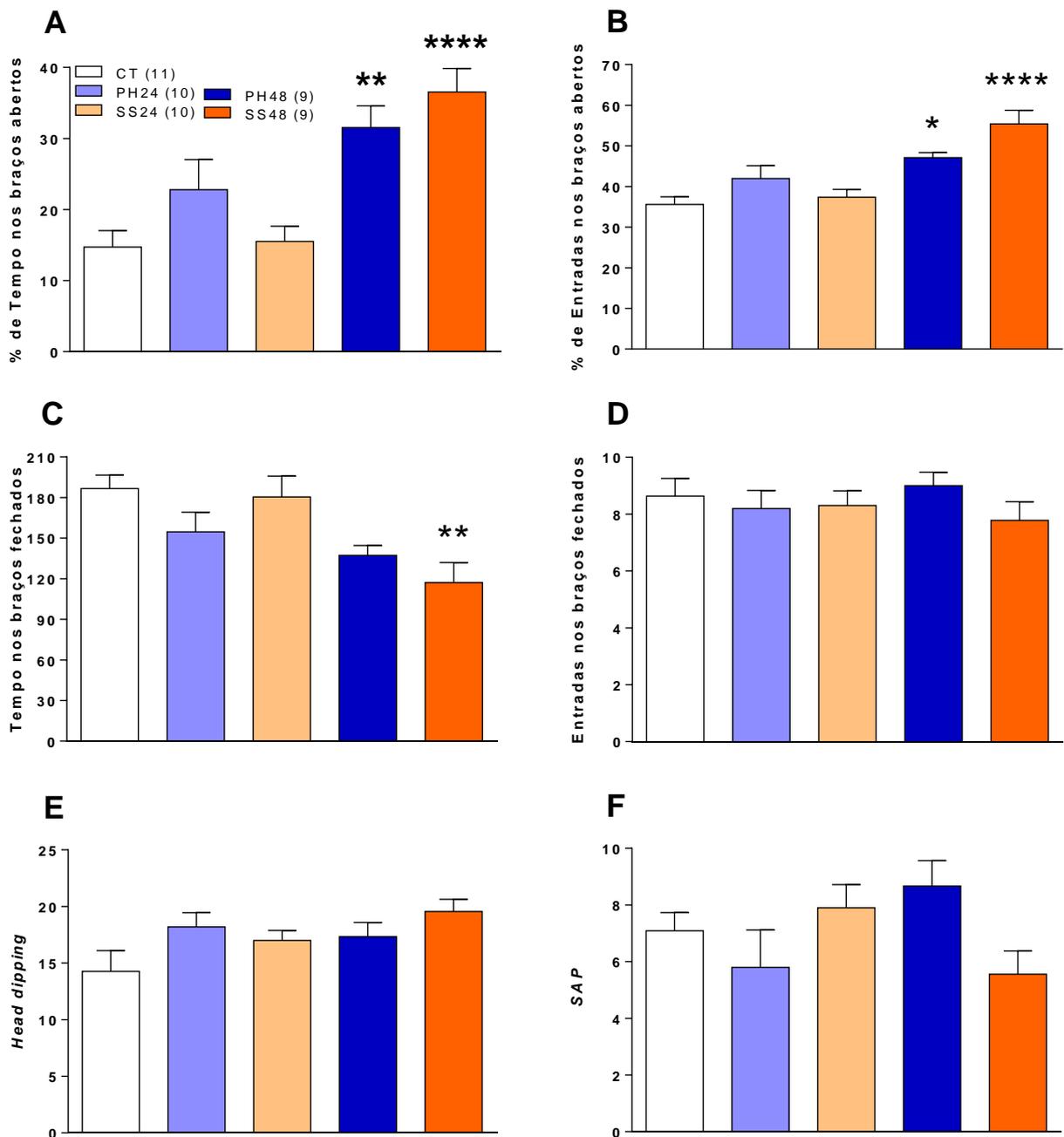


**Figura 7. Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste do campo aberto em animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas.** A) Distância total percorrida; B) Distância percorrida na área central; C) Número de entradas na área central; D) Tempo na área central; E) Tempo de *Grooming*; F) Episódios de *Rearing*. O número de animais por grupo está descrito na figura entre parênteses. Cada barra representa média ± EPM; teste ANOVA de uma via.

### 5.2.2 Efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina nos parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado

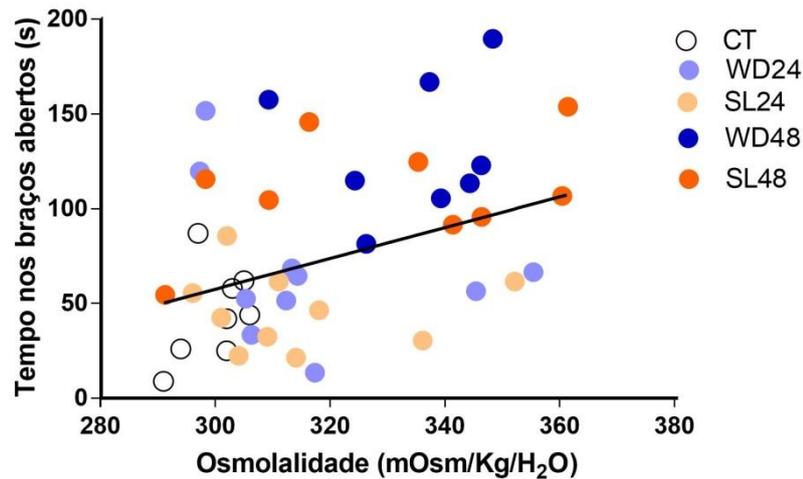
Após o campo aberto os animais foram submetidos imediatamente ao labirinto em cruz elevado. Os animais submetidos aos protocolos de desidratação por 48 horas apresentaram uma resposta claramente ansiolítica. Após privação hídrica e sobrecarga salina, pudemos observar um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{4,44} = 9,796$ ;  $p = 0,0001$ ) na qual o pós-teste indicou haver aumento do grupo PH48h ( $p = 0,0143$ ) e SS48h ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle, assim como, maior porcentagem de tempo despendido nos braços abertos ( $F_{4,44} = 10,78$ ;  $p < 0,0001$ ), demonstrado pelo pós-teste de Turkey, onde PH48h ( $p = 0,0124$ ) e SS48h ( $p < 0,0001$ ) foram os grupos que apresentaram diferença significativas também em relação ao grupo controle. Adicionalmente, houve redução no tempo de permanência no braço fechado ( $F_{4,44} = 5,194$ ;  $p = 0,0016$ ), onde o grupo SS48h apresentou diminuição significativa ( $p = 0,0030$ ).

Por fim, nenhum grupo apresentou alterações nos comportamentos de avaliação de risco (*stretched attention postures* – SAPs) e mergulho de cabeças (*head dipping*). Todos esses resultados podem ser vistos na Figura 8.



**Figura 8.** Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste do labirinto em cruz elevado nos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas. A) Porcentagem de tempo nos braços abertos; B) Porcentagem de entradas nos braços abertos; C) Tempo nos braços fechados; D) Número de entradas nos braços fechados; E) Episódios de *Head dipping*; F) Episódios de *SAPs*. O número de animais por grupo está descrito na figura entre parênteses. Cada barra representa média  $\pm$  EPM; teste ANOVA de uma via; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  em relação ao grupo controle.

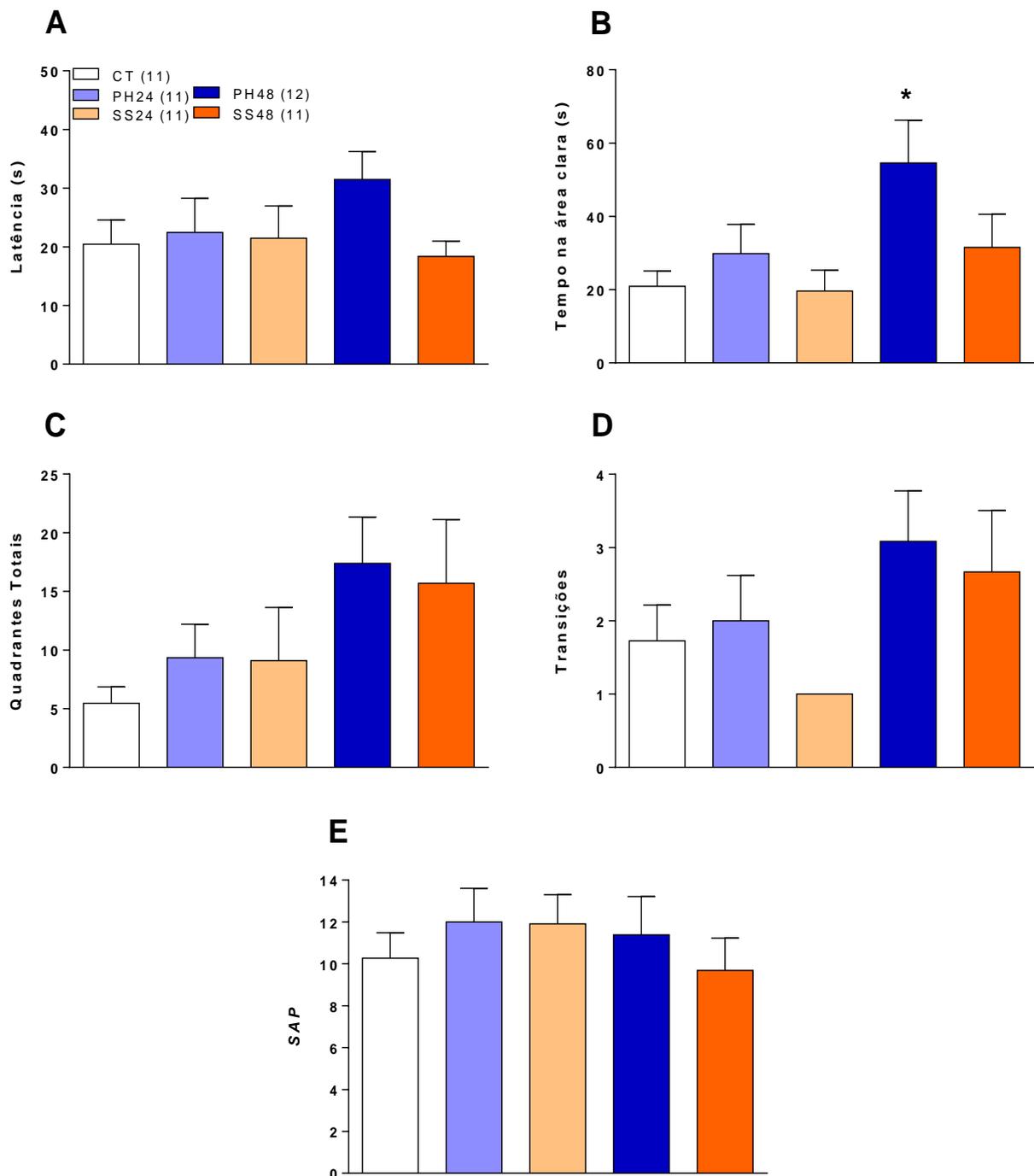
Adicionalmente, a regressão linear entre o tempo de permanência nos braços abertos e a osmolalidade, demonstra uma correlação positiva entre os dois parâmetros, onde quanto maior a osmolalidade plasmática maior é o tempo de permanência no braço aberto no teste de labirinto em cruz elevado ( $p = 0.0142$  e  $r = 0.3637$ ; Figura 9). Ou seja, quanto maior a osmolalidade, maior é o tempo que o animal despende no braço aberto, indicando assim a relação entre o aumento da osmolalidade e o comportamento ansiolítico.



**Figura 9. Regressão linear entre a osmolalidade plasmática e o tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.** O número total de animais por grupo foi igual a 8.

### **5.2.3 Efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina sobre os parâmetros analisados na caixa claro escuro**

A caixa claro e escuro, assim como, o labirinto em cruz elevado é um ensaio comportamental utilizado para avaliar o *status* de ansiedade, contudo, o paradigma abordado é diferente. Na caixa claro escuro o animal é submetido a outro tipo de condição aversiva, neste caso, alta luminosidade (400 lux), onde um compartimento fica altamente iluminado e o outro sem iluminação. Sendo assim, outro grupo de animais foi submetido a esse teste com o objetivo de analisar a resposta comportamental de ratos desidratados em uma condição altamente aversiva, haja vista, que todos os testes comportamentais foram realizados no período noturno, período de maior atividade exploratória. Neste teste obtivemos resultados significativos apenas no tempo de permanência na área clara ( $F_{4,50} = 2,921$ ;  $p = 0,0301$ ), onde apenas o grupo privado de água por 48 horas apresentou resultado significativo ( $p = 0,0424$ ; Figura 10) em comparação ao grupo controle.



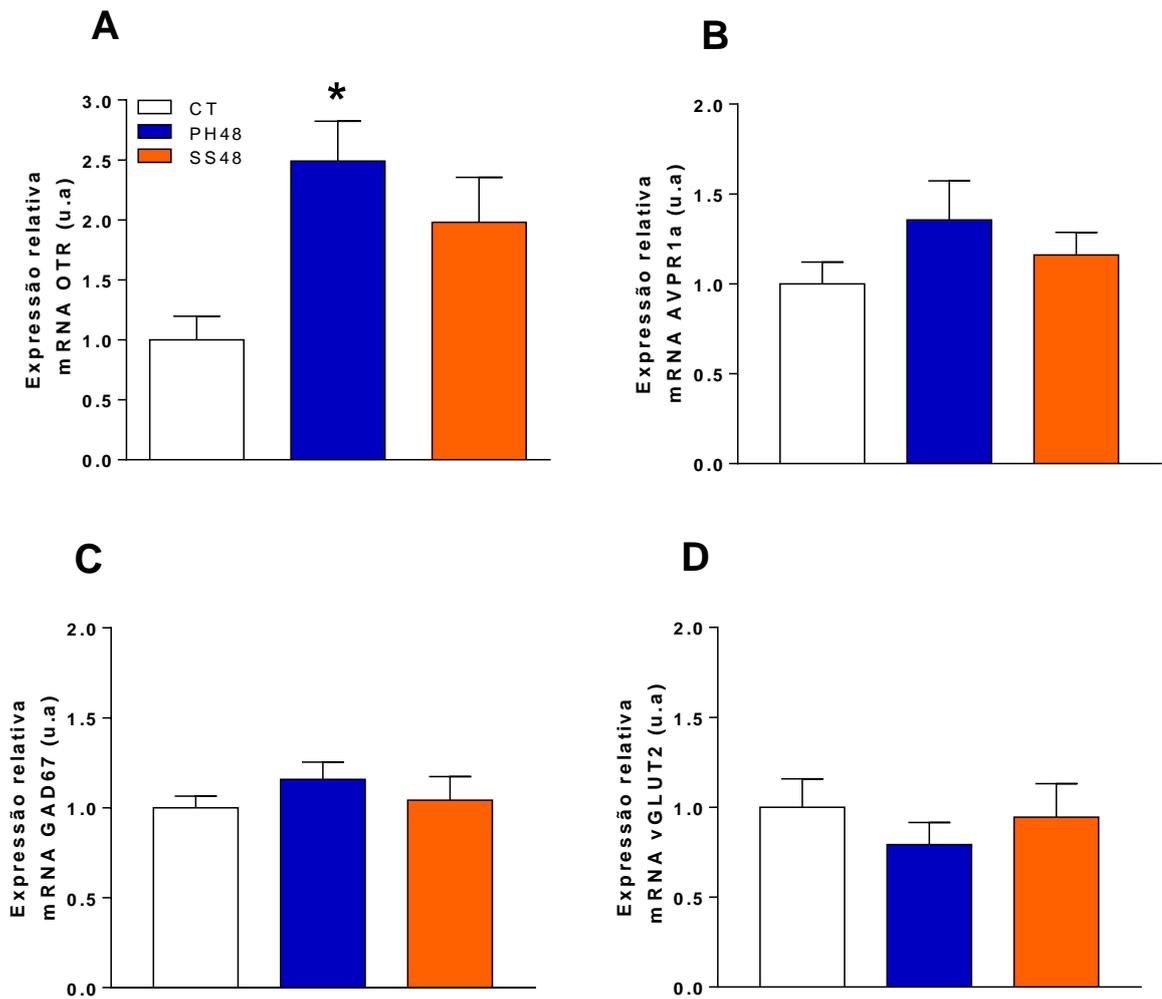
**Figura 10. Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste da caixa claro e escuro em animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina, por 24 e 48 horas.** A) Latência; B) Tempo na área clara; C) Transições entre a área clara e escura; D) Número de transições da área clara para a escura; E) Número de episódios de SAPs. O número de animais por grupo está descrito na figura entre parênteses. Cada barra representa média  $\pm$  EPM; teste ANOVA de uma via; \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

### **5.3 Análise dos efeitos da desidratação na expressão relativa de mRNA**

Como observado nos resultados da análise comportamental, os animais que sofreram desidratação por 48 horas foram os que apresentaram respostas significativas no LCE e na CCE, sendo assim, optamos por analisar apenas os grupos submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas em relação à expressão relativa de mRNA para AVPR1a, OTR, GAD67 e vGLUT2 na amígdala basolateral, amígdala central e habênula.

#### **5.3.1 Análise dos efeitos da privação hídrica e da sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA para GAD67, vGLUT2, OTR e AVPR1a na amígdala central**

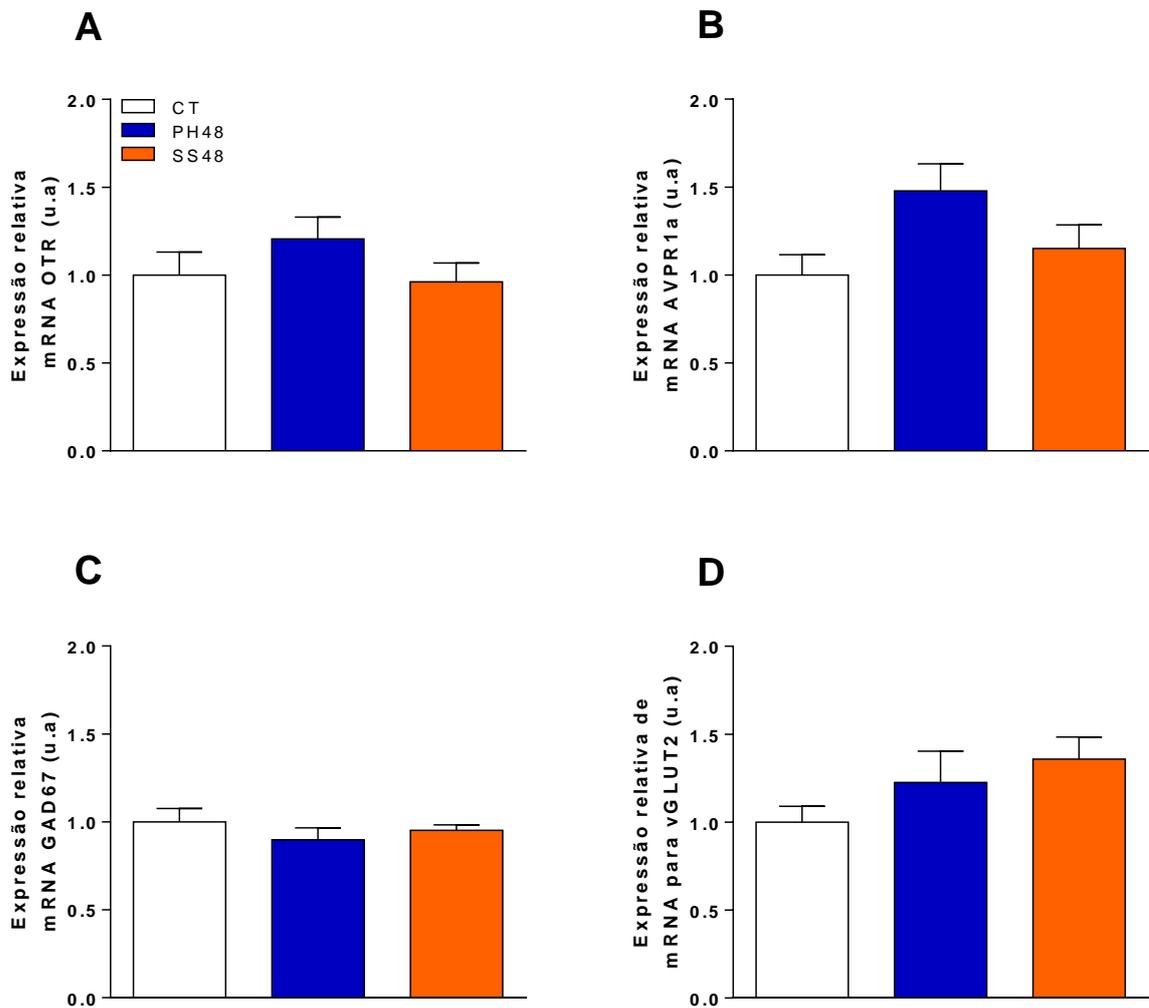
Na amígdala central a expressão gênica de mRNA para OTR aumentou significativamente ( $F_{2,15} = 5,994$ ;  $p = 0,0122$ ), o pós-teste de Turkey demonstrou que esse aumento ocorreu no grupo privação hídrica 48 horas ( $p = 0,0103$ ). Contudo, não houve aumento significativo da expressão de mRNA para AVPR1a, vGLUT2 e GAD67 durante privação de água. No mais, também não foram observadas alterações na expressão gênica para AVPR1a, OTR, vGLUT2 e GAD67 no grupo sobrecarga salina 48 horas, conforme ilustrado na Figura 11.



**Figura 11. Efeitos da privação hídrica e da sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA na amígdala central.** A) OTR mRNA aumentou significativamente na condição de privação hídrica; B) Expressão de mRNA para receptor AVPR1a; C) Expressão de mRNA para GAD67; D) Expressão de mRNA para vGLUT2. Cada barra representa média  $\pm$  EPM; o número total de animais por grupo foi igual a 6; teste ANOVA de uma via; \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

### **5.3.2 Análise dos efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas na expressão relativa de mRNA para vGLUT2, GAD67, GAD67 e vGLUT2 na amígdala basolateral**

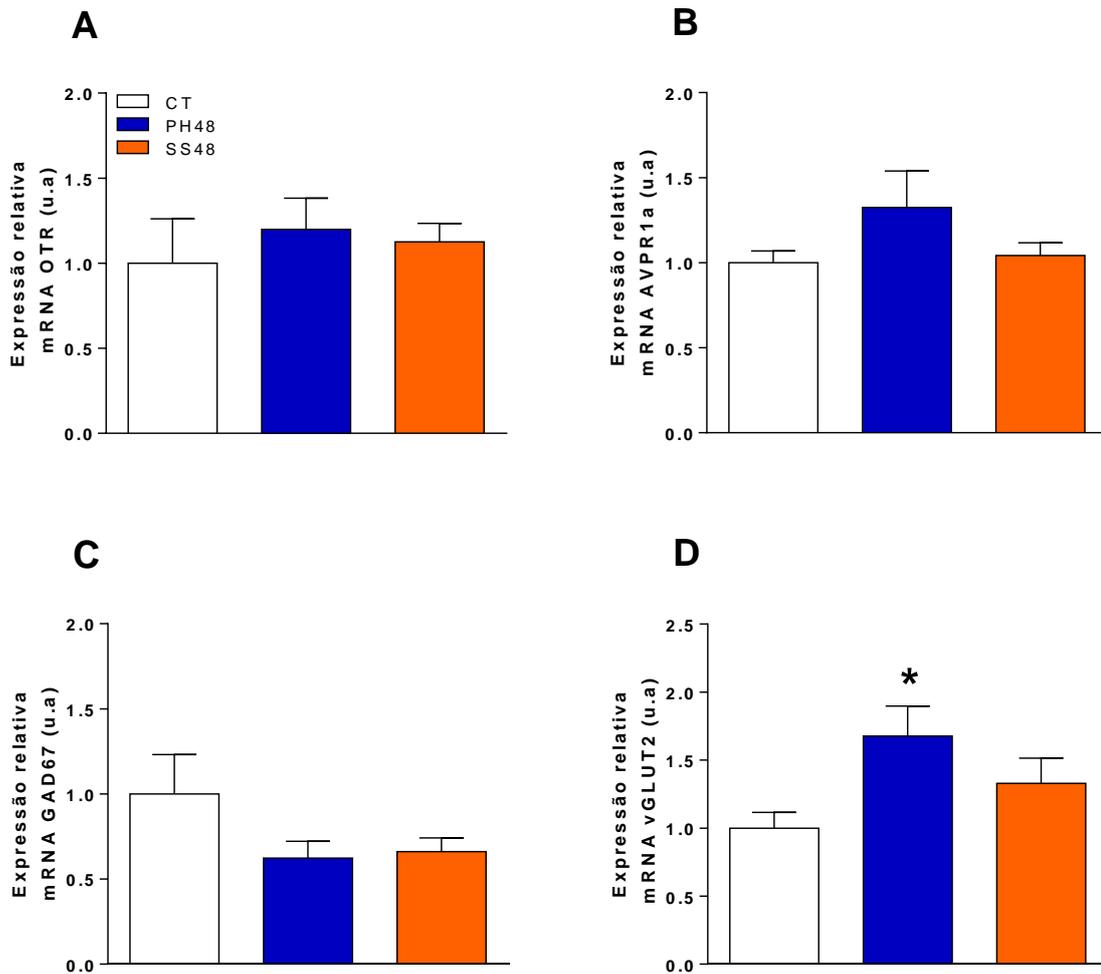
Na amígdala basolateral o ANOVA de uma via não demonstrou diferenças significativas entre os grupos privação hídrica e sobrecarga salina em relação à expressão de mRNA para AVPR1a, OTR, vGLUT2 e GAD67. Indicando que não houve alteração na expressão desses alvos durante a desidratação induzida pela privação hídrica e sobrecarga salina. Esses resultados são apresentados na Figura 12.



**Figura 12. Efeito da privação hídrica e sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA na amígdala basolateral.** Hiperosmolalidade induzida por privação hídrica e sobrecarga salina não alterou a expressão de mRNA na amígdala basolateral para; A) Expressão de mRNA para OTR; B) Expressão de mRNA para AVPR1a; C) Expressão de mRNA para GAD67; D) Expressão de mRNA para vGLUT2. Cada barra representa média  $\pm$  EPM; o número total de animais por grupo foi igual a 6; teste ANOVA de uma via.

### **5.3.3 Análise dos efeitos da privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas na expressão relativa de mRNA para vGLUT2, GAD67, GAD67 e vGLUT2 na habênula**

Por fim, ANOVA de uma via demonstrou alteração significativa na expressão relativa de mRNA para vGLUT2 na habênula ( $F_{2,15} = 35585$ ;  $p = 0,0430$ ), onde o pós-teste de Turkey revelou que essa alteração ocorreu apenas no grupo que foi submetido a privação hídrica ( $p = 0,0534$ ). Em contrapartida, não observamos alterações significativas na expressão gênica para AVPR1a, OTR e GAD67 na habênula, em nenhuma das situações de desidratação. Todos esses dados podem ser visualizados conforme Figura 13.



**Figura 13. Efeito da privação hídrica e da sobrecarga salina na expressão relativa de mRNA na hipófise.** A) Expressão de mRNA para OTR; B) Expressão de mRNA para AVPR1a; C) Expressão de mRNA para GAD67; D) 48 horas de privação hídrica aumentaram a expressão de mRNA para vGLUT2. Cada barra representa média  $\pm$  EPM; o número total de animais por grupo foi igual a 6; teste ANOVA de uma via; \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

A sede é uma sensação essencial à vida que desencadeia mecanismos de defesa do organismo, para aumentar o consumo de água em resposta aos déficits no LEC e/ou no LIC (Gizowski e Bourque, 2018). Animais que experimentam prolongada privação hídrica ou alimentar, geralmente assumem maiores riscos para a obtenção de alimento/água (Mcblane e Handley, 1994; Genn *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004; Rebolledo-Solleiro *et al.*, 2013). Isso sugere que demandas de controle da homeostase interna podem modular a circuitaria neural relacionada à motivação (Berridge, 2004). Partindo dessa premissa, é possível supor que protocolos que desafiam o balanço hidroeletrólítico possam contribuir para alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade. Portanto, no presente trabalho analisamos o efeito da desidratação nas respostas exploratórias e análogas à ansiedade em ratos, bem como a expressão gênica de AVPR1a, OTR, GAD67 e vGLUT2 na amígdala e habênula.

Uma vez que a volemia é mantida pela manutenção da constância entre o ganho e a perda de água e eletrólitos, determinando o grau de hidratação do indivíduo (Verbalis, 2003), a privação hídrica e a sobrecarga salina são estímulos capazes de causar um desequilíbrio dessa constância. Nesse estudo, os animais submetidos a privação de água e a sobrecarga salina por 24 horas não apresentaram alterações significativas na osmolalidade plasmática em comparação ao grupo controle. Existem mecanismos homeostáticos altamente eficientes que atuam coordenadamente para diminuir a excreção de água. Por outro lado, se a ingestão de sódio for muito alta são ativados mecanismos que visam à eliminação das quantidades excedentes deste íon do organismo (Mecawi *et al.*, 2015). Dessa maneira, é possível que durante as primeiras 24 horas de privação hídrica e sobrecarga salina o organismo esteja em processo de adaptação a essa nova condição osmótica, e consequentemente, vários mecanismos estejam ativados a fim de contribuir para a manutenção da osmolalidade dentro do seu *set point* ideal. Em conjunto, essas respostas adaptativas nos animais submetidos à privação e sobrecarga por 24 horas pode ter impedido que esses grupos apresentassem alterações significativas na osmolalidade plasmática. Entretanto, os animais submetidos a 48 horas de privação hídrica e sobrecarga salina aumentaram significativamente a osmolalidade plasmática, demonstrando que essas condições experimentais por pelo menos 48 horas são potentes estressores fisiológicos e podem induzir a desidratação, corroborando com a literatura (Greenwood *et al.*, 2015).

No hematócrito não observamos aumento significativo nos grupos privação hídrica por 24 horas e sobrecarga salina por 24 e 48 horas. Todavia, o hematócrito aumentou no grupo privação 48 horas, como era esperado. A inobservância de modificações no hematócrito dos animais submetidos ao protocolo de sobrecarga salina por 48 horas pode ser explicada da seguinte maneira: à medida que os animais tinham como único fluido disponível salina 1,8%, os animais então ingeriam grandes quantidades desse fluido hipertônico, ao passo que, também excretavam grandes quantidades de água e sódio, isto é, eles repunham a água perdida através da ingestão excessiva desse fluido hipertônico (Greenwood *et al.*, 2015). Ou seja, na condição de privação hídrica as perdas de líquidos ocorrem tanto no LEC quanto no LIC, caracterizando a desidratação absoluta (De Luca *et al.*, 2010), enquanto que na sobrecarga salina ocorre a desidratação do LIC o que é caracterizado como desidratação intracelular (Smith *et al.*, 2015). Portanto, isso pode ter contribuído para que esse grupo não apresentasse diferença significativa do hematócrito em relação ao grupo controle. Além disso, estudos anteriores também já demonstraram que após a sobrecarga salina o hematócrito não aumenta significativamente em relação ao grupo controle (Lepetit *et al.*, 1992), corroborando

assim, com nossos achados de que a sobrecarga salina por 24 e 48 horas não causam alterações relevantes no hematócrito, justamente por apenas causar desidratação intracelular. Logo, a partir dos dados de osmolalidade somados aos resultados do hematócrito podemos concluir que nosso protocolo de privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas foram capazes de suscitar uma condição de desidratação intracelular, corroborando com o esperado e com diversos outros autores na literatura.

Sistemas neuroendócrinos envolvidos com o balanço hidrossalino, atuam também nas respostas comportamentais, como os sistemas vasopressinérgico, ocitocinérgico (Neumann e Landgraf, 2012) e angiotensinérgico (Saavedra, 2017). Além disso, recentes estudos vêm demonstrando a importância do metabolismo do sódio e da água no contexto comportamental (Krause *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Desta maneira, podemos supor que substratos neuroendócrinos que modulam o balanço hidroeletrólítico podem também estar envolvidos nas alterações comportamentais que objetivam a busca da água, como por exemplo, na redução de comportamentos análogos à ansiedade, mesmo que algum fator aversivo adicional seja acrescentado, como por exemplo, um novo ambiente associado à alta luminosidade para roedores. Para testar essa hipótese, após privação hídrica e sobrecarga salina submetemos os animais a análises comportamentais, nomeadamente, campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro e escuro, com o objetivo de analisar se a desidratação altera algum fenômeno comportamental.

A análise do teste do campo aberto demonstrou não haver diferença significativa entre nenhum dos grupos em relação ao controle, em nenhum dos parâmetros observados. Dados não publicados do nosso laboratório indicam que animais submetidos à privação de sódio ou privação alimentar também não alteram o padrão locomotor no campo aberto. Coelho *et al.*, (2006) constataram que animais submetidos à dieta hipossódica e hiperssódica não apresentavam alterações na atividade locomotora no CA. Isso sugere que os animais não alteraram o seu padrão exploratório, como é visto em animais que sofrem psicoestimulação farmacológica (Prut e Belzung, 2003).

Já no teste do labirinto em cruz elevado, não observamos alterações significativas nos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga por 24 horas. Esses resultados diferiram do padrão comportamental observado por Hernandez *et al.*, (2016) que demonstraram que 24 horas de privação hídrica era um estímulo potente o suficiente para desencadear respostas ansiogênicas no LCE. Por outro lado, nossos animais submetidos à privação hídrica e sobrecarga salina por 48 horas indicam redução dos comportamentos análogos à ansiedade. Esta afirmação é baseada no aumento da porcentagem de tempo despendido nos braços abertos, bem como, aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos, isto porque, naturalmente roedores apresentam preferência pelos braços fechados, sendo assim, quando os animais demonstram preferência pelos braços abertos em relação aos animais controle, configuram um comportamento ansiolítico (Dawson e Tricklebank, 1995). Esses dois parâmetros são considerados os principais índices relacionados ao estudo dos comportamentos análogos à ansiedade nesse teste (Rodgers e Dalvi, 1997). No caso do labirinto em cruz elevado a porcentagem de entradas é preferida ao número de entradas nos braços abertos, pois reduz a interferência por conta do aumento da atividade locomotora (Rodgers e Dalvi, 1997). Em contrapartida, não foram observadas alterações no comportamento de avaliação de risco (*stretched attention postures* - SAPs) e nos mergulhos de cabeça (*head dipping*). Em conjunto, esses dados indicam uma clara resposta ansiolítica dissociada a alterações no padrão locomotor.

Estudos prévios de McBlane e Handley (1994) também demonstraram que a privação hídrica tem um efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, no entanto, esse efeito é proporcional à duração dessa privação, sendo que 48 horas de privação hídrica desencadeou uma resposta ansiolítica maior nos animais em relação ao controle e ou ao grupo privado por 24 horas. Além disso, a desidratação aguda por meio da administração em *bolus* de solução salina hipertônica foi capaz de aumentar os comportamentos sociais, o que pode ser visto como um efeito ansiolítico (Krause *et al.*, 2011). Adicionalmente, Rebolledo-Solleiro *et al.*, (2013) demonstraram que ratos privados de água por 72 horas passam mais tempo explorando os braços abertos no labirinto em cruz elevado, sugerindo que eles exibem um perfil ansiolítico em comparação com os controles não privados.

Em consonância com o acima exposto, a análise de regressão linear entre a osmolalidade plasmática e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado mostrou uma correlação positiva. Em outras palavras, o aumento da osmolalidade plasmática foi capaz de alavancar o tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Esse dado revela uma relação entre hiperosmolalidade e comportamentos ansiolíticos em ratos desidratados. Reforçando nossa hipótese de que, o estresse hiperosmótico desencadeia uma resposta comportamental ansiolítica. O que faz sentido se pensarmos no ponto de vista evolutivo, onde condições de fome e ou sede levam animais a reduzirem os comportamentos semelhantes à ansiedade, aumentando a probabilidade de encontrar aporte hídrico, garantindo a sobrevivência (Mcblane e Handley, 1994; Genn *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004; Rebolledo-Solleiro *et al.*, 2013).

Em relação ao teste da caixa claro e escuro, apenas os animais submetidos à privação hídrica por 48 horas aumentaram significativamente o número de tempo na área clara, e não alterou a latência para a primeira entrada no compartimento escuro, bem como a transição entre os dois compartimentos. Neste procedimento experimental, o número total de transições parece ser um índice de atividade locomotora, enquanto o aumento no número de transições da área escura para a clara, assim como o tempo de permanência neste último compartimento, é visto como indicativo da atividade ansiolítica (Bourin e Hascoët, 2003). Os resultados obtidos na caixa claro e escuro indicam uma redução dos comportamentos análogos à ansiedade no grupo privação hídrica por 48 horas.

Naturalmente, os roedores possuem aversão a locais iluminados (Barker *et al.*, 2010), e conseqüentemente, a intensidade da luz ambiente afeta seus comportamentos (Cardenas *et al.*, 2001). Ratos submetidos à baixa iluminação tenderam a explorar mais os braços abertos do labirinto em relação aos animais expostos a alta incidência luminosa (Cardenas *et al.*, 2001). Na caixa claro e escuro, onde os animais podem explorar livremente dois compartimentos, um escuro e o outro com alta incidência luminosa, os mesmos tendem a permanecer mais tempo no compartimento escuro, devido a sua aversão a locais iluminados (Chaouloff *et al.*, 1997). Portanto, Martínez *et al.*, (2002) reforçaram a importância da informação visual como uma aversão ao labirinto. Na caixa claro e escuro apenas altas doses de diazepam são capazes de alavancar uma resposta ansiolítica, ao passo que, menores doses no labirinto em cruz já é possível observar essa mesma resposta (Chaouloff *et al.*, 1997). Nesse sentido, é possível que o estímulo aversivo da caixa claro e escuro seja mais intenso do que o paradigma do labirinto em cruz elevado, que se baseia na aversão de roedores por lugares desprotegidos, logo, as respostas observadas são diferentes. Nossos resultados corroboram essa afirmação, já que na caixa claro e escuro os resultados foram menos proeminentes do que no labirinto em cruz elevado.

O estresse, definido como uma ameaça real ou percebida pode levar a alterações na homeostase orgânica, ativando circuitos neurais que alteram as respostas fisiológicas e comportamentais para garantir a sobrevivência e o bem-estar do indivíduo. Estressores fisiológicos, como a hipernatremia, são ameaças reais que comunicam desvio no metabolismo corporal de água e sódio ao SNC (Smith *et al.*, 2014). Em contrapartida, ameaças percebidas ou estresses psicogênicos criam sinais que surgem dentro do próprio cérebro ao interpretar estímulos do meio externo como danos potenciais. Apesar das diferenças entre estresses fisiológicos e psicogênicos, ambos ativam circuitos hipotalâmicos sobrepostos que medeiam as respostas ao estresse (Krause *et al.*, 2011). Sendo assim, é possível supor que o estresse osmótico desencadeado pela privação hídrica e pela sobrecarga salina desencadeiem alterações comportamentais significativas, como foi observado em nossas análises comportamentais. Ademais, a OT tem sido sugerida como facilitadora de comportamentos, por reduzir a ansiedade e aumentar a interação social (Bale *et al.*, 2001; Petrovic *et al.*, 2008; Lukas e Neumann, 2013; Zoicas *et al.*, 2014; Neumann e Slattery, 2016), ao passo que a AVP (Hernández *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) e a ANG II (Saavedra, 2017) possuem ação ansiogênica.

Nesse sentido, utilizamos dois diferentes estímulos para mimetizar duas condições distintas de desidratação. Na privação hídrica ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de OT, AVP e ANG II, enquanto que na sobrecarga salina ocorre o aumento de OT, AVP e uma redução de ANG II circulante (Greenwood *et al.*, 2015). Além disso, a ANG II aumentada na condição de privação hídrica pode exercer efeito modulatório nas respostas comportamentais que observamos, ao passo que, na sobrecarga salina isso não aconteceria. Estudos anteriores indicam que o antagonismo do receptor AT1 para ANG II, seja por administração periférica ou intracerebroventricular diminui comportamentos análogos à ansiedade, sugerindo que a estimulação desse receptor pela ANG II leva a comportamentos ansiogênicos (Braszko *et al.*, 2003; Saavedra e Benicky, 2007; Saavedra, 2017). Os níveis plasmáticos de AVP e ANG II estão aumentados em condições de privação hídrica e ambos possuem ação ansiogênica (Saavedra e Benicky, 2007). Esses dados reforçam a nossa escolha dos protocolos de privação hídrica e sobrecarga salina, haja vista, as diferenças fisiológicas encontradas entre ambas as condições de estresse osmótico.

A amígdala é um importante núcleo encefálico extraipotalâmico que expressa AVP e OT, assim como, seus receptores (Neumann e Landgraf, 2012), que são encontrados em níveis particularmente elevados no núcleo ACe (Huber *et al.*, 2005). Além de suas ações clássicas, AVP e OT são importantes reguladores das respostas ao estresse e transtornos neuropsiquiátricos, como a ansiedade (Neumann e Landgraf, 2012). Dito isso, nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de mRNA para OTR, sem alteração de AVPR1a, vGLUT2 e GAD67 na amígdala central. De fato, existem projeções do PVN para a ACe (Hernández *et al.*, 2016), o que demonstra a interação entre o sistema neuroendócrino e o sistema límbico.

Os efeitos da administração de OT na amígdala central indicam que este núcleo é um alvo importante para as ações ansiolíticas deste neuropeptídeo (László *et al.*, 2016). Estudos anteriores demonstram que a expressão dos receptores de OT na amígdala central está mais restrita à divisão ACeL/C, enquanto os receptores para AVP são mais expressos na parte ACeM (Huber *et al.*, 2005). A OT estimula os neurônios da CeL/C que enviam projeções GABAérgicas inibitórias, levando a um aumento de GABA na porção ACeM, suprimindo sua atividade e, portanto, reduzindo as respostas de ansiedade e medo, indicando a diferença dos papéis de OT e AVP na amígdala central (Huber *et al.*, 2005). O desequilíbrio entre AVP e



No trabalho de Hernandez *et al.*, (2016), a ativação metabólica dos neurônios magnocelulares vasopressinérgicos através da privação hídrica, demonstrou ser um fator fisiológico estressante que *per se* desencadeia uma resposta ansiogênica, avaliada pelo labirinto em cruz elevado. Através do método de *RNAscope*, estes autores mostraram que AVPR1a é altamente expresso na amígdala. Todavia, conforme supracitado nos resultados, não houve alterações na expressão de AVPR1a na amígdala, sugerindo que juntamente com os dados comportamentais aqui citados, é provável que após 48 horas de desidratação a AVP não atue tão proeminentemente quanto a OT após estímulo hiperosmótico.

Adicionalmente, condições de estresse geralmente criam alterações no balanço autonômico, aumentando o tônus simpático e diminuindo o tônus parassimpático (Sgoifo *et al.*, 1999). Neurônios parvocelulares do PVN enviam projeções para o tronco encefálico e medula ventrolateral rostral (Shafton *et al.*, 1998). Núcleos que regulam as funções parassimpáticas, como o núcleo motor dorsal do vago, núcleo ambíguo e NTS possuem receptores para OT (Porges, 1998; Higa *et al.*, 2002). A ativação de neurônios ocitocinérgicos aumenta o tônus parassimpático (Raggenbass *et al.*, 1987; Gamer e Büchel, 2012; Piñol *et al.*, 2014) reduzindo assim as características autonômicas da ansiedade (Davis e Whalen, 2001). Por fim, não observamos alterações na expressão de GAD67 e vGLUT2 neste núcleo, o que sugere não ter havido alterações significativas na transmissão glutamatérgica e GABAérgica. Além disso, é possível que outra isoforma responsável pelo transportador vesicular e pela descarboxilase do ácido glutâmico estejam funcionalmente ativas, participando desses processos, o que não foi analisado neste trabalho.

A ABL desempenha um importante papel na ansiedade, humanos que possuem transtorno de ansiedade mostram uma atividade anormal da ABL (Etkin *et al.*, 2009). Em contrapartida, nossos resultados não indicam nenhuma alteração significativa de OTR, AVPR1a, GAD67 e vGLUT na ABL. Interessantemente, estudos de Petrovich *et al.*, (2009) demonstraram que a ACe, mas não a ABL, é crítica para o controle da ingestão alimentar após estímulo aversivo. Esse estudo demonstra a autonomia dessas duas regiões em contextos comportamentais. Sendo assim, a inobservância de alterações em nenhum dos genes analisados nesse trabalho na ABL, pode representar essa autonomia dos núcleos da amígdala para processar informações específicas. Portanto, supomos que no contexto de estresse fisiológico, a participação da amígdala central é mais pronunciada do que a amígdala basolateral, provavelmente, estimulada pelo aumento da OT liberada centralmente atuando no seu receptor específico.

A habênula é uma estrutura altamente conservada no cérebro de diferentes espécies animais e fornece mecanismos fundamentais para a sobrevivência e a tomada de decisão. Pode ser dividida anatomicamente e funcionalmente em habênula lateral e habênula medial (Proulx *et al.*, 2014). De fato, o estresse induz a ativação de neurônios na habênula lateral (Hikosaka, 2010). Em relação aos nossos resultados, observamos um aumento da expressão gênica de vGLUT2 na habênula após privação hídrica por 48 horas. O vGLUT2 é considerado como um marcador da neurotransmissão glutamatérgica (Varoqui *et al.*, 2002), consequentemente um aumento nos níveis de vGLUT2 indica um possível aumento da atividade excitatória nesse núcleo.

Estudos do final da década de 70 já relatavam a presença de fibras ocitocinérgicas e vasopressinérgicas na habênula (Buijs *et al.*, 1978). A habênula possui dois núcleos distintos (HbM e HbL), sendo o maior e mais estudado o HbL (Ji e Shepard, 2007; Yang *et al.*, 2008; Hikosaka, 2010; Aizawa *et al.*, 2012). A HbL envia suas principais eferências para os núcleos

monoaminérgicos (ATV e núcleo dorsal da rafe), com efeitos principalmente inibitórios (Ji e Shepard, 2007). O trabalho recente de Hung *et al.*, (2017) sugere que a liberação de OT do PVN promove comportamentos pró-sociais através de efeitos diretos nos neurônios dopaminérgicos da ATV. Nesse sentido, a ação da OT na ATV é um fator chave nos circuitos de recompensa e também pode ser crítica para regular a interação social (Buffington *et al.*, 2016). A OT atua aumentando a atividade das células dopaminérgicas do ATV que se projetam para o núcleo *accumbens* e habênula (Hung *et al.*, 2017). Isso sugere um mecanismo pelo qual a OT liberada após estresse osmótico pode atuar na habênula. A participação da OT e da AVP na regulação de comportamentos análogos à ansiedade é amplamente descrita na literatura, contudo, pouco se sabe a respeito dos seus papéis na habênula. Em condições de desidratação, por isso maiores estudos são necessários, em última análise, também é importante delinear o papel do transporte vesicular de glutamato nessas áreas de projeção e nos processos relacionados ao comportamento análogo à ansiedade em ratos. Por fim, supomos que neurônios ocitocinérgicos desempenham papéis importantíssimos no contexto comportamental, reduzindo a ansiedade, seja de maneira direta ou indireta.

Esses dados em conjunto reforçam nossa hipótese de que a OT liberada pela hiperosmolalidade plasmática, mas não AVP, atua através da sua interação peptídeo-receptor na amígdala central, para promover a redução da ansiedade, proporcionando uma condição fisiológica mais adequada para busca da água e, conseqüente, restabelecimento do balanço de água e sódio. No mais, também sugerimos que, a privação hídrica é um estímulo mais potente do que a sobrecarga salina para gerar alterações comportamentais associadas a alterações do receptor de OTR, tendo em vista que, a privação hídrica aumenta a concentração plasmática de OT mais proeminente do que a sobrecarga salina (Greenwood *et al.*, 2015).

## 7 CONCLUSÕES

Os nossos resultados demonstram a importância do estresse hiperosmótico na modulação das respostas comportamentais, visto que, a hiperosmolalidade plasmática desencadeada pela sobrecarga salina e privação hídrica foi capaz de promover uma resposta claramente ansiolítica no LCE e no CCE. Além disso, nossos resultados indicam que a privação de água parece ser um estímulo mais potente que a sobrecarga salina para gerar mudanças na caixa claro e escuro e na expressão gênica de OTR e vGLUT2. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos modulatórios de estresse osmótico entre a privação hídrica e a sobrecarga salina nas respostas comportamentais e moleculares.

Portanto, tendo em vista os dados apresentados nesse trabalho, podemos concluir que possivelmente a OT liberada na amígdala central interagindo com o seu receptor medeia a redução de comportamentos análogos à ansiedade em ratos desidratados por 48 horas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADACHI, A.; NIIJIMA, A.; JACOBS, H. L. An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. **Am J Physiol**, v. 231, n. 4, p. 1043-9, Oct 1976.
- AIZAWA, H. et al. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. **J Comp Neurol**, v. 520, n. 18, p. 4051-66, Dec 2012.
- ALVAREZ-BOLADO, G. Development of neuroendocrine neurons in the mammalian hypothalamus. **Cell Tissue Res**, Jun 2018.
- ANDRADE, M. M. et al. Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, v. 78, n. 1, p. 125-33, Jan 2003.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, Jan 2004.
- ASADA, H. et al. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6496-9, Jun 1997.
- BALE, T. L. et al. CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. **J Neurosci**, v. 21, n. 7, p. 2546-52, Apr 2001.
- BARKER, D. J. et al. Brief light as a practical aversive stimulus for the albino rat. **Behav Brain Res**, v. 214, n. 2, p. 402-8, Dec 2010.
- BERRIDGE, K. C. Motivation concepts in behavioral neuroscience. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 179-209, Apr 2004.
- BLUME, A. et al. Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 1947-56, Apr 2008.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, Feb 2003.
- BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 519-31, Jul 2008.
- BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H.; RICHARD, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. **Front Neuroendocrinol**, v. 15, n. 3, p. 231-74, Sep 1994.

BRASZKO, J. J.; KUŁAKOWSKA, A.; WINNICKA, M. M. Effects of angiotensin II and its receptor antagonists on motor activity and anxiety in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 271-81, Jun 2003.

BRETHES, D. et al. Depolarization-induced Ca<sup>2+</sup> increase in isolated neurosecretory nerve terminals measured with fura-2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 5, p. 1439-43, Mar 1987.

BROWN, C. H. Magnocellular Neurons and Posterior Pituitary Function. **Compr Physiol**, v. 6, n. 4, p. 1701-1741, 09 2016.

BUFFINGTON, S. A. et al. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1762-1775, Jun 2016.

BUIJS, R. M. et al. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell Tissue Res**, v. 186, n. 3, p. 423-33, Jan 1978.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 122, n. 2, p. 169-74, Aug 2001.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behav Brain Res**, v. 85, n. 1, p. 27-35, Apr 1997.

CHWALBIŃSKA-MONETA, J. Role of hepatic portal osmoreception in the control of ADH release. **Am J Physiol**, v. 236, n. 6, p. E603-9, Jun 1979.

COELHO, M. S. et al. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 16, n. 2, p. 148-55, Mar 2006.

CORBANI, M. et al. Neuroanatomical distribution and function of the vasopressin V. **Gen Comp Endocrinol**, v. 258, p. 15-32, 03 2018.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 13, n. 2, p. 167-70, Aug 1980.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Mol Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 13-34, Jan 2001.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol Sci**, v. 16, n. 2, p. 33-6, Feb 1995.

DE LUCA, L. A. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav**, v. 100, n. 5, p. 535-44, Jul 2010.

DONALDSON, Z. R.; YOUNG, L. J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 900-4, Nov 2008.

DUMAIS, K. M.; VEENEMA, A. H. Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. **Front Neuroendocrinol**, v. 40, p. 1-23, Jan 2016.

ETKIN, A. et al. Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 12, p. 1361-72, Dec 2009.

FADOK, J. P. et al. New perspectives on central amygdala function. **Curr Opin Neurobiol**, v. 49, p. 141-147, Apr 2018.

FERGUSON, A. V.; LATCHFORD, K. J.; SAMSON, W. K. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. **Expert Opin Ther Targets**, v. 12, n. 6, p. 717-27, Jun 2008.

FUJIWARA, Y. et al. The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis: a review of studies on V1a receptor knockout mice. **Clin Exp Nephrol**, v. 16, n. 1, p. 30-4, Feb 2012.

GAMER, M.; BÜCHEL, C. Oxytocin specifically enhances valence-dependent parasympathetic responses. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 1, p. 87-93, Jan 2012.

GEERLING, J. C. et al. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. **J Comp Neurol**, v. 518, n. 9, p. 1460-99, May 2010.

GENN, R. F. et al. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 1-2, p. 155-61, 2003 Jan-Mar 2003.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 629-83, Apr 2001.

GIZOWSKI, C.; BOURQUE, C. W. The neural basis of homeostatic and anticipatory thirst. **Nat Rev Nephrol**, v. 14, n. 1, p. 11-25, Jan 2018. ISSN 1759-507X.

GREENWOOD, M. P. et al. A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 7, p. R559-68, Apr 2015.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 545-52, Jul 2004.

HAANWINCKEL, M. A. et al. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7902-6, Aug 1995.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 29, n. 3, p. 129-38, Jun 1993.

HERKENHAM, M.; NAUTA, W. J. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. **J Comp Neurol**, v. 187, n. 1, p. 19-47, Sep 1979.

HERNANDO, F. et al. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. **Endocrinology**, v. 142, n. 4, p. 1659-68, Apr 2001.

HERNÁNDEZ, V. S. et al. Hypothalamic Vasopressinergic Projections Innervate Central Amygdala GABAergic Neurons: Implications for Anxiety and Stress Coping. **Front Neural Circuits**, v. 10, p. 92, 2016.

HERZOG, E. et al. Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. **J Neurochem**, v. 99, n. 3, p. 1011-8, Nov 2006.

HIGA, K. T. et al. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R537-45, Feb 2002.

HIKOSAKA, O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 7, p. 503-13, Jul 2010.

HUBER, D.; VEINANTE, P.; STOOP, R. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. **Science**, v. 308, n. 5719, p. 245-8, Apr 2005.

HUNG, L. W. et al. Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1406-1411, 09 2017.

INOUE, K. et al. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 11, p. 1075-81, Jun 2004.

JACINTO, L. R. et al. The habenula as a critical node in chronic stress-related anxiety. **Exp Neurol**, v. 289, p. 46-54, 03 2017.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-92, Jan 2015.

JI, H.; SHEPARD, P. D. Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. **J Neurosci**, v. 27, n. 26, p. 6923-30, Jun 2007.

JOHNSON, A. K.; GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEB J**, v. 7, n. 8, p. 678-86, May 1993.

JUREK, B. et al. Differential contribution of hypothalamic MAPK activity to anxiety-like behaviour in virgin and lactating rats. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37060, 2012.

KATO, Y. et al. Distribution and developmental changes in vasopressin V2 receptor mRNA in rat brain. **Differentiation**, v. 59, n. 3, p. 163-9, Oct 1995.

KIMURA, T.; SAJI, F. Molecular Endocrinology of the oxytocin receptor. **Endocr J**, v. 42, n. 5, p. 607-15, Oct 1995.

KOSHIMIZU, T. A. et al. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. **Physiol Rev**, v. 92, n. 4, p. 1813-64, Oct 2012.

KRAUSE, E. G. et al. Hydration state controls stress responsiveness and social behavior. **J Neurosci**, v. 31, n. 14, p. 5470-6, Apr 2011.

LANDGRAF, R. et al. Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation. **Prog Brain Res**, v. 119, p. 201-20, 1998.

LANGE, M. D. et al. Glutamic acid decarboxylase 65: a link between GABAergic synaptic plasticity in the lateral amygdala and conditioned fear generalization. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 9, p. 2211-20, Aug 2014.

LAWSON, E. A. The effects of oxytocin on eating behaviour and metabolism in humans. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 12, p. 700-709, Dec 2017.

LEIB, D. E.; ZIMMERMAN, C. A.; KNIGHT, Z. A. Thirst. **Curr Biol**, v. 26, n. 24, p. R1260-R1265, Dec 2016.

LEPETIT, P. et al. Comparison of the effects of chronic water deprivation and hypertonic saline ingestion on cerebral protein synthesis in rats. **Brain Res**, v. 586, n. 2, p. 181-7, Jul 1992.

LINDEN, A. M. et al. Anxiolytic activity of the MGLU2/3 receptor agonist LY354740 on the elevated plus maze is associated with the suppression of stress-induced c-Fos in the hippocampus and increases in c-Fos induction in several other stress-sensitive brain regions. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 502-13, Mar 2004.

LUDWIG, M. et al. Systemic osmotic stimulation increases vasopressin and oxytocin release within the supraoptic nucleus. **J Neuroendocrinol**, v. 6, n. 4, p. 369-73, Aug 1994.

LUKAS, M.; NEUMANN, I. D. Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. **Behav Brain Res**, v. 251, p. 85-94, Aug 2013.

LÁSZLÓ, K. et al. Positive reinforcing effect of oxytocin microinjection in the rat central nucleus of amygdala. **Behav Brain Res**, v. 296, p. 279-285, Jan 2016.

MAK, P. et al. Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 4, p. 532-42, Apr 2012.

MARTÍNEZ, J. C. et al. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. **Behav Processes**, v. 60, n. 1, p. 15-26, Oct 2002.

MCBLANE, J. W.; HANDLEY, S. L. Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 116, n. 2, p. 173-82, Oct 1994.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 1-6, Feb 2004.

MECAWI, A. E. S. et al. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. **Compr Physiol**, v. 5, n. 3, p. 1465-516, Jul 2015.

MISSLIN, R.; BELZUNG, C.; VOGEL, E. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. **Behav Processes**, v. 18, n. 1-3, p. 119-32, 1989.

MIYATA, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. **Front Neurosci**, v. 9, p. 390, 2015.

MURPHY, C. A. et al. Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. **Behav Brain Res**, v. 81, n. 1-2, p. 43-52, Nov 1996.

NEUMANN, I. D.; LANDGRAF, R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 11, p. 649-59, Nov 2012.

NEUMANN, I. D.; SLATTERY, D. A. Oxytocin in General Anxiety and Social Fear: A Translational Approach. **Biol Psychiatry**, v. 79, n. 3, p. 213-21, Feb 2016.

PAN, Z. et al. The effects of sevoflurane anesthesia on rat hippocampus: a genomic expression analysis. **Brain Res**, v. 1381, p. 124-33, Mar 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5th. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2005.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

PETROVIC, P. et al. Oxytocin attenuates affective evaluations of conditioned faces and amygdala activity. **J Neurosci**, v. 28, n. 26, p. 6607-15, Jun 2008.

PETROVICH, G. D. et al. Central, but not basolateral, amygdala is critical for control of feeding by aversive learned cues. **J Neurosci**, v. 29, n. 48, p. 15205-12, Dec 2009.

PINAL, C. S.; TOBIN, A. J. Uniqueness and redundancy in GABA production. **Perspect Dev Neurobiol**, v. 5, n. 2-3, p. 109-18, 1998.

PIÑOL, R. A. et al. Visualization of oxytocin release that mediates paired pulse facilitation in hypothalamic pathways to brainstem autonomic neurons. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112138, 2014.

PORGES, S. W. Love: an emergent property of the mammalian autonomic nervous system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 8, p. 837-61, Nov 1998.

PROULX, C. D.; HIKOSAKA, O.; MALINOW, R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 9, p. 1146-52, Sep 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 2003.

RAGGENBASS, M. et al. Neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve are excited by oxytocin in the rat but not in the guinea pig. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 11, p. 3926-30, Jun 1987.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D. et al. Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test. **Physiol Behav**, v. 120, p. 130-5, Aug 2013.

REED, B. et al. Carbon dioxide-induced anesthesia results in a rapid increase in plasma levels of vasopressin. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2934-9, Jun 2009.

REVERSI, A.; CASSONI, P.; CHINI, B. Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 10, n. 3, p. 221-9, Jul 2005.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 801-10, Nov 1997.

SAAVEDRA, J. M. Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders. **Pharmacol Res**, v. 125, n. Pt A, p. 91-103, Nov 2017.

SAAVEDRA, J. M.; BENICKY, J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 185-93, Jun 2007.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 803-34, Jul 2003.

SAITO, M. et al. Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 212, n. 3, p. 751-7, Jul 1995.

SASAKI, S. et al. Water channels in the kidney collecting duct. **Kidney Int**, v. 48, n. 4, p. 1082-7, Oct 1995.

SASAKI, S.; ISHIBASHI, K.; MARUMO, F. Aquaporin-2 and -3: representatives of two subgroups of the aquaporin family colocalized in the kidney collecting duct. **Annu Rev Physiol**, v. 60, p. 199-220, 1998.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **J Comp Neurol**, v. 205, n. 3, p. 260-72, Mar 1982.

SGOIFO, A. et al. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 7, p. 915-23, Nov 1999.

SHAFTON, A. D.; RYAN, A.; BADOER, E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Res**, v. 801, n. 1-2, p. 239-43, Aug 1998.

SMITH, J. A. et al. Hydration and beyond: neuropeptides as mediators of hydromineral balance, anxiety and stress-responsiveness. **Front Syst Neurosci**, v. 9, p. 46, 2015.

\_\_\_\_\_. Acute hypernatremia promotes anxiolysis and attenuates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male mice. **Physiol Behav**, v. 136, p. 91-6, Sep 2014.

SOARES, T. J. et al. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 1, p. 278-83, Jan 1999.

SOGHOMONIAN, J. J.; MARTIN, D. L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **Trends Pharmacol Sci**, v. 19, n. 12, p. 500-5, Dec 1998.

SONG, Z.; ALBERS, H. E. Cross-talk among oxytocin and arginine-vasopressin receptors: Relevance for basic and clinical studies of the brain and periphery. **Front Neuroendocrinol**, Oct 2017.

STEPHENSON-JONES, M. et al. Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 3, p. E164-73, Jan 2012.

SWAAB, D. F.; NIJVELDT, F.; POOL, C. W. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. **J Endocrinol**, v. 67, n. 3, p. 461-2, Dec 1975.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. **Neuroendocrinology**, v. 31, n. 6, p. 410-7, Dec 1980.

TAKEI, Y. Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. **Jpn J Physiol**, v. 50, n. 2, p. 171-86, Apr 2000.

\_\_\_\_\_. From aquatic to terrestrial life: evolution of the mechanisms for water acquisition. **Zoolog Sci**, v. 32, n. 1, p. 1-7, Jan 2015.

TAKEI, Y.; OGOSHI, M.; INOUE, K. A 'reverse' phylogenetic approach for identification of novel osmoregulatory and cardiovascular hormones in vertebrates. **Front Neuroendocrinol**, v. 28, n. 4, p. 143-60, Oct 2007.

TASAN, R. O. et al. Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety. **Neuroscience**, v. 183, p. 71-80, Jun 2011.

THORNTON, S. N. Thirst and hydration: physiology and consequences of dysfunction. **Physiol Behav**, v. 100, n. 1, p. 15-21, Apr 2010.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 317-31, Jun 2015.

TRUITT, W. A. et al. Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. **Neuroscience**, v. 160, n. 2, p. 284-94, May 2009.

VAN DEN BURG, E. H. et al. Oxytocin Stimulates Extracellular Ca<sup>2+</sup> Influx Through TRPV2 Channels in Hypothalamic Neurons to Exert Its Anxiolytic Effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 13, p. 2938-47, Dec 2015.

VARGAS, K. J. et al. Postnatal expression of V2 vasopressin receptor splice variants in the rat cerebellum. **Differentiation**, v. 77, n. 4, p. 377-85, Apr 2009.

VAROQUI, H. et al. Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. **J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 142-55, Jan 2002.

VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, n. 4, p. 471-503, Dec 2003.

WALKER, J. E. Glutamate, GABA, and CNS disease: a review. **Neurochem Res**, v. 8, n. 4, p. 521-50, Apr 1983.

YANG, L. M. et al. Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. **Behav Brain Res**, v. 188, n. 1, p. 84-90, Mar 2008.

YOUNG, W. S.; GAINER, H. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. **Neuroendocrinology**, v. 78, n. 4, p. 185-203, Oct 2003.

ZHANG, L. et al. Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? **Front Neural Circuits**, v. 10, p. 13, 2016.

ZINGG, H. H. Vasopressin and oxytocin receptors. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v. 10, n. 1, p. 75-96, Jan 1996.

ZOICAS, I.; SLATTERY, D. A.; NEUMANN, I. D. Brain oxytocin in social fear conditioning and its extinction: involvement of the lateral septum. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 13, p. 3027-35, Dec 2014.

## 9 ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/ICBS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Papel da vasopressina na gênese dos comportamentais análogos a ansiedade após protocolos que desafiam o equilíbrio hidroeletrólítico.” protocolo CEUA nº 001/2017 processo nº 23083.10034/2017-91 sob responsabilidade de André de Souza Mecawi que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-ICBS-UFRRJ)**, em reunião realizada no dia 18 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	18.04.2018 a 18.04.2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> (linhagem Wistar)
Peso/idade	250-300g/-90 dias
No. De animais	288
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICBS/UFRRJ

We certify that the protocol CEUA no. 001/2017, entitled “**The role of vasopressin in the genesis of behavioral anxiety analogues after protocols that challenge the hydroelectrolytic balance**” is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Nacional Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Institute of Biological Sciences and Health of Federal Rural University of Rio de Janeiro in 18 of April of 2018.

  
Antonia Kezia França Moita Costa  
Coordenador CEUA-ICBS-UFRRJ

Antonia Kezia França Moita Costa  
Professor DG/ICBS/UFRRJ  
SIAPE: 1746583