



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

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE
MEDIANTE DESAFIOS À HOMEOSTASE HIDROELETROLÍTICA E
ENERGÉTICA**

LÍVIA DA ROCHA NATALINO MONTEIRO

Sob a Orientação do Professor

André de Souza Mecawi

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no curso de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2021

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

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

M772a Monteiro, Livia da Rocha Natalino , 1991-
Análise do transcriptoma do núcleo dorsal da rafe
mediante desafios à homeostase hidroeletrólítica e
energética / Livia da Rocha Natalino Monteiro. -
Seropédica, 2021.
105 f.: il.

Orientador: André de Souza Mecawi.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, 2021.

1. Transcriptoma. 2. Núcleo dorsal da rafe. 3.
Apetite ao sódio. 4. Privação alimentar. I. Mecawi,
André de Souza, 1985-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciências Fisiológicas III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE



TERMO Nº 480/2022 - ICBS (12.28.01.22)

Nº do Protocolo: 23083.028666/2022-79

Seropédica-RJ, 10 de maio de 2022.

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

LIVIA DA ROCHA NATALINO MONTEIRO

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

TESE APROVADA EM 24/02/2021

Membros da Banca:

Prof Dr André de Souza Mecawi (Membro Interno ao Programa - UNIFESP)

Prof Dr Hélio Zangrossi Júnior, (Membro Externo - USP-FMRP)

Prof Dr David do Carmo Malvar (Membro Interno - Coordenador - UFRRJ)

Prof Drª Silvia Graciela Ruginsk Leitão (Membro Externo - UNIFAL)

Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno - UFRRJ)

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 11/05/2022 13:28)
DAVID DO CARMO MALVAR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: 3000663

(Assinado digitalmente em 13/05/2022 11:34)
WELLINGTON DA SILVA CORTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: 386960

(Assinado digitalmente em 10/05/2022 14:15)

SILVIA GRACIELA RUGINSK LEITÃO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 300.614.798-70

(Assinado digitalmente em 24/05/2022 14:47)

HELIO ZANGROSSI JUNIOR

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 067.835.868-04

(Assinado digitalmente em 10/05/2022 10:08)

ANDRE DE SOUZA MECAWI

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 103.378.127-48

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número:
480, ano: 2022, tipo: TERMO, data de emissão: 10/05/2022 e o código de verificação: 6de474067a

DEDICATÓRIA

A João Carlos da Rocha (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus pais, Rita de Cássia e Carlos José por sempre terem apoiado meus estudos e nunca questionarem minhas escolhas. Sou muito grata por terem me ensinado a valorizar sempre a educação como valor essencial ao meu desenvolvimento humano. Aos meus irmãos, Vitor e Gabriel e familiares que fizeram parte de todo esse processo, mesmo que muitas vezes de longe, em especial ao meu padrinho João Carlos da Rocha, cuja perda precoce nos abalou profundamente. Tudo que sou hoje, devo a vocês, obrigada!

Um agradecimento especial ao meu orientador André de Souza Mecawi, por toda a paciência nesse longo processo que acabou demorando mais do que esperávamos. Ainda tenho dificuldade em acompanhar seu ritmo acelerado, mas eu juro que tento. As suas ideias e perspectivas foram essenciais para eu ter chegado até aqui.

O meu muito obrigada também ao querido mestre Luís Carlos Reis que sempre nos enriquece com suas conversas sobre fisiologia e tantos outros temas científicos ou não. O senhor é uma inspiração como cientista e ser humano.

A todo corpo docente e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da Rural, foram muitos anos de convivência que já estão deixando saudade. Meu agradecimento especial aos mestres Wellington Côrtes, Bruno Marinho e Fábio Rocha por todas as dicas preciosas durante meu estágio em docência na área de farmacologia.

Aos colegas e amigos do DCFis pelas ajudas nos experimentos em cima da hora, pelas conversas divertidas na hora do café e pela companhia durante as horas extras quando a Rural fica um pouco assustadora. Obrigada Bruno, Raquel, Raoni, Vivi, Evandro, Verônica, e Sabrina por terem tornado mais leves até os momentos mais difíceis. Obrigada também aos alunos de iniciação científica Carolina, Rafaela, Milena e Vitor por todo entusiasmo em aprender e por me ajudar a lembrar como é bom compartilhar conhecimento.

Agradeço também ao meu orientador, André Mecawi e ao mestre Luís por terem viabilizado meu estágio em Bristol para a realização dos *punches* e transcriptomas, sem seus esforços esse trabalho não teria acontecido. Obrigada ao Professor David Murphy por me receber em seu laboratório e ao amigo Alex Patterson por ter me ajudado na adaptação e por sua participação nas análises bioinformáticas. Agradeço também ao pesquisador Mike Greenwood por ter me ensinado alguns detalhes essenciais à técnica de PCR e pelo excelente tour pela cidade de Bristol que me ajudou a me sentir um pouco mais em casa.

Um agradecimento especial ao amigo Nicola Vuolo, cuja amizade me ajudou a suportar os dias mais difíceis longe de casa. Você é sem dúvida uma das melhores pessoas que já conheci, e uma das mais loucas (no bom sentido...rs).

Por fim, mas não menos importante meu muito obrigada ao meu namorado, Xavier Cauzard por ter me apoiado durante todo esse processo, primeiro como amigo, e agora como companheiro. Obrigada por ter me acalmado sempre que o desespero bateu e por não ter me deixado desistir quando achei que não era capaz.

Meu muitíssimo obrigada a cada um de vocês que direta ou indiretamente ajudou a moldar o ser humano que escreve esse agradecimento hoje.

“Le temps n'est jamais perdu quand il est partagé”

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos." Marie Curie

RESUMO

MONTEIRO, Livia da Rocha Natalino. **ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE MEDIANTE DESAFIOS À HOMEOSTASE HIDROELETROLÍTICA E ENERGÉTICA**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O íon sódio figura como elemento chave na regulação do balanço hidroeletrolítico, de forma que seus níveis devem ser mantidos numa estreita faixa compatível com a vida. Para tal regulação, uma série de mecanismos renais, endócrinos e comportamentais são acionados. O núcleo dorsal da rafe (DRN) tem sido implicado como um importante núcleo encefálico para a modulação do comportamento alimentar, em especial, do apetite específico ao sódio. Neste trabalho nós investigamos as alterações transcricionais do DRN em resposta a diferentes desafios à homeostase hidromineral e energética. Ratos Wistar com cerca de 60 dias de vida foram randomicamente separados em cinco grupos experimentais: a) controle (CTRL); b) dieta pobre em sódio (DP); c) furosemida (FURO); d) sobrecarga salina (SS); e) privação alimentar. Após quatro dias de tratamento ou 48 horas de privação alimentar foi feita eutanásia para coleta de sangue e encéfalos. Os animais submetidos ao tratamento com a furosemida na água de beber e à sobrecarga salina (NaCl 0,3M) apresentaram aumento significativo no hematócrito (FURO 10,5%; SL 12,5%) e redução (FURO -2,3%) e aumento (SL 13,6%) na concentração plasmática de sódio, respectivamente, sem alteração dos níveis plasmáticos de potássio. O grupo submetido à dieta pobre não apresentou qualquer alteração significativa nos parâmetros analisados. Já os animais submetidos à privação alimentar apresentaram aumento do hematócrito (13%) e redução do peso corporal (12,9%). O sequenciamento de RNA do DRN revelou a expressão de aproximadamente 18.600 transcritos. Dentre os genes mais expressos neste núcleo foram identificados os mRNAs que codificam a triptofano hidroxilase 2 (*Tph2*), transportador de serotonina SERT (*Slc6a4*) e o transportador vesicular de monoaminas (*Slc18a2*), confirmando a prevalência de neurônios serotoninérgicos. A comparação dos genes diferencialmente expressos entre os grupos experimentais revelou uma alteração significativamente baixa no grupo FURO (6 genes), nenhum gene alterado no grupo DP, e 22 genes alterados pela SS. Entre os 22 genes alterados no transcriptoma, selecionamos 10 alvos para o RT-qPCR, dentre os quais, 7 genes foram validados com sucesso. Por fim, o sequenciamento do grupo submetido à privação alimentar demonstrou 108 genes significativamente alterados. Ao comparar este resultado ao modelo de SS observamos que os grupos apresentaram 6 genes comumente alterados (*C3*, *Etnppl*, *Gjb6*, *RT1-T24-4*, *Slc35d3* e *Sult1a1*). Apesar da necessidade de validar os resultados da privação alimentar por RT-qPCR, estes dados indicam uma possível convergência entre mecanismos moleculares no DRN para regulação do apetite ao sódio e o comportamento alimentar.

Palavras-chave: Transcriptoma. Núcleo dorsal da rafe. Apetite ao sódio. Pivação alimentar.

ABSTRACT

MONTEIRO, Livia da Rocha Natalino. ANALYSIS OF THE DORSAL RAPE NUCLEUS TRANSCRIPTOME AFTER CHALLENGES TO HYDROELECTROLYTIC AND ENERGY HOMEOSTASIS. 2021. Thesis (PhD in Physiological Sciences. Institute of Biological and Health Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The sodium ion is as a key element in the regulation of the hydroelectrolytic balance, so that its levels must be kept in a narrow range compatible with life. For such regulation, a series of renal, endocrine, and behavioural mechanisms are activated. The dorsal raphe nucleus (DRN) has been implicated as an important brain nucleus involved in the modulation of food-intake behaviour, especially sodium-specific appetite. In this work we investigate the transcriptomic changes in the DRN after challenges to hydroelectrolytic and energy homeostasis. Male Wistar rats, approximately 60 days old, were randomly separated into five experimental groups: a) control (CTRL); b) low sodium diet (LS); c) furosemide (FURO); d) salt loading (SL); and (e) food deprivation for 48 hours. After the experimental period, euthanasia was performed to collect blood and brain. Animals submitted to treatment with furosemide and saline overload showed a significant increase in hematocrit (FURO 12.4%, SL 14.9%) and reduction (FURO 1.25%) and increase in plasma sodium (SL 13%), respectively. Animals subjected to food deprivation showed an increase in hematocrit (13%) and a reduction in body weight (12.9%). The DRN RNA sequencing resulted in approximately 18,600 genes mapped in total. Among the most expressed genes, tryptophan hydroxylase isoform 2 (*Tph2*), the gene encoding the serotonin transporter SERT (*Slc6a4*) and the vesicular monoamine transporter (*Slc18a2*) were found, confirming the prevalence of serotonergic neurons. The comparison of differentially expressed genes using the Venn diagram revealed a low altered number in the FURO group (6 genes), no altered genes in the DP group and 22 genes altered by saline overload. Based on the results, we performed the RT-qPCR validation only for the saline overload group. Among the 22 altered genes in the transcriptome, we selected 10 targets for RT-qPCR, among which, 7 genes were successfully validated. Finally, the sequencing of the group subjected to food deprivation revealed 108 altered genes, when comparing this result to that obtained in salt loading, we saw that the groups have 6 altered genes in common (*C3*, *Etnppl*, *Gjb6*, *RT1-T24-4*, *Slc35d3* e *Sult1a1*). Despite the need to validate the results of food deprivation, they indicate a possible overlap in the level of DRN between mechanisms that regulate specific sodium appetite and eating behaviour.

Keywords: Transcriptome. Dorsal raphe nucleus. Sodium appetite. Food deprivation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da ingestão de fluidos, volume urinário e alterações cardiovasculares em animais submetidos à dieta pobre em sódio, furosemida na água de beber e sobrecarga salina. O grupo controle (**CTRL**) teve livre acesso à ração normossódica (0,4% Na⁺), água filtrada e solução de NaCl 1,8% (0,3 M). O grupo dieta pobre (**LS**) foi alimentado com ração hipossódica (0,03% Na⁺) e água destilada durante 4 dias, com a intenção de induzir o apetite ao sódio. Os animais do grupo furosemida (**FURO**) receberam ração hipossódica (0,03% Na⁺) e água destilada com furosemida (0,3mg/mL) durante 4 dias, com o objetivo de induzir o apetite ao sódio e hiponatremia. O último grupo, foi submetido à **sobrecarga salina (SL)**, com livre acesso à ração normossódica (0,4% Na⁺) e solução de NaCl 1,8% durante 4 dias, com o objetivo de induzir a hipernatremia. Ingestão cumulativa de água (A) e de salina (B) após teste de livre escolha e índice de preferência pelo sódio (C). Em (D) o volume urinário cumulativo nos tempos de 2h e 4h após o início do teste de livre escolha. Por último, os resultados de pressão arterial média (E) e frequência cardíaca (F) durante teste do barorreflexo. 19

Figura 2. Ilustração representativa de corte sagital do encéfalo do rato representando os núcleos e circuitos neurais relacionados à regulação do equilíbrio hidroeletrólítico. (adaptado de MECAWI et al., 2015). ANG II – angiotensina II, ANP – peptídeo natriurético atrial, AVP – arginina vasopressina, OXT – ocitocina, OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal, MnPO – núcleo pré-óptico mediano, SFO – órgão subfornical. PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo, SON – núcleo supraóptico, LPBN – núcleo parabraquial lateral, DRN – núcleo dorsal da rafe, AP – área postrema, NTS – núcleo do trato solitário, CVLM – bulbo ventrolateral caudal, RVLM – bulbo ventrolateral rostral, ac – comissura anterior, oc – quiasma óptico..... 20

Figura 3. Ilustração mostrando a distribuição topográfica dos grupos celulares B em roedores e primatas. (A) Distribuição esquemática dos grupos celulares de acordo com sua origem ontológica em vista sagital. (B) Secções coronais sequenciais de encéfalo de camundongo P7, onde os neurônios 5-HT foram geneticamente marcados com GFP; (C) Expressão do gene TPH2 no encéfalo de primata em cortes coronais, marcados por hibridização in situ. Imagem retirada de (SOIZA-REILLY; GASPAR, 2020). Isth – istmo; B1 a B9 – nomenclatura dos grupamentos serotoninérgicos de acordo com a localização topográfica; R1 a R9 – nomenclatura correspondente à divisão em rombômeros; B7d – grupo B7 porção dorsal; B7v – grupo B7 porção ventral..... 23

Figura 4. Affymetrix 230 2.0. GeneChips de rato foram confrontados com RNAm extraído do SON de ratos normo-hidratados, submetidos à privação hídrica por 72 horas (WD- water deprivation) ou à sobrecarga salina com solução de NaCl, 2% p/v (SL- salt loading). (A) 9.843 genes foram significativamente regulados, dos quais 1.108 (B) foram regulados mais do que duas vezes (>2 vezes).(GREENWOOD et al., 2015b)..... 26

Figura 5. Corte coronal de encéfalo de rato mostrando a área aproximada do punch. A imagem do corte coronal foi retirada do Atlas estereotático de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2004) e adaptada para ilustrar a área aproximada do punch (círculo vermelho)..... 32

Figura 6. Figura ilustrativa do processo completo para obtenção do sequenciamento de RNA. Estão listados os principais passos para o estudo do RNA-seq em tecidos encefálicos. DE:

diferencialmente expresso; KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Fonte: (WU et al., 2017).....33

Figura 7. Gráficos representativos dos valores individuais de Ct dos genes candidatos a controles endógenos. Em (A) valores individuais de Ct para o gene Actb. Em (B) os valores individuais de Ct de Rpl19 e em (C) os valores individuais para o gene Gapdh. Não foram observadas diferenças significativas no teste t de Student.36

Figura 8. Parâmetros plasmáticos em animais submetidos à dieta pobre em sódio, furosemida na água de beber e sobrecarga salina durante quatro dias. Resultados do hematócrito (A), osmolalidade plasmática (B), sódio (C) e potássio (D) plasmáticos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. *P<0,05 vs. CTRL.....38

Figura 9. Principais genes expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. Em (A), podem ser identificados entre os dez alvos mais expressos, receptores do sistema GABAérgico (Gabbr1 e Gabbr2), receptores da classe de Adesão (Adgr11, Adgr1 e Adgr2) provavelmente envolvidos na interação celular. Ainda em (A) pode-se verificar o gene que codifica o receptor serotoninérgico 5-HT2c (Htr2c) e o gene (Adcyap1r1) que codifica o receptor para os peptídeos PACAP-27 e PACAP-38. Em (B) os principais canais iônicos e outros canais que não possuem classificação específica pela IUPHAR, o gene que codifica a aquaporina 4 (Aqp4) é o mais expresso no DRN, este canal é altamente expresso no encéfalo, onde parece ser relevante para uma adequada homeostase dos fluidos cefalorraquidiano e intersticial. Outros genes em destaque em (B) são o que codifica a subunidade alfa do receptor para GABA (Gabra1), os de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Grin1, Gria2 e Gria4) e os canais para sódio ativados por voltagem (Scn3b e Scn2a). Em (C) os genes de receptores catalíticos, com destaque para o gene do receptor neurotrófico de tirosina quinase ativado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Em (D) o gene Psap codifica uma pré proteína altamente conservada e que está envolvida no catabolismo lipídico no encéfalo; já o gene Calm1 codifica a calmodulina, envolvida na modulação de diversas enzimas, canais e outras proteínas importantes para a sinalização celular.39

Figura 10. Principais genes de transportadores expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. O primeiro e terceiro genes mais expressos (Mt-atp6, Mt-atp8) codificam enzimas ATP sintases presentes na membrana mitocondrial e pertencentes à família de ATPase/ATP sintase do tipo F. Estão presentes ainda entre os mais expressos, genes que codificam subunidades de ATPases do tipo P (Atp1a3, Atp1a2) pertencentes à subfamília das Na⁺/K⁺ -ATPases40

Figura 11. Principais genes de enzimas kinases expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. No topo da lista, o gene que codifica a subunidade beta da enzima quinase dependente de cálcio/calmodulina (Camk2) e está relacionada à plasticidade neuronal, formação de sinapses e espinhos dendríticos. O produto do gene Dclk1, segundo no ranking, tem a capacidade de se ligar aos microtúbulos, estimulando sua polimerização.41

Figura 12. Principais genes que codificam outras enzimas expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. O gene de enzima mais expresso na lista é o da Tph2, alvo que caracteriza neurônios serotoninérgicos por ser altamente expressas nestas células. O gene Tph2 é a

forma predominante no SNC, enquanto o gene que codifica a Tph1 é a predominante no sistema periférico.42

Figura 13. Principais fatores de transcrição expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com Lambert e colaboradores (2018). Os fatores de transcrição têm ganhado destaque nos anos recentes por sua capacidade em estimular ou inibir a transcrição de outros genes. O gene Peg3 no topo da lista está envolvido em uma via de apoptose neuronal que é ativada por danos ao DNA, sendo portanto muito importante no SNC. O gene Thra é o segundo mais expresso e codifica o receptor alfa para hormônio tireoidiano, a proteína expressa tem a capacidade de se ligar ao DNA e inibir ou promover a transcrição gênica.43

Figura 14. Diagrama de Venn mostrando a comparação entre os genes alterados nos grupos de animais submetidos à dieta pobre, à furosemida na água de beber e à sobrecarga salina. Um total de 22 genes foram alterados pela sobrecarga salina, 6 genes alterados pelo tratamento com a furosemida e nenhum gene alterado pela dieta pobre em sódio. Este gráfico foi gerado através da plataforma GeneVenn (<http://genevenn.sourceforge.net/>).44

Figura 15. Mapa de calor mostrando os genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina. Com base no valor de p ajustado $<0,05$ determinamos 22 alvos diferencialmente expressos no DRN. Dentre eles, 13 apresentaram aumento em sua expressão e 9 apresentaram redução da expressão.45

Figura 16. Resultados de RT-qPCR contendo os alvos que caracterizam o sistema 5-HT do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Em (A) e (B) são mostrados os níveis de expressão de mRNA de Tph2 detectados por RT-qPCR e pelo RNAseq, respectivamente. Nos gráficos (C) e (D) estão os níveis de expressão do gene Slc6a4 que codifica o transportador 5-HTT/SERT. Em seguida encontram-se os resultados do RT-qPCR (E) e RNAseq (F) do gene Htr1a que codifica o receptor para serotonina 5-HT1a. Em (G) e (H) observamos os níveis do gene Htr2c obtidos por RNAseq e RT-qPCR, respectivamente.46

Figura 17. validação dos genes Sult1a1, Arc e Kcnip3 suprarregulados no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Em (A) a validação por RT-qPCR do gene Sult1a1 (SL $2,30 \pm 0,70$ vs CTRL $1,02 \pm 0,25$) e em (B) os valores obtidos pelo RNAseq. Em (C), a validação do gene Arc (SL $1,82 \pm 0,85$ vs CTRL $0,89 \pm 0,16$) e em (D) o resultado do RNAseq. Em (E) o resultado de RT-qPCR do gene Kcnip3 (SL $1,45 \pm 0,41$ vs CTRL $1,03 \pm 0,27$) e em (F) os valores do RNAseq. Os resultados de RNAseq estão na coluna da esquerda. Na coluna da direita, gráficos que ilustram as mudanças detectadas pelo RT-qPCR. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. * $P < 0,05$47

Figura 18. Validação dos genes Ctgf e Etnppl suprarregulados no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Em (A) o resultado da RT-qPCR para Ctgf (SL $2,46 \pm 0,74$ vs CTRL $1,01 \pm 0,27$) confirmando sua suprarregulação detectada pelo RNAseq (B). Em (C) a validação do aumento da expressão do gene Etnppl pela RT-qPCR (SL $1,55 \pm 0,38$ vs. CTRL $0,95 \pm 0,22$) e Ctgf e em (D) os resultados obtidos pelo sequenciamento. Em (E) a validação do gene Htr2a por RT-qPCR (SL $1,28 \pm 0,22$ vs CTRL $1,03 \pm 0,18$) e em (F) os resultados do RNAseq. Na coluna da esquerda estão os resultados do RNAseq e na direita, gráficos que ilustram as mudanças detectadas pelo

RT qPCR. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. $P < 0,05$49

Figura 19. Validação dos genes C3, Il3ra, Slc35d3 e Fam71e1 alterados no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Na coluna da esquerda, gráficos que ilustram as mudanças detectadas pelo RNAseq. Na coluna da direita os resultados da RT-qPCR, onde somente o gene C3 foi validado com sucesso (SL $0,82 \pm 0,16$ vs. CTRL $1,00 \pm 0,14$). O restante dos alvos infraregulados no RNAseq (Il3ra, Fam71e1 e Slc35d3) não foram alterados pela sobrecarga segundo validação por RT-qPCR. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. $*P < 0,05$50

Figura 20. Parâmetros plasmáticos em animais submetidos à privação alimentar por 48h. Resultados do hematócrito (A), osmolalidade plasmática (B), sódio plasmático (C). O gráfico (D) mostra a variação de peso corporal dos animais durante o período de privação alimentar redução do peso corporal em 24h (FD $-12,8 \pm 6$ vs. CTRL $9,7 \pm 1,3$) e 48h (FD $-37,8 \pm 4,4$ vs. CTRL $23,1 \pm 3,8$). O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. $*P < 0,05$51

Figura 21. Diagrama de Venn mostrando a comparação entre os genes alterados nos grupos de animais submetidos à privação alimentar por 48h e à sobrecarga salina e níveis de expressão dos genes no RNAseq. Em A diagrama de Venn indicando que o grupo submetido à privação alimentar apresentou alteração na expressão de 108 genes no total, destes, 6 genes também foram alterados pela sobrecarga salina. O grupo SL apresentou um total de 22 genes alterados no RNAseq. Em (B e C) as contagens normalizadas obtidas pelo RNAseq indicando a alteração dos genes em resposta à privação alimentar por 48h e à sobrecarga salina.52

Figura 22. Mapa de calor mostrando os genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à privação alimentar por 48h. O código de cores revela os diferentes níveis de expressão dos genes alterados, o vermelho representa os genes que tiveram sua expressão aumentada e o azul representa os genes que tiveram sua expressão diminuída.55

Figura 23. Análise de enriquecimento de componente celular, mostrando as principais regiões celulares identificadas na lista de genes. Os genes que apresentaram maior enriquecimento correspondem a componentes de astrócitos, sendo eles Aqp4, Atp1b2 e Gfap (tabela 3 nos anexos). Imagem obtida através da plataforma GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>).55

Figura 24. Valores de expressão obtidos pelo RNAseq dos alvos identificados pela análise de enriquecimento de componente celular. Os genes Aqp4 (FD 7.762 ± 935 vs. CTRL 10.198 ± 988), Atp1b2 (FD 6.234 ± 97 vs. CTRL 7.636 ± 66) e Gfap (FD 3.213 ± 518 vs. CTRL 6.700 ± 1214) foram identificados como componentes astrocitários alterados no RNAseq (descrição na tabela 3 nos anexos). $*P < 0,05$56

FIGURAS DO APÊNDICE

Figura 25. Expressão de mRNA dos principais GPCRs presentes no DRN.....	74
Figura 26. Expressão de mRNA dos principais GPCRs presentes no DRN.....	75
Figura 27. Expressão de mRNA dos principais canais iônicos presentes no DRN.	76
Figura 28. Expressão de mRNA dos principais canais iônicos presentes no DRN.	77
Figura 29. Expressão de mRNA dos principais receptores nucleares presentes no DRN.....	78
Figura 30. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.	79
Figura 31. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.	80
Figura 32. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.	81
Figura 33. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.	82
Figura 34. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.	83
Figura 35. Expressão de mRNA dos principais receptores catalíticos presentes no DRN.	84
Figura 36. Expressão de mRNA dos principais receptores catalíticos presentes no DRN.	85
Figura 37. Expressão de mRNA dos transportadores das famílias ABC e ATPases do tipo F e V presentes no DRN.....	86
Figura 38. Expressão de mRNA dos transportadores das famílias ABC e ATPase do tipo P, e transportadores SLC de 1 a 9, pertencentes à superfamília SLC.....	87
Figura 39. Expressão de mRNA dos transportadores pertencentes à superfamília SLC.	88
Figura 40. Expressão de mRNA dos transportadores pertencentes à superfamília SLC.	89
Figura 41. Expressão de mRNA dos transportadores pertencentes à superfamília SLC.	90

Figura 42. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	91
Figura 43. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	92
Figura 44. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	93
Figura 45. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	94
Figura 46. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	95
Figura 47. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	96
Figura 48. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.....	97
Figura 49. Expressão de mRNA de peptídeos endógenos presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.	98
Figura 50. Expressão de mRNA de peptídeos endógenos presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.	99

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sequências dos primers selecionados para a RT-qPCR e valores das eficiências obtidas.** Os nomes de todos os genes selecionados estão na coluna da esquerda, seguidos pelas sequências dos pares de iniciadores no sentido 5'-3'. As eficiências obtidas estão escritas em porcentagem.....35
- Tabela 2. Valores de média e desvio padrão dos genes candidatos a controles endógenos.36**
- Tabela 3. Descrição dos genes alterados tanto na sobrecarga salina quanto na privação alimentar por 48h.52**

TABELAS DO APÊNDICE

- Tabela 4. Tabela. contendo os valores de leitura dos alvos diferencialmente expressos no grupo furosemida.** ID Gene – símbolo do gene, ID Ensembl – código de identificação do banco de dados Ensembl, Média de bases – média de valores obtidos nos grupos controle e furosemida, Estimativa – grau da mudança de expressão estimada, DP – desvio padrão, P. adj. – valor de P ajustado..... 100
- Tabela 5. Descrição dos valores de leitura dos alvos diferencialmente expressos no grupo submetido à sobrecarga salina.** ID Gene – símbolo do gene, ID Ensembl – código de identificação do banco de dados Ensembl, Média de bases – média de valores obtidos nos grupos controle e sobrecarga salina, Estimativa – grau da mudança de expressão estimada, DP – desvio padrão, P. adj. – valor de P ajustado. 101
- Tabela 6. Descrição dos valores de leitura dos alvos diferencialmente expressos no grupo submetido à privação alimentar por 48h.** ID Gene – símbolo do gene, ID Ensembl – código de identificação do banco de dados Ensembl, Média de bases – média de valores obtidos nos grupos controle e privação alimentar, Estimativa – grau da mudança de expressão estimada, DP – desvio padrão, P. adj. – valor de P ajustado. 102
- Tabela 7. Descrição dos valores obtidos na análise de enriquecimento de componentes celulares do grupo submetido à privação alimentar por 48h..... 105**

LISTAS DE ABREVIACOES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT_{2a}	Receptor para serotonina do tipo 2a
5-HTT	Transportador de serotonina (<i>5-HT Transporter</i>)
ANG II	Angiotensina II
ATP	Adenosina trifosfato
AV3V	Porção anteroventral do terceiro ventrículo
AVP	Arginina vasopressina
BHE	Barreira hematoencefálica
DRN	Núcleo Dorsal da Rafe
FD	Privação alimentar (<i>food deprivation</i>)
FURO	Furosemida
LEC	Líquido extracelular
LIC	Líquido intracelular
LS	Dieta pobre em sódio (<i>low salt diet</i>)
MnPO	Núcleo pr-óptico mediano
OCVs	rgos circunventriculares
OVLT	rgo vasculoso da lâmina terminal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SL	Sobrecarga salina (<i>salt loading</i>)
SFO	rgo Subfornical
SON	Núcleo supraóptico
SNC	Sistema Nervoso Central
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
TRPV	Transient receptor potential vanilloid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.2 Sede e Apetite ao Sódio	19
1.2 O Sistema Serotonérgico e o Núcleo Dorsal da Rafe	22
1.3 Controle do Comportamento Alimentar e o Sistema Serotonérgico.....	24
1.4 Em Busca das Bases Moleculares da Sede, da Fome e do Apetite ao Sódio.....	25
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Apreciação Bioética da Experimentação Animal.....	30
4.2 Grupos Experimentais.....	30
4.3 Protocolos.....	30
4.4 Obtenção do Hematócrito.....	31
4.5 Avaliação da Osmolalidade e Sódio Plasmático.....	31
4.6 <i>Punch</i> e Processamento dos Tecidos para Construção do Transcriptoma	31
4.7 Análise do Transcriptoma do DRN pelo RNAseq	32
4.8 Análises Bioinformáticas.....	33
4.9 Procedimentos para Extração do RNA e Síntese de cDNA para RT-qPCR	34
4.9.1 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	34
4.8 Análise estatística	37
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO.....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9 APÊNDICE	74

1 INTRODUÇÃO

Desde que as primeiras formas de vida surgiram em nosso planeta, a capacidade de manejar o transporte de íons e água contribuiu sobremaneira para a adaptação e sucesso evolutivo das espécies nos mais diversos ambientes da Terra. Algumas teorias defendem que as primeiras células teriam surgido em ambientes ricos em potássio, o que explicaria, ao menos em parte, a alta concentração intracelular deste íon. Inicialmente, a membrana celular seria altamente permeável a pequenas moléculas, tornando-se mais impermeável de acordo com as mudanças ambientais ao longo do processo evolutivo. Nos organismos pluricelulares existe marcada diferença entre as composições dos líquidos dos compartimentos intra (LIC) e extracelular (LEC), sendo o primeiro abundante em potássio e o segundo, majoritariamente constituído por íons sódio (Na^+) e os ânions cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-). Estes três íons são os principais responsáveis por determinar a osmolalidade do plasma. Entretanto, o transporte ativo de Na^+ e sua abundância no LEC, tornam este íon o principal responsável pela determinação de gradientes osmóticos, e conseqüente movimentação de água entre os diferentes compartimentos corporais. A água é uma molécula essencial para a manutenção da vida, sendo considerada o “solvente universal”. Assim, o apropriado balanço do conteúdo corporal de água e sódio em animais terrestres, a despeito das perdas acentuadas por evapotranspiração e/ou excreção urinária, é essencial para a vida em terra. Daí, a relevância do gradiente osmótico criado pelos íons Na^+ , figurando como elemento central no balanço hidromineral.

Além de seu papel no balanço hidroeletrolítico, o sódio relaciona-se virtualmente com todas as funções essenciais à vida, desde o transporte de substâncias - como a glicose - através da membrana plasmática até a propagação de potenciais de ação, devido à energia acumulada por seu gradiente eletroquímico. Neste contexto, ressalta-se a ação da Sódio-Potássio-Adenosina-Trifosfatase (Na^+/K^+ -ATPase), que bombeia íons sódio para fora das células em troca de íons potássio para dentro na proporção de 3:2 Na^+/K^+ . Como conseqüência, a concentração intracelular de potássio é alta, enquanto a de sódio é baixa, em relação ao meio extracelular; e a manutenção destes gradientes iônicos serve como base para diversas outras funções. A Na^+/K^+ -ATPase é expressa de forma ubíqua nas células animais, levando a um alto consumo de ATP. Com isso, pode-se afirmar que o balanço de sódio e o balanço energético estão intimamente associados, convergindo para a manutenção da relativa constância do meio interno, ou seja para a homeostase do organismo.

Os neurônios são células com altas taxas metabólicas, sendo especialmente sensíveis às alterações de osmolalidade e, depleção de oxigênio e glicose, e, por conseqüência, também de ATP. Por isso, não é surpresa que algumas destas células tenham se especializado em detectar alterações na osmolalidade e na concentração de glicose, constituindo neurônios osmossensíveis e/ou glicossensíveis. Tais células parecem estar localizadas principalmente em áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, a exemplo do órgão subfornical (SFO) localizado na lâmina terminal. Em geral, esses neurônios se projetam para vários outros núcleos encefálicos, formando uma rede neural envolvida na recepção das alterações de concentração de nutrientes chave nos fluidos corporais (sódio e glicose, por exemplo) e ativação de mecanismos autonômicos, humorais e comportamentais que promoverão a homeostase.

Um sistema que tem sido implicado na modulação desses mecanismos é o serotoninérgico, que, através de seu principal neurotransmissor, a serotonina (5-HT), atua em uma série de

funções corporais, como controle cardiovascular, controle do ciclo sono/vigília e modulação de comportamentos afetivos, emocionais e estados motivacionais, como a fome e o apetite ao sódio. A maior parte da 5-HT encefálica tem origem no Núcleo Dorsal da Rafe (DRN), estrutura relacionada à inibição tônica do apetite específico ao sódio. Além disso, mais recentemente, grupos específicos de neurônios do DRN foram relacionados diretamente à modulação do comportamento alimentar, com a indicação de possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de transtornos alimentares nestas populações.

A descoberta de novos alvos farmacológicos tem sido acelerada nos últimos anos devido aos avanços da pesquisa básica nas áreas biomédicas, sobretudo na integração de novas técnicas de biologia molecular para responder antigas questões sobre o funcionamento e plasticidade dos sistemas fisiológicos. Ressalta-se, em particular, a importância das ciências (ou técnicas) chamadas “ômicas” representadas pela genômica, epigenômica, proteômica, metabolômica, transcriptômica, dentre outras. Tais abordagens empregam técnicas de biologia molecular que permitem a análise de um grande conjunto de alvos (genes, proteínas, metabólitos, etc) em determinada célula, tecido, órgão ou organismo. O uso dos transcriptomas, em particular, tem crescido na pesquisa por permitir analisar de uma só vez e de forma rápida milhares de transcritos. No presente trabalho, utilizamos a análise transcriptômica do DRN para determinar genes candidatos potencialmente envolvidos no controle do apetite específico ao sódio e/ou comportamento alimentar mediados pelo sistema serotoninérgico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle do Balanço Hidromineral

Durante a transição da vida, exclusivamente do meio aquático, para o meio terrestre, diversas adaptações evolutivas foram necessárias e selecionadas para a adequação dos organismos ao novo ambiente. Estas mudanças ocorreram em diversos níveis, fosse o novo sistema musculoesquelético, capaz de resistir à gravidade; a modificação dos sistemas sensoriais, para captar variações no novo meio; alterações comportamentais; e a própria regulação do meio interno, principalmente no que concerne às trocas gasosas e a osmorregulação. Nas palavras do fisiologista francês René Quinton, foi necessário que esses indivíduos “carregassem o mar dentro de si”, ou seja, o meio interno deveria ser similar à composição do meio aquático em que evoluíram (QUINTON, 1904). O conceito de meio interno foi mais tarde resgatado por outros pesquisadores, dentre eles Claude Bernard, ao qual credita-se a criação do termo ‘milieu intérieur’. De todo modo, uma vez em ambiente terrestre, a principal demanda do organismo seria evitar a todo custo perdas significativas de água, ou seja, a desidratação, buscando-se uma relativa constância no meio interno (HOENIG; ZEIDEL, 2014; HOLMES, 1986; MECAWI et al., 2015).

As variáveis importantes para a vida de um organismo devem se manter em determinada faixa de variação fisiológica. É claro que esses valores podem sofrer alterações sutis de acordo com as demandas do ambiente externo e interno, mas sempre no sentido de manter o melhor funcionamento possível das células. Mais tarde esta relativa constância (manutenção no estado estacionário) do meio interno veio a ser chamada homeostase, nome cunhado pelo fisiologista Walter Cannon (HOENIG; ZEIDEL, 2014). Para que haja homeostase, diversos sistemas fisiológicos atuam em conjunto, gerando respostas adaptativas neurais, endócrinas, cardiovasculares, renais e comportamentais. No contexto do balanço hidromineral, tais respostas envolvem principalmente mudanças na atividade autonômica, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, secreção de peptídeos como a vasopressina (AVP) e alteração nas taxas de excreção renal de água e eletrólitos (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004).

Para a maioria das espécies terrestres, a osmolalidade deve ser mantida em torno de 290 mosmol/kg H₂O, enquanto o sódio plasmático deve permanecer ao redor 140 mM. Enquanto valores muito baixos de osmolalidade e natremia podem levar à formação de edema, valores muito altos podem prejudicar a perfusão tecidual, e ambos representam alto risco à vida do indivíduo caso não sejam corrigidos rapidamente. Para tanto, osmolalidade e volume do LEC devem ser regulados através do balanço entre ingestão e excreção/reabsorção de água e sódio (VERBALIS, 2003).

Em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório procuramos avaliar respostas comportamentais e hidroeletrólíticas por meio de modelos animais que desafiam a homeostase hidromineral. Mais especificamente, ratos Wistar foram separados em quatro grupos, controle (**CTRL**), dieta pobre em sódio (**LS**), furosemida (**FURO**) e sobrecarga salina (**SL**). Após o teste de livre escolha entre água ou solução salina 0,3 M, verificamos o aparecimento do apetite ao sódio tanto no grupo **LS**, quanto no grupo **FURO**. A figura a seguir ilustra parte dos resultados então obtidos que serviram de validação para o modelo proposto e como base para os experimentos realizados na sequência.

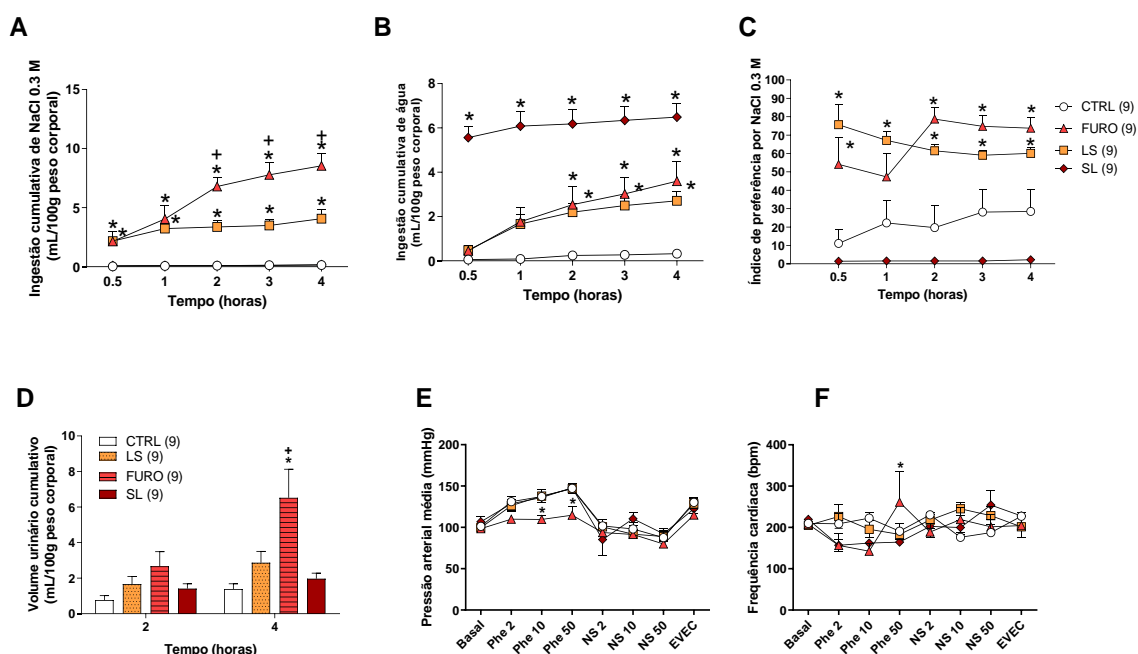


Figura 1. Avaliação da ingestão de fluidos, volume urinário e alterações cardiovasculares em animais submetidos à dieta pobre em sódio, furosemida na água de beber e sobrecarga salina. O grupo controle (CTRL) teve livre acesso à ração normossódica (0,4% Na⁺), água filtrada e solução de NaCl 1,8% (0,3 M). O grupo dieta pobre (LS) foi alimentado com ração hipossódica (0,03% Na⁺) e água destilada durante 4 dias, com a intenção de induzir o apetite ao sódio. Os animais do grupo furosemida (FURO) receberam ração hipossódica (0,03% Na⁺) e água destilada com furosemida (0,3mg/mL) durante 4 dias, com o objetivo de induzir o apetite ao sódio e hiponatremia. O último grupo, foi submetido à **sobrecarga salina (SL)**, com livre acesso à ração normossódica (0,4% Na⁺) e solução de NaCl 1,8% durante 4 dias, com o objetivo de induzir a hipernatremia. Ingestão cumulativa de água (A) e de salina (B) após teste de livre escolha e índice de preferência pelo sódio (C). Em (D) o volume urinário cumulativo nos tempos de 2h e 4h após o início do teste de livre escolha. Por último, os resultados de pressão arterial média (E) e frequência cardíaca (F) durante teste do barorreflexo.

2.2 Sede e Apetite ao Sódio

Os estados motivacionais de sede e apetite ao sódio provocam alterações comportamentais, que por sua vez, possibilitam a correção de déficits homeostáticos detectados pelos sistemas sensoriais internos (JOHNSON A. K, 2007; LIND RW, 1984; WOLF; STRICKER, 1967). Déficits de água e eletrólitos ocorrem normalmente devido às demandas metabólicas de um indivíduo e, caso estas perdas não sejam devidamente repostas, podem levar à desidratação em diversos graus, podendo representar alto risco ao organismo. Didaticamente, pode-se separar a desidratação em duas formas principais, a desidratação intracelular e a extracelular. A primeira se dá quando a perda de água é superior à perda de sódio, isto ocorre, por exemplo, durante a transpiração moderada e durante a privação hídrica. Após a perda de água, o volume do LEC decresce e a osmolalidade aumenta, levando à hipertonicidade que causa deformações nas células, ativação de osmorreceptores e aumento da ingestão e reabsorção de água. Já na desidratação extracelular há perdas equivalentes de água e sódio (como em quadros de diarreia e hemorragia). Ocorre então, uma redução pronunciada do volume do LEC e a osmolalidade pode aumentar ou se manter; de forma que, a ingestão de água sozinha não é suficiente para repor o déficit de volume. Nos casos de desidratação intracelular, a

hipernatremia e a hiperosmolalidade são os principais estímulos à sensação de sede e à secreção de AVP), culminando no aumento da ingestão e reabsorção renal de água. Entretanto, quando ocorrem perdas de fluidos juntamente com grande perda de sódio (como nas hemorragias) a ingestão somente de água não é suficiente para reparar o déficit, ocorrendo também o aumento do apetite ao sódio (MCKINLEY; JOHNSON, 2004). A sede como sensação subjetiva só poderia ser assim denominada no homem; porém, a desidratação é um fenômeno fisiológico, podendo ser observada tanto no homem quanto em outros mamíferos, que reagem de forma semelhante ao buscar e consumir fluidos (VERBALIS, 1988). Da mesma forma, o apetite ao sódio também pode ser analisado pela observação do comportamento motivado de busca e consumo de sódio, e foi observado experimentalmente pela primeira vez na década de 30 por Curt Richter após cirurgia de adrenalectomia, em resposta à qual os animais apresentavam intenso apetite ao sódio (SAKAI, 2007; STELLAR, 1993). A expressão comportamental da sede e apetite ao sódio do apresenta alta conservação filogenética, assim, diferentes espécies respondem similarmente à administração de substâncias que os evocam, como a exemplo da angiotensina II (ANG II) (FITZSIMONS, 1998). Para a expressão destes padrões comportamentais, entretanto, é necessário que ocorra intensa integração de sinais periféricos e centrais, a fim de evocar as respostas adequadas. Para tanto, o SNC recebe informações diversas (osmolalidade do LEC, concentração de sódio, sensação gustativa, de volume e de pressão) que serão enviadas para áreas encefálicas relacionadas ao processamento e execução das respostas simpática, neuroendócrinas e comportamentais necessárias à manutenção da homeostase. Algumas destas áreas podem ser observadas na figura abaixo.

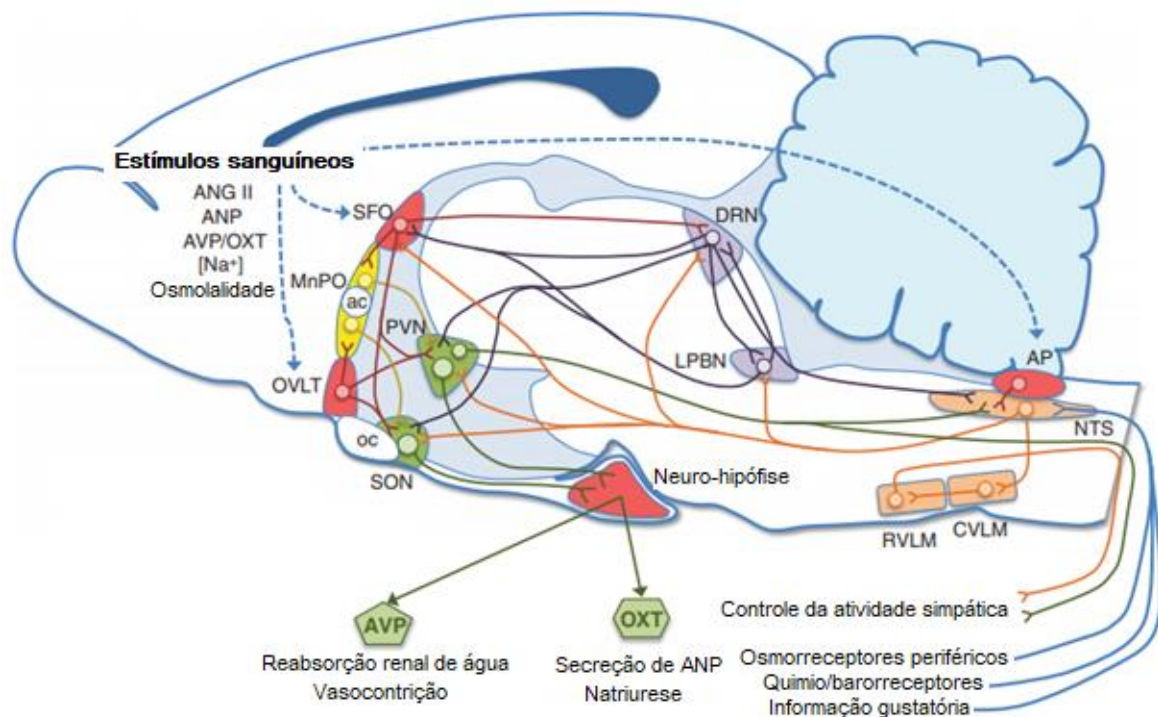


Figura 2. Ilustração representativa de corte sagital do encéfalo do rato representando os núcleos e circuitos neurais relacionados à regulação do equilíbrio hidroeletrolítico. (adaptado de MECAWI et al., 2015). ANG II – angiotensina II, ANP – peptídeo natriurético atrial, AVP – arginina vasopressina, OXT – ocitocina, OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal, MnPO – núcleo pré-óptico mediano, SFO – órgão subfornical. PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo, SON – núcleo supraóptico, LPBN – núcleo parabraquial lateral, DRN – núcleo dorsal da rafe, AP – área postrema, NTS – núcleo do trato solitário, CVLM – bulbo ventrolateral caudal, RVLM – bulbo ventrolateral rostral, ac – comissura anterior, oc – quiasma óptico.

A osmolalidade plasmática pode ser aumentada por meio da administração de substâncias osmoticamente ativas, como o cloreto de sódio. A elevação da osmolalidade leva à desidratação celular, ativando assim mecanismos centrais que incitarão os comportamentos de busca e ingestão de água. Estes mecanismos dependem diretamente da recepção de sinais por estruturas denominadas osmorreceptores, termo cunhado na década de 40, e inicialmente relacionado à secreção de AVP (VERNEY, 1947). Mais tarde, evidências experimentais levaram à conclusão de que os osmorreceptores seriam células neuronais localizadas na área preoptica-periventricular anteroventral ao terceiro ventrículo encefálico (AV3V) as quais podem ser influenciadas pela tonicidade do líquido cefalorraquidiano e, principalmente, pela concentração local de sódio (ANDERSSON, 1978). Posteriormente, pesquisas com técnicas de lesão tecidual, registros eletrofisiológicos e análise imunoistoquímica confirmaram que os osmorreceptores estariam localizados nos órgãos circumventriculares (OCVs), da lâmina terminal, OVLT e SFO; e na área postrema (AP), uma estrutura bulbar (BOURQUE; OLIET; RICHARD, 1994). Os osmorreceptores são células nervosas capazes de detectar mudanças na pressão osmótica e de transformar tais informações em sinais que serão enviados a regiões centrais envolvidas no controle do balanço osmótico. Existem ainda, células com função osmorreceptora localizadas fora do SNC, a exemplo da veia porta hepática, um dos locais iniciais a receber informações acerca do impacto osmótico da ingestão de comida e fluidos (BOURQUE; OLIET; RICHARD, 1994). No SNC, além dos OCVs, estudos eletrofisiológicos demonstraram que os neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo são excitados por estímulos hiperosmóticos, e inibidos por estímulos hiposmóticos (CHOE; OLSON; BOURQUE, 2012; HUSSY et al., 2001). Assim, esta população neuronal também é considerada osmossensível. Os mecanismos relacionados à osmorrecepção já foram – em parte – identificados em algumas destas áreas, com destaque para a família dos receptores vanilóides de potencial transitório (TRPV), envolvida na transdução dos sinais nos neurônios magnocelulares do SON (SHARIF NAEINI et al., 2006), OVLT (CIURA, S., 2006) e na circulação hepática (LECHNER et al., 2011). Populações neuronais no OVLT e SFO se projetam ainda para o SON e PVN, de modo a estimular a secreção de AVP pelas células magnocelulares em resposta a desafios a homeostase como a desidratação (MCKINLEY; HARDS; OLDFIELD, 1994).

A ANG II, um outro elemento chave na osmorregulação, apresenta marcada ação dipsogênica sobre o SNC, mas não em tecidos periféricos (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970; FITZSIMONS; SIMONS, 1969; SWANSON, 1974). O núcleo préoptico mediano (MnPO) apresenta alta densidade de receptores AT₁ apesar de não estar sujeito aos níveis circulantes de ANG II, uma vez que não mantém contato com o líquido cefalorraquidiano por isso, possivelmente este seria um dos componentes de uma via central angiotensinérgica (BOTTARI et al., 1993; DE GASPARO et al., 2000; LENKEI et al., 1997). Ademais, por receber projeções do SFO e OVLT, o MnPO poderia atuar como uma região integrativa das informações dos osmorreceptores centrais e viscerais (vindas da periferia via tronco cerebral). Apesar dos grandes avanços nas últimas décadas, alguns pontos essenciais ainda necessitam ser esclarecidos quanto à gênese do comportamento dipsogênico. Por ser tratar de um componente altamente preservado na escala evolutiva, o circuito pode envolver diversas outras áreas encefálicas ainda pouco discutidas. A região da lâmina terminal, por exemplo, é uma área de destaque, contudo, os neurônios que a compõem se projetam para outros núcleos, como o PVN, a área hipotalâmica lateral (LHA) e substância cinzenta periaquedutal, o que pode representar uma importante integração entre o balanço hidroeletrólítico e outras funções essenciais à sobrevivência (GRAEBNER; IYER; CARTER, 2015; JOHNSON; GROSS, 1993; TANAKA et al., 1986; WESTERHAUS; LOEWY, 1999).

De forma convergente, as estruturas da lâmina terminal (MnPO, SFO e OVLT) estão envolvidas na gênese do apetite ao sódio (FRY M, 2007; HIYAMA, 2004; JOHNSON; GROSS, 1993). Além da capacidade de detectar diferenças na pressão osmótica, células presentes em algumas dessas regiões conseguem também detectar alterações específicas no conteúdo de sódio extracelular (WATANABE et al., 2000, 2002). Estas células apresentam um tipo especial de canal, capaz de detectar alterações no conteúdo de sódio (canais Na_x). Estes canais parecem estar distribuídos em regiões restritas no SNC, dentre elas destacam-se SFO e OVLT, sendo que o primeiro, parece ser o principal responsável pela detecção do conteúdo de sódio (NODA; HIYAMA, 2015; SAKUTA et al., 2016; WATANABE et al., 2000, 2002).

Como já mencionado, estas áreas encefálicas possuem ainda uma densidade relevante de receptores para ANG II, destacando-se os receptores AT_1 no SFO, de forma que cerca de 70% de seus neurônios funcionam como células-alvo da ANG II circulante (BOTTARI et al., 1993; LENKEI et al., 1997). Mais tarde, foi demonstrado que a expressão de RNAm do receptor AT_1 aumenta significativamente no SFO em ratos submetidos a uma dieta pobre em sódio durante quatro dias (MECAWI et al., 2013). Ademais, o bloqueio farmacológico da enzima conversora de angiotensina (ECA) em diferentes modelos experimentais (FITTS; THUNHORST, 1996; MOE KE, WEISS ML, 1984) demonstrou o importante papel da ANG II central - mas não a periférica - para a gênese do comportamento apetitivo ao sódio. Mais especificamente, altas doses periféricas de captopril (um bloqueador da ECA) foram capazes de inibir o apetite ao sódio, ao passo que baixas doses levaram aos comportamentos apetitivos ao sódio e à água. Foi proposto então que, em baixas doses, ocorria somente a inibição periférica da ECA, aumentando os níveis da ANG I circulante, que, ao chegar ao SNC, seria convertida em ANG II (MOE KE, WEISS ML, 1984). Um estudo posterior demonstrou que a administração de ANG I no SFO era capaz de estimular a ingestão hídrica, que era abolida pela pre-administração de losartan ou captopril (XU; XINGHONG, 1999). Posteriormente, foi demonstrado que os OCVs, e em especial o SFO, possuem componentes que compõem um sistema renina-angiotensina central, possibilitando o uso da ANG II como neurotransmissor (FRY M, 2007; SAKAI et al., 2007).

1.2 O Sistema Serotonérgico e o Núcleo Dorsal da Rafe

O SFO apresenta também diversas conexões com outras áreas encefálicas, dentre elas o DRN, importante estrutura envolvida no controle do apetite ao sódio. Estudos neuroanatômicos sugeriram a existência de projeções angiotensinérgicas originadas no SFO e dirigidas ao DRN (LIND RW, 1984). Posteriormente, foi demonstrado que grande parte dos neurônios do SFO que respondem à ANG II administrada centralmente, de fato, projetam-se para o DRN (TANAKA J, USHIGOME A, 1998). O papel excitatório que a ANG II apresenta em modelos de privação de água ou sódio envolveria então o sistema serotonérgico representado pelo DRN (BADAUÊ-PASSOS et al., 2007; FRANCHINI et al., 2002). Em trabalho recente, foi detectado o aumento da expressão de receptores AT_1 no DRN em resposta à depleção corporal de sódio em ratos (PORCARI et al., 2019), reforçando a hipótese de que a própria ANGII poderia servir como neurotransmissor na comunicação entre o SFO e o DRN.

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) pertence ao grupo de aminas biogênicas, juntamente com outros neurotransmissores. Possui em sua estrutura um anel indol, sendo considerada também uma indolamina. A síntese de 5-HT se inicia a partir do aminoácido essencial L-triptofano e envolve duas etapas enzimáticas essenciais. A primeira reação consiste na hidroxilação a 5-OH-triptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), o que requer oxigênio molecular e tetraidrobiopterina (BH4) (AZMITIA, 2010). A TPH possui duas

isorformas, a TPH1, predominantemente periférica, e a TPH2, expressa principalmente no SNC. A segunda reação consiste na descarboxilação de 5-HTP por uma L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC), também conhecida como DOPA descarboxilase ou triptofano descarboxilase, que utiliza o cofator piridoxal fosfato (PLP) para gerar a 5-hidroxitriptamina. Após sua ação, ocorre a degradação à ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) pela enzima monoamina oxidase (MAO).

O sistema serotoninérgico começa a se desenvolver ainda no estágio embrionário na região do rombencéfalo, seus neurônios completam sua migração total a partir da zona ventricular pouco após o nascimento, fundindo-se na linha média do mesencéfalo para formar os núcleos da rafe mesencefálica (SOIZA-REILLY; GASPAR, 2020).

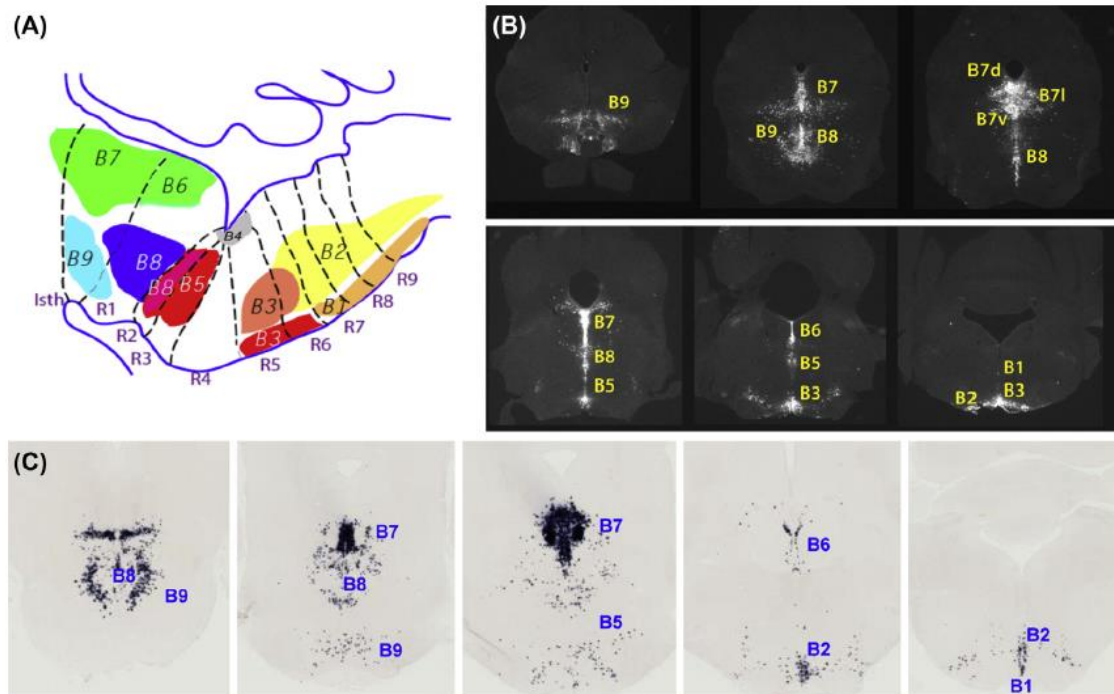


Figura 3. Ilustração mostrando a distribuição topográfica dos grupos celulares B em roedores e primatas. (A) Distribuição esquemática dos grupos celulares de acordo com sua origem ontológica em vista sagital. (B) Secções coronais sequenciais de encéfalo de camundongo P7, onde os neurônios 5-HT foram geneticamente marcados com GFP; (C) Expressão do gene TPH2 no encéfalo de primata em cortes coronais, marcados por hibridização in situ. Imagem retirada de (SOIZA-REILLY; GASPAR, 2020). Isth – istmo; B1 a B9 – nomenclatura dos grupamentos serotoninérgicos de acordo com a localização topográfica; R1 a R9 – nomenclatura correspondente à divisão em rombômeros; B7d – grupo B7 porção dorsal; B7v – grupo B7 porção ventral.

Como pode ser observado na figura 3, os grupos celulares B1 – B9 concentram praticamente todos os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos (5-HT) do encéfalo, que apesar de serem relativamente poucos quando comparados ao conjunto total de neurônios, projetam-se para virtualmente todo o diencéfalo e telencéfalo (AZMITIA; SEGAL, 1978; ISHIMURA et al., 1988; STEINBUSCH, 1981). Por este motivo, o sistema serotoninérgico é frequentemente associado a uma miríade de efeitos fisiológicos e respostas comportamentais, como controle cardiovascular, do ciclo sono/vigília e modulação de comportamentos afetivos, emocionais e estados motivacionais, como a fome e o apetite ao sódio. Dentre os grupos neuronais que compõem o sistema de núcleos da rafe, o DRN tem sido um dos mais investigados em diversas linhas de pesquisa. Esse núcleo contém a maior parte dos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos presentes na rafe (ISHIMURA et al., 1988), e por isso,

tem sido implicado no controle exercido pelo sistema serotoninérgico sobre outros sistemas fisiológicos.

Neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe mesencefálica emitem e recebem ainda fibras de núcleos específicos do SNC, relacionados ao controle neuroendócrino, eletrolítico e cardiovascular (AZMITIA; SEGAL, 1978; POLLAK DOROCIC et al., 2014). Nesse contexto, ratos submetidos à administração de drogas que estimulam a neurotransmissão serotoninérgica (agonistas de receptores 5-HT_{2A/2C}, liberadores ou inibidores da receptação de serotonina) apresentam uma inibição seletiva no apetite ao sódio (NEILL; COOPER, 1989). Mesmo fêmeas depletadas de sódio, quando tratadas agudamente com liberadores de serotonina, exibem uma redução dramática na ingestão de salina hipertônica (ROUAH-ROSILIO M, OROSCO M, 1994). Esses dados reforçam a hipótese de que a transmissão serotoninérgica exerce uma inibição tônica da ingestão de sódio. Diversos estudos (CAVALCANTE-LIMA et al., 2005b; FONSECA et al., 2009; REIS, 2007) têm avaliado a hipótese de que o sistema serotoninérgico do DRN seria um dos principais mecanismos responsáveis pela sinalização da saciedade ao sódio. Por exemplo, ratos submetidos à lesão do DRN (eletrolítica ou com ácido ibotênico) apresentaram um consumo excessivo de solução de salina hipertônica (CAVALCANTE-LIMA et al., 2005a, 2005b; OLIVARES et al., 2003). Além disso, outros trabalhos indicam que a depleção de sódio diminui a atividade dos neurônios serotoninérgicos presentes no DRN – evidenciado por imunistoquímica da proteína nuclear Fos – enquanto seu consumo induzido aumenta a atividade desses grupamentos neuronais (FRANCHINI et al., 2002; GODINO et al., 2007). Adicionalmente, estudos eletrofisiológicos *in vivo* aplicando sobrecarga de sódio corporal (NaCl 2 M, via subcutânea) mostraram que a frequência de disparo dos neurônios do DRN aumenta significativamente durante este desafio, em comparação com os animais infundidos com solução de salina isotônica (GODINO et al., 2013). Deste modo, a atividade do sistema serotoninérgico do DRN seria modulada pela natrema do indivíduo, diminuindo em estados de deficiência de sódio e aumentando durante a restauração de seus níveis ou durante uma sobrecarga de sódio. Esses achados reforçam o papel inibitório do sistema serotoninérgico sobre o apetite ao sódio. Em contrapartida, durante a depleção corporal de sódio com furosemida, foi observada redução da imunomarcagem para 5-HT no DRN (PORCARI et al., 2019), o que corrobora com os dados da literatura que implicam o papel de inibição tônica do DRN sobre o apetite ao sódio.

1.3 Controle do Comportamento Alimentar e o Sistema Serotoninérgico

O comportamento alimentar, como todo comportamento motivado, envolve uma complexa rede neural para seu adequado controle. Dentre as regiões historicamente mais estudadas destacam-se núcleos hipotalâmicos inicialmente denominados “centro da fome” e “centro da saciedade”, que correspondem, respectivamente, ao núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) e à LHA (ANAND, BK AND BROBECK, 1951; BERNARDIS; BELLINGER, 1996; HETHERINGTON, A. W. AND RANSON, 1938). Os núcleos hipotalâmicos PVN e arqueado (ARC) também apresentam importante influência sobre o comportamento alimentar, este último em especial localiza-se em contato íntimo com a eminência média, podendo receber mais facilmente sinais circulantes sobre o estado metabólico do organismo (CAMPBELL et al., 2017; RODRÍGUEZ; BLÁZQUEZ; GUERRA, 2010; SCHWARTZ et al., 2000). Neste contexto, os OCVs são áreas chave para a regulação do status energético, o SFO em especial tem sido objeto de estudo na possível integração de sinais periféricos de fome/saciedade e recrutamento de circuitos neurais envolvidos nas respostas efetoras (CANCELIERE; FERGUSON, 2017; MIMEE; SMITH; FERGUSON, 2013).

O sistema serotoninérgico apresenta importantes conexões com as áreas supracitadas, porém, seu envolvimento no comportamento alimentar permanece pouco definido (FLETCHER; DAVIES, 1990; MEDEIROS et al., 2005; NECTOW et al., 2017; YAMADA et

al., 2003). Evidências iniciais do envolvimento do sistema serotoninérgico no comportamento alimentar foram obtidas com o uso da fenfluramina, um agente liberador de serotonina que leva à redução do apetite pela interrupção do estoque vesicular de 5-HT e pela reversão do sentido de transporte do transportador de serotonina (SERT ou 5-HTT). Os estudos com esta droga revelaram seu potencial papel na inibição do apetite, indicando uma possível modulação serotoninérgica sobre a ingestão alimentar (GARATTINI et al., 1979, 1986; GARATTINI; MENNINI; SAMANIN, 1989). Além disso, foi demonstrado que a administração intracerebroventricular de para-cloro-fenilalanina (pCPA) levava à hiperfagia após três dias de tratamento, comportamento que se mantinha ao longo do tempo total de administração, culminando em obesidade dos animais (BREISCH, S., ZEMLAN, F., & HOEBEL, 1976). Por fim, há evidência de que grupos específicos de neurônios do DRN que expressam os transportadores vesiculares para GABA (VGAT) e glutamato (VGLUT3) têm a capacidade de modular o comportamento alimentar de formas opostas, de forma que a ativação de neurônios de fenótipo VGAT leva ao aumento da ingestão alimentar, enquanto o VGLUT3 leva a sua redução (NECTOW et al., 2017). Estes achados indicam que além dos neurônios serotoninérgicos, populações glutamatérgicas e GABAérgicas podem estar envolvidas na modulação do comportamento alimentar a partir do DRN.

1.4 Em Busca das Bases Moleculares da Sede, da Fome e do Apetite ao Sódio

As técnicas para obtenção dos transcriptomas são cada vez mais empregadas para responder perguntas experimentais complexas no campo da biologia molecular e de sistemas, de forma menos enviesada possível. Os transcriptomas consistem no conjunto completo de transcritos (RNAs) presentes em uma amostra (célula ou tecido). O entendimento do transcriptoma é essencial para que se possa interpretar os elementos funcionais do genoma, revelar os constituintes moleculares de células e tecidos nos diferentes estágios de desenvolvimento e compreender as alterações causadas por diferentes condições fisiológicas e/ou patológicas. O sequenciamento do RNA e obtenção do transcriptoma representam importantes ferramentas para investigar desde o funcionamento das células, até a fisiologia de um organismo inteiro. A tecnologia que aplica os *microarrays* para análise transcriptômica apresenta limitações relativas à quantidade de RNA, à quantificação dos níveis dos transcritos, bem como a informação da sequência. Já o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês, *next-generation sequencing*) é uma abordagem recente para analisar o perfil de transcriptoma, utilizando tecnologias de *deep-sequencing*, proporcionando assim possibilidades de bioanálises quase ilimitadas (MUTZ et al., 2013).

Certamente, o uso de tecnologias de *microarrays*, permite delimitar as bases gênicas de alguns fenômenos fisiológicos, possibilitando a visão de um quadro mais amplo do que ocorre no organismo. Utilizando esta técnica, alguns experimentos foram realizados a fim de catalogar o transcriptoma do sistema hipotálamo-neurohipofisário em resposta à privação de água (HINDMARCH et al., 2013). No SON, foram identificados 189 genes cuja expressão mudou robustamente como consequência da privação hídrica por 72 horas, incluindo populações de fatores de transcrição e receptores acoplados à proteína G (GHORBEL et al., 2006).

Em outro trabalho, utilizando ratos normohidratados ou submetidos à sobrecarga salina (NaCl 2%, p/v) durante 7 dias, foram realizados *microarrays* a fim de comparar as listas de genes regulados pelos tratamentos. Foi observado que mais da metade dos genes alterados após privação hídrica no SON também são alterados após sobrecarga salina. Por outro lado, foram encontrados genes no SON que parecem ser regulados exclusivamente pela desidratação ou sobrecarga salina, tendo sido validado alguns desses transcritos até o momento, como pode ser observado na figura a seguir (GREENWOOD et al., 2015b).

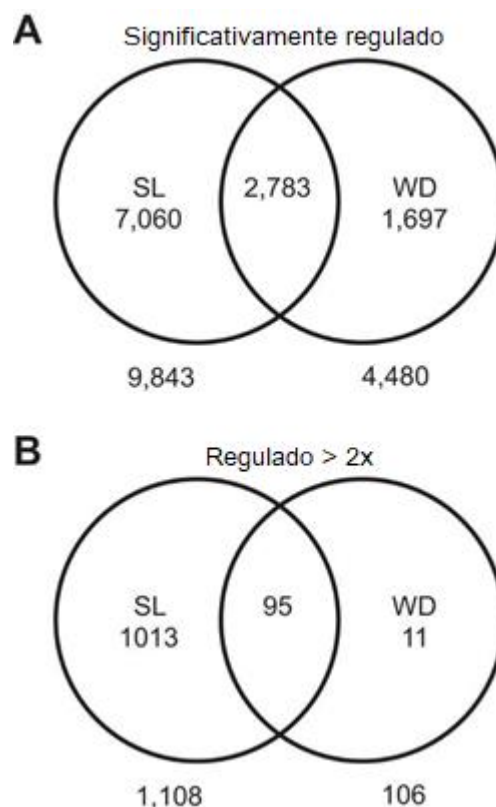


Figura 4. Affymetrix 230 2.0. GeneChips de rato foram confrontados com RNAm extraído do SON de ratos normo-hidratados, submetidos à privação hídrica por 72 horas (WD- *water deprivation*) ou à sobrecarga salina com solução de NaCl, 2% p/v (SL- *salt loading*). (A) 9.843 genes foram significativamente regulados, dos quais 1.108 (B) foram regulados mais do que duas vezes (>2 vezes). (GREENWOOD et al., 2015b)

Foi também por meio dos transcriptomas que detectou-se o aumento do gene *Slc12a1* no sistema hipotálamo-hipofisário em resposta à desidratação (HINDMARCH et al., 2006). Este gene codifica o cotransportador renal $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$ (NKCC2), responsável por maior parte da reabsorção do NaCl filtrado pelos glomérulos e sua descoberta no hipotálamo causou uma importante mudança de paradigma, pois foi demonstrado que sua expressão central é necessária para a osmorregulação (KONOPACKA et al., 2015a). Além disso, o uso de transcriptoma tem se mostrado relevante para identificação de genes que podem regular a transcrição de outros genes essenciais ao balanço hidroeletrólítico, a exemplo do fator de transcrição CREB3L1, que tem a capacidade de ativar a transcrição da AVP (GREENWOOD et al., 2014a, 2015a). De forma semelhante, o gene *Caprin-2*, cuja proteína expressa tem a capacidade de se ligar ao RNA, também foi relacionado ao aumento da expressão de AVP (KONOPACKA et al., 2015b). O mais interessante, porém, foi que o silenciamento deste gene, além de reduzir o mRNA da AVP no hipotálamo, levou ao aumento de seus níveis plasmáticos e ao aumento do sódio e osmolalidade urinários, mostrando seu importante papel fisiológico. Em outro estudo, Greenwood e colaboradores (2016) mostraram pela primeira vez o papel do gene *Rasd1*, expresso em resposta ao aumento da osmolalidade plasmática e a níveis elevados de glicocorticóides, sendo importante na mediação de respostas transcricionais ao estresse durante a privação hídrica (GREENWOOD et al., 2016).

Apesar dos significativos trabalhos referentes ao equilíbrio hidroeletrólítico e comportamentos motivados, muito ainda permanece a ser investigado no âmbito da biologia

molecular para identificar os fenômenos envolvidos em sua regulação. Estudos transcriptômicos permitiram mapear parte da circuitaria envolvida no comportamento alimentar e apetite ao sódio em roedores (BARKHOLT et al., 2019; LIEDTKE et al., 2011). Camundongos com déficit de sódio ou que receberam infusão de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, que também pode estimular o apetite ao sódio) apresentaram supra regulação de genes hipotalâmicos ligados especificamente aos sistemas de recompensa e ao comportamento de adição. Além disso, os autores verificaram que apenas 10 minutos após a saciedade esta supra regulação era atenuada (LIEDTKE et al., 2011; RITZ, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O DRN está implicado na regulação de diversas funções fisiológicas essenciais, dentre elas a modulação do balanço hidroeletrolítico (CAVALCANTE-LIMA et al., 2005a; LIMA et al., 2004; PORCARI et al., 2019; REIS, 2007), do comportamento alimentar (MEDEIROS et al., 2005; NECTOW et al., 2017) e, possivelmente, do apetite específico ao sódio (CAVALCANTE-LIMA et al., 2005b; FONSECA et al., 2009; REIS, 2007). O uso de técnicas cada vez mais refinadas na biologia molecular, em particular a análise dos transcriptomas, tem permitido detalhar as bases moleculares de alterações fisiológicas e comportamentais (HINDMARCH et al., 2008, 2016, 2011). Estudos sobre o balanço hidromineral têm indicado alvos chave em sua regulação principalmente em núcleos hipotalâmicos (COLIN; HINDMARCH; FERGUSON, 2016; GREENWOOD et al., 2014b, 2016; HINDMARCH et al., 2008; KONOPACKA et al., 2015a). Com base na relevância do DRN para o controle dos comportamentos apetitivos, e partindo da hipótese de que genes relacionados à neurotransmissão serotoninérgica poderiam ser alterados por nossos protocolos, procuramos identificar os genes relacionados ao comportamento alimentar, sede e apetite específico ao sódio neste núcleo mesencefálico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Tivemos como objetivo caracterizar o transcriptoma do DRN em ratos Wistar controle, bem como estudar suas alterações induzidas por diferentes protocolos experimentais que desafiam a homeostase hidromineral e energética.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Catalogar os genes expressos no DRN de ratos Wistar controle de acordo com sua classe IUPHAR
- b) Verificar a alteração da expressão gênica no DRN em resposta aos diferentes protocolos de indução do apetite ao sódio, sede e fome;
- c) Validar as alterações nas expressões gênicas no DRN por meio da técnica de RT-qPCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Apreciação Bioética da Experimentação Animal

Antes de qualquer procedimento experimental, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA, UFRRJ), tendo sido aprovado sob número 005-2015. O projeto foi adaptado às recomendações da CEUA, encontrando-se em consonância com a legislação vigente. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (60 dias de vida) provenientes do Biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da UFRRJ, mantidos em caixas coletivas (contendo quatro animais por caixa), em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e ração durante todo período de adaptação anterior aos experimentos.

4.2 Grupos Experimentais

Em todos os experimentos foram estudados cinco grupos, com as siglas vindas do inglês:

Grupo controle (CTRL - *control*): Animais com livre acesso à ração normossódica (0,4% Na^+), água filtrada e solução de NaCl 1,8% (0,3 M). Este grupo possuía livre escolha entre beber água ou salina hipertônica.

Dieta pobre em sódio (LS – *low salt*): Animais com livre acesso à ração hipossódica (0,03% Na^+) e água destilada durante 4 dias. Este procedimento teve o objetivo de induzir o apetite ao Na^+ sem causar hiponatremia, como demonstrado por MECAWI *et al.* (2013).

Furosemida (FURO - *furosemide*): Animais com livre acesso à ração hipossódica (0,03% Na^+) e água destilada com furosemida (300 mg/L) durante 4 dias. A furosemida é uma potente substância diurética/natriurética que atua no ramo ascendente espesso da alça de Henle, inibindo o cotransportador de sódio potássio e cloreto (NKCC2) localizado na membrana luminal. Com isso, este procedimento teve o objetivo de induzir o apetite ao Na^+ e hiponatremia como demonstrado por BADAUÊ-PASSOS *et al.* (2007).

Sobrecarga salina (SL – *salt loading*): Animais com livre acesso à ração normossódica (0,4% Na^+) e solução de NaCl 1,8% durante 4 dias. Este procedimento teve o objetivo de causar hipernatremia como demonstrado por VENTURA *et al.* (2005).

Privação alimentar (FD – *food deprivation*): Os animais receberam inicialmente ração normossódica *ad libitum* que foi removida das caixas coletivas 48 h antes da eutanásia conforme descrito por Hindmarch *et al.* (2008).

4.3 Protocolos

1) Os animais pertencentes aos grupos descritos foram decapitados após 4 dias de alteração do sódio na dieta ou privação alimentar por 48 h para coleta de sangue com o objetivo de avaliar a osmolalidade, hematócrito e concentrações de Na^+ plasmático. Os mesmos animais tiveram os encéfalos coletados e conservados a -80°C em condições livres de RNase para posterior procedimento de microdissecção do núcleo DRN e realização do sequenciamento do RNA (GREENWOOD *et al.*, 2014a; MECAWI *et al.*, 2013, 2011).

2) No segundo protocolo experimental, os animais foram submetidos às condições descritas anteriormente para a coleta dos encéfalos e posterior realização da RT-qPCR com a finalidade de validar os resultados obtidos pelo sequenciamento de RNA.

4.4 Obtenção do Hematócrito

Foram utilizados tubos capilares heparinizados para micro hematócrito, para coletar sangue total direto do tronco dos animais após a decapitação. Após a coleta os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. Em seguida, utilizando uma régua de leitura para micro hematócrito, foram determinados os valores em porcentagem -%.

4.5 Avaliação da Osmolalidade e Sódio Plasmático

Sangue total foi coletado em tubos falcon de 15 ml contendo heparina e mantidos em gelo. Em seguida os tubos foram centrifugados a 3000 rpm em 4°C por 20 minutos para separação do plasma. O plasma foi separado em alíquotas em tubos *ependorf* de 2,0 ml e armazenados em -20 °C até as análises. A osmolalidade (mOsmol/kg H₂O) foi determinada pelo ponto de fusão da amostra com auxílio de equipamento específico (Osmometer II, modelo 5005, Precision Systems). Já a concentração plasmática de sódio (mEq) foi analisada por fotometria de chama (Micronal – Modelo B 462) após a diluição do plasma na proporção de 1:100.

4.6 Punch e Processamento dos Tecidos para Construção do Transcriptoma

Para isolar as áreas encefálicas de interesse, os encéfalos foram submetidos à técnica de *punch* descrita por (PALKOVITS, 1973) e adaptada por Porcari (2019) utilizando para tal uma agulha de aço inoxidável com 1 mm de diâmetro interno em fatias de 60 µm. A figura 5 mostra o local aproximado da realização do *punch*, seguindo as coordenadas – 7,3 a 8,2 mm após o bregma de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2004). Os fragmentos isolados foram acondicionados em tubos *ependorf* para posterior extração do RNA. A extração do RNA foi realizada através do uso do kit Direct-zol TM RNA MiniPre (Zymo Research), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante. Esta etapa foi realizada no laboratório do Professor David Murphy na Universidade de Bristol.

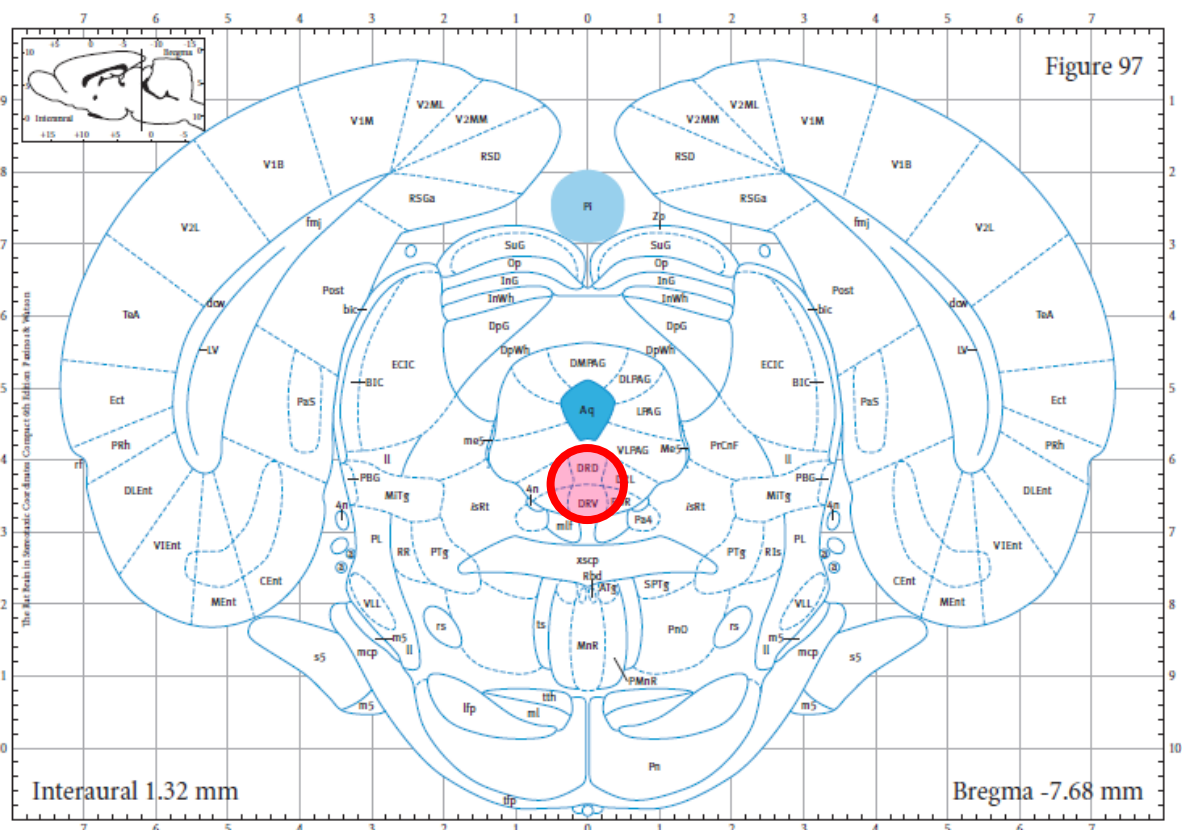


Figura 5. Corte coronal de encéfalo de rato mostrando a área aproximada do *punch*. A imagem do corte coronal foi retirada do Atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2004) e adaptada para ilustrar a área aproximada do *punch* (círculo vermelho).

4.7 Análise do Transcriptoma do DRN pelo RNAseq

Nesta etapa, foi avaliada a expressão gênica global do DRN em todos os grupos experimentais descritos. Foram utilizados 6 animais por grupo para o sequenciamento (n=6). As bibliotecas foram construídas utilizando o kit Illumina TruSeq (Illumina, San Diego, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, o mRNA foi separado por meio de iniciadores Oligo-dT ligados a esferas magnéticas (*beads*) e em seguida fragmentado (200 a 700 bp). Os fragmentos foram então acoplados a iniciadores hexâmetros aleatórios para gerar a primeira fita de cDNA para depois ser amplificada. As bibliotecas geradas foram purificadas e os adaptadores ligados às extremidades das fitas. Os fragmentos foram pré-amplificados através de PCR e em seguida submetidos a 100 ciclos de leitura pareada (*paired-end*) no sequenciador Illumina NextSeq 500 (Source BioScience, Nottingham, UK). Todo o processo para geração do transcriptoma foi realizado pela empresa Source BioScience a serviço da Universidade de Bristol e encontra-se resumido na figura 6.

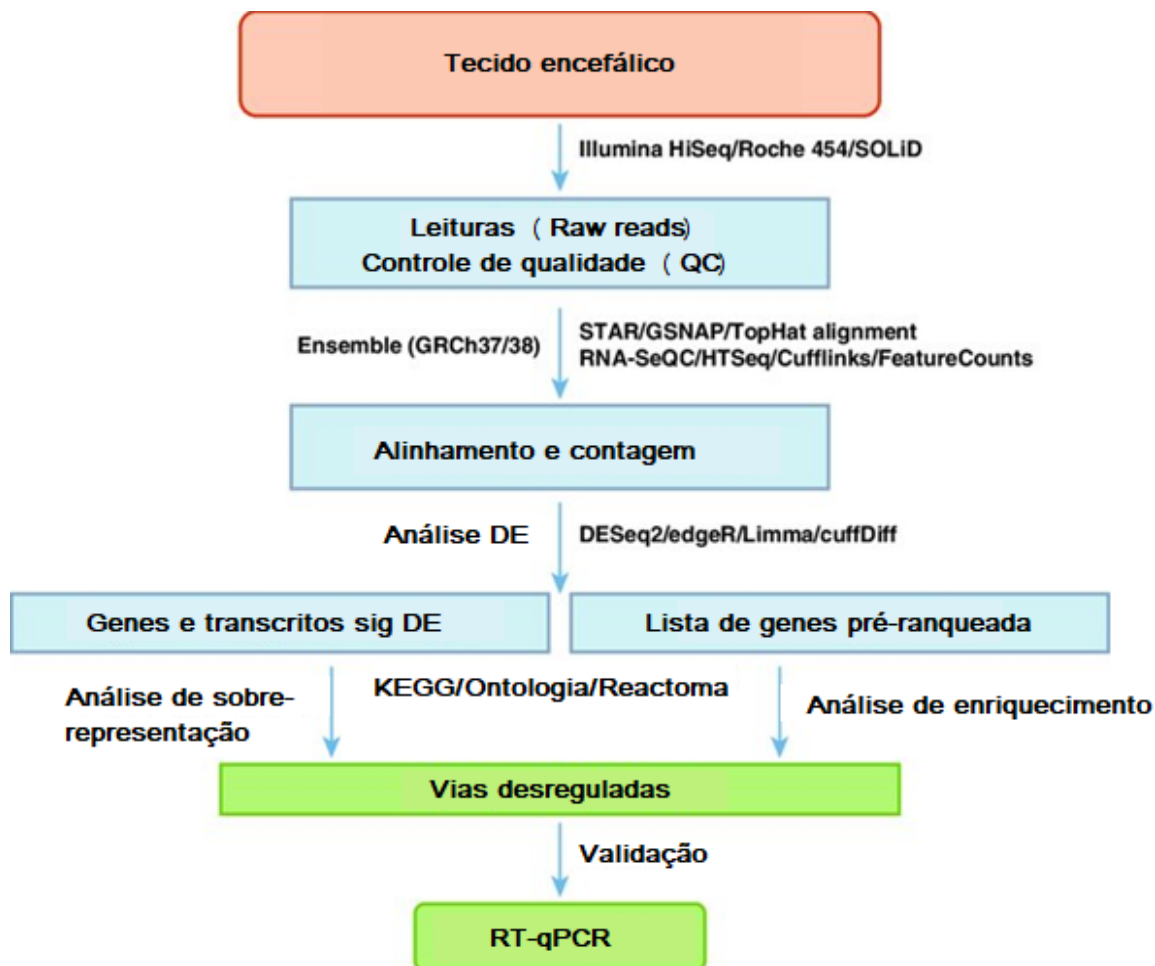


Figura 6. Figura ilustrativa do processo completo para obtenção do sequenciamento de RNA. Estão listados os principais passos para o estudo do RNA-seq em tecidos encefálicos. DE: diferencialmente expresso; KEGG *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Fonte: (WU et al., 2017)

4.8 Análises Bioinformáticas

As leituras (raw reads) obtidas pelo sequenciamento passaram por um controle de qualidade no programa *FastQC*. Em seguida, foi feito o alinhamento das leituras ao genoma do rato (*Rattus Norvegicus*) através do *TopHat*. Para as análises estatísticas de normalização e expressão genica diferencial (DGE), foi utilizado o *DESeq2* (pacote do R Biocondutor). Os dados foram então ranqueados pelo valor de p para determinar as maiores diferenças na expressão gênica. Em seguida, considerando-se somente o grupo controle, foram selecionados os alvos mais expressos no DRN e foi feita a classificação segundo a *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR - <https://www.guidetopharmacology.org/>). Classificamos também os fatores de transcrição presentes em nossos resultados de acordo com trabalho recentemente publicado em humanos (LAMBERT et al., 2018). Para a determinação dos genes diferencialmente expressos (DEGs), foi considerado um valor de p ajustado (p_{adj}) menor do 0,05 para corte e, após isso, foi feita a seleção manual dos genes que tiveram sua expressão aumentada ou reduzida de acordo com o número de transcritos obtidos. Foram utilizadas ainda algumas ferramentas online de enriquecimento para verificar as relações entre genes e seus produtos e possíveis funções moleculares, processos biológicos e vias celulares envolvidas (<http://geneontology.org/>; <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). Para a geração de

mapas de calor, utilizamos a plataforma ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>), de acordo com trabalho publicado pelos criadores da ferramenta (METSALU; VILO, 2015)

4.9 Procedimentos para Extração do RNA e Síntese de cDNA para RT-qPCR

O procedimento de punch foi realizado conforme descrito previamente (PORCARI et al., 2019). Para extração de RNA total foi adicionado 500 uL de QIAzol (QIAGEN, Crawley, UK) a cada tubo eppendorf contendo os punches e procedeu-se a extração combinando a extração tradicional por separação de fases com o kit RNeasy (QIAGEN, Crawley, UK). Para a síntese do cDNA, utilizou-se cerca de 200 ng do RNA total tratado DNase I (Invitrogen™) para eliminação do DNA genômico. O processo de transcrição reversa foi feito com auxílio do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™), segundo instruções do fornecedor.

4.9.1 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Para a análise da RT-qPCR utilizou-se o instrumento QuantStudio 3 (Applied Biosystems) com a configuração descrita a seguir: Desnaturação a 95°C por 10 minutos durante a primeira fase, seguido de desnaturação a 95°C por 15 segundos; e, anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto, considerando-se o máximo de 40 ciclos de amplificação. Os pares de primers para os alvos selecionados foram desenhados com o auxílio da ferramenta primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), seguindo os critérios depossuir entre 18 e 22 nucleotídeos, 50 a 60% de Guanina e citosina em sua composição, temperatura de melting (T_m) de 60 °C ± 3°C. Por fim, os produtos gerados (amplicons) deveriam possuir entre 90 a 200 pares de base (bp), as sequências eram checadas novamente através da ferramenta BLAST para verificar a especificidade dos produtos gerados.

Para cada alvo (gene) selecionado foi feita uma curva de eficiência, a fim de conferir o funcionamento dos pares de primers (Tabela 1) Foram utilizados somente os pares de primers que apresentaram eficiência entre 90 e 110%. O gene *LOC50110 (Gsta6)* foi excluído do ensaio por apresentar duplo pico na curva de *melting*, indicando amplificação inespecífica de outro alvo. As amostras foram pipetadas em triplicata e os resultados foram determinados pelo método $\Delta\Delta C_t$ descrito a seguir.

Os valores de média do Ct foram normalizados pela média dos genes de controle endógeno ($\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ gene referência}$). Em seguida, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, em que $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ desconhecido (grupo tratado)} - \Delta C_t \text{ controle}$. Os dados obtidos foram apresentados como expressão relativa de mRNA em unidades arbitrárias (MECAWI et al., 2013).

Tabela 1. Sequências dos primers selecionados para a RT-qPCR e valores das eficiências obtidas. Os nomes de todos os genes selecionados estão na coluna da esquerda, seguidos pelas sequências dos pares de iniciadores no sentido 5'-3'. As eficiências obtidas estão escritas em porcentagem.

Alvo (Gene ID)	Sequência Forward (F 5'--- 3')	Sequência Reverse (R 5'--- 3')	Eficiência (%)
<i>Actb</i>	TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG	TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT	96,62
<i>Gapdh</i>	ATGATTCTACCCACGGCAAG	CTGGAAGATGGTGATGGGTT	103,54
<i>Rpl19</i>	GCGTCTGCAGCCATGAGTA	TGGCATTGGCGATTTTCGTTG	99,93
<i>Slc6a4</i>	TTCACGGTGCTTGGCTACAT	CAAAGAACGTGGATGCTGGC	99,89
<i>Htr1a</i>	GACCACGGCTACACCATCTAC	CTGTCCGTCAGGCTCTTCTT	99,61
<i>Htr2c</i>	CAGAGGCACCATGCAAGCTA	GGTGATGAAAAACGGGCACC	108,25
<i>Tph2</i>	AACTAGAGGATGTGCCGTGG	TCCTTGAATCCTGGGTGGTC	100,94
<i>Slc35d3</i>	GGCGGAAATAGTGAACCGGA	TTCTGCTCTCCTAGCCACCA	108,95
<i>Fam71e1</i>	ACCAGTTTCATGCCACAGAGG	TGAGCTGGCTTGATTTCTGGTC	103,38
<i>Il3ra</i>	CCACCACTGGACAGATACGTT	TATGGACTCCCCGTTCTGACA	92,96
<i>Htr2a</i>	GCAATTAGGTGATGGCCCGA	TGTCCAGTTCGATGCTTCCG	100,90
<i>Etnppl</i>	ATGGAACCTCTTGCCTGGTG	CAACGTGAGAAGCAAGGTGC	101,96
<i>Ctgf</i> (<i>Ccn2</i>)	CGGGAAATGCTGTGAGGAGT	GGCTCGCATCATAGTTGGGT	100,16
<i>C3</i>	GCAGGTCAGGAACGAAGGTT	GGCTTTTCTCCCCAGAGGTC	106,82
<i>Kcnip3</i>	GCTCAAGTGGGCCTTCAATC	GTCCTTTCGCAGGATAGGGTA	92,93
<i>Arc</i>	GCTGGACCATATGACGACCG	CTCAGCTCGGCACTTACCAA	92,85
<i>Sult1a1</i>	AAGTGTCTTATGGGTCGTGG	GTAGAGAGCGCCCCAAAAAC	96,61
<i>LOC50110</i> (<i>Gsta6</i>)	CCGGGGTAGAATGGAGTCTG	TCATCCCATCAACCTCCACC	99,61

Os genes *Actb*, *Gapdh* e *Rpl19* foram selecionados como possíveis controles endógenos. Após a realização da RT-qPCR analisamos os valores de Ct obtidos a fim de determinar o melhor gene *housekeeping* para nosso modelo. A figura a seguir traz os gráficos com os valores individuais obtidos para cada gene nas condições controle e sobrecarga salina.

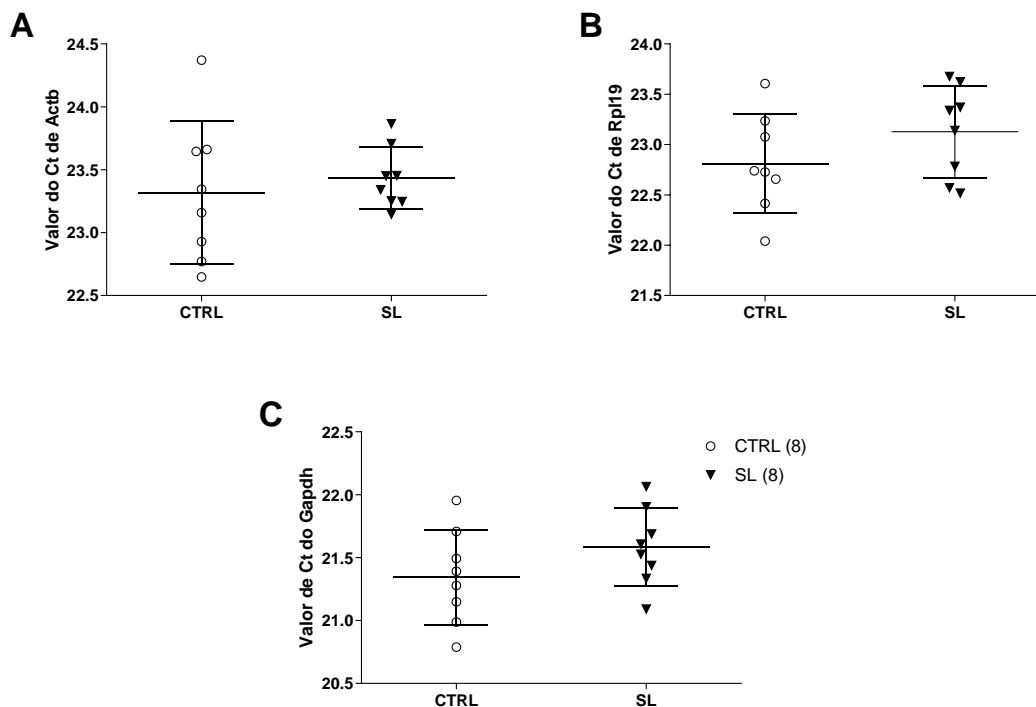


Figura 7. Gráficos representativos dos valores individuais de Ct dos genes candidatos a controles endógenos. Em (A) valores individuais de Ct para o gene *Actb*. Em (B) os valores individuais de Ct de *Rpl19* e em (C) os valores individuais para o gene *Gapdh*. Não foram observadas diferenças significativas no teste t de Student.

Tabela 2. Valores de média e desvio padrão dos genes candidatos a controles endógenos.

<i>Alvo</i>	<i>CTRL Média ± DP</i>	<i>SL Média ± DP</i>
<i>Actb</i>	23,32±0,56	23,43±0,24
<i>Rpl19</i>	22,81±0,48	23,13±0,45
<i>Gapdh</i>	21,34±0,37	21,58±0,31

Nenhum dos genes candidatos apresentou diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, a beta actina (Actb) foi o gene que apresentou maior variação entre os grupos, já o Rpl19 e Gapdh apresentaram maior estabilidade. Com base na literatura, decidimos usar o Rpl19 como controle endógeno (GREENWOOD et al., 2016).

4.8 Análise estatística

Os resultados a seguir são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Todos os resultados foram submetidos à análise de normalidade utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram analisados com o auxílio do *software GraphPad Prism*, versão 8.0.

5 RESULTADOS

A figura 8 representa as análises realizadas a partir do sangue total (hematócrito) e plasma dos animais ao final dos quatro dias dos protocolos experimentais. Ocorreu redução significativa no sódio plasmático (FURO $140,6 \pm 1,8$ vs. CTRL $143,9 \pm 2$; $P=0,0023$) e aumento no hematócrito (FURO $45,1 \pm 5,3$ vs. CTRL $40,8 \pm 3,8$; $P=0,0470$) no grupo FURO quando comparado ao grupo controle. No grupo submetido à sobrecarga salina (SL) observamos aumento significativo no hematócrito (SL $45,9 \pm 1,6$ vs. CTRL $40,8 \pm 3,8$; $P=0,00164$), na osmolalidade (SL $309,2 \pm 11,2$ vs. CTRL $275,2 \pm 14,63$; $P=0,002$) e no sódio plasmático (SL $162,7 \pm 6,4$ vs. CTRL $143,9 \pm 2$; $P<0,001$), quando comprado ao grupo controle.

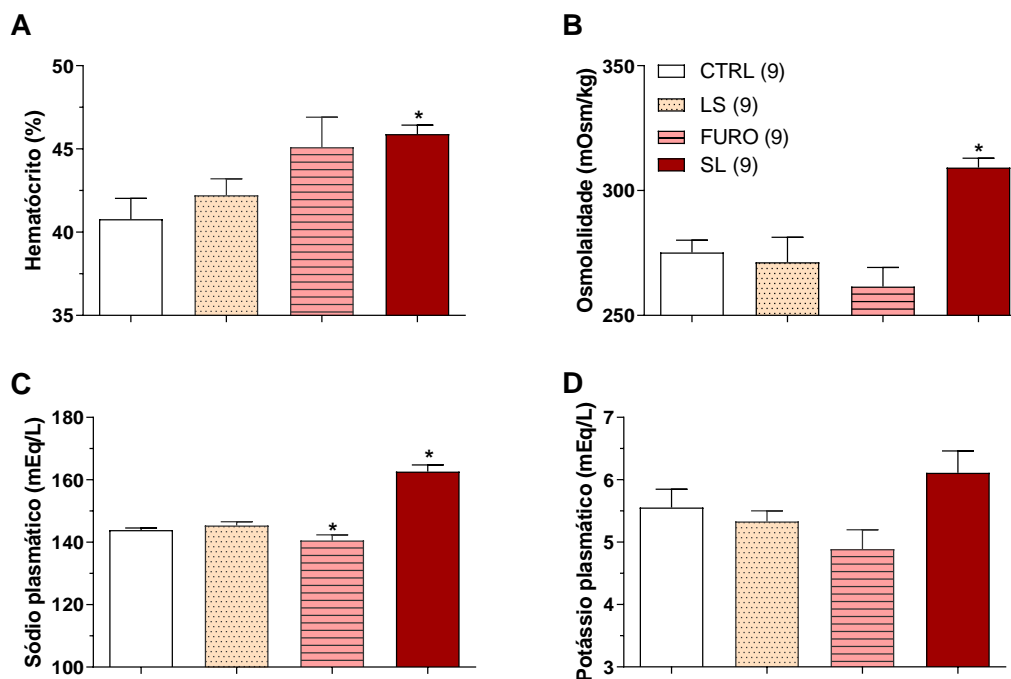


Figura 8. Parâmetros plasmáticos em animais submetidos à dieta pobre em sódio, furosemina na água de beber e sobrecarga salina durante quatro dias. Resultados do hematócrito (A), osmolalidade plasmática (B), sódio (C) e potássio (D) plasmáticos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. * $P<0,05$ vs. CTRL.

As figuras 9-13 representam os principais genes expressos no DRN de animais controle, categorizados de acordo com a IUPHAR. Dentre todos os genes detectados, foram selecionados os 10% com maior expressão para serem representados nas figuras de 9-13. A figura de número 11 contém os 5% mais expressos dos fatores de transcrição, selecionados de acordo com publicação de Lambert e colaboradores (2018). Essas porcentagens foram selecionadas apenas para facilitar a visualização dos genes, numa tentativa de criar um catálogo para consultas futuras. O restante dos genes catalogados encontra-se no material em anexo, após as referências bibliográficas.

Na figura 9.A observamos os genes 10% mais expressos entre os 200 que codificam receptores acoplados à proteína G (GPCRs) catalogados no DRN. Já na figura 9.B constam os principais canais iônicos e outros canais dentre os 186 catalogados. Em 9.C, observamos os

principais receptores catalíticos (163 catalogados) e em 9.D, os genes que codificam peptídeos endógenos (165 catalogados). Para fins de padronização, as figuras contendo os genes catalogados encontram-se em escala logarítmica.

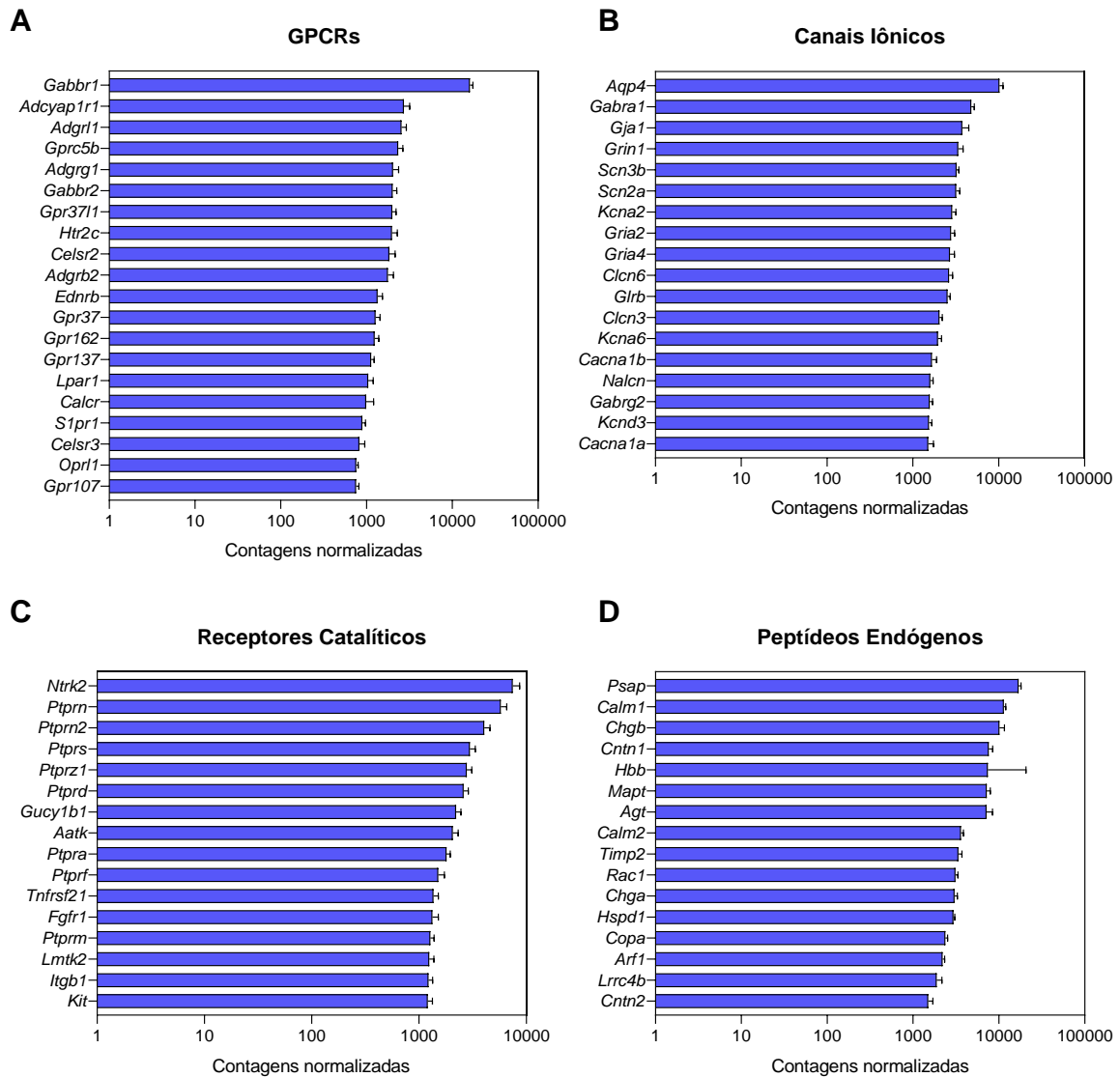


Figura 9. Principais genes expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. Em (A), podem ser identificados entre os dez alvos mais expressos, receptores do sistema GABAérgico (*Gabbr1* e *Gabbr2*), receptores da classe de Adesão (*Adgrl1*, *Adgrg1* e *Adgrb2*) provavelmente envolvidos na interação celular. Ainda em (A) pode-se verificar o gene que codifica o receptor serotoninérgico 5-HT_{2c} (*Htr2c*) e o gene (*Adcyap1r1*) que codifica o receptor para os peptídeos PACAP-27 e PACAP-38. Em (B) os principais canais iônicos e outros canais que não possuem classificação específica pela IUPHAR, o gene que codifica a aquaporina 4 (*Aqp4*) é o mais expresso no DRN, este canal é altamente expresso no encéfalo, onde parece ser relevante para uma adequada homeostase dos fluidos cefalorraquidiano e intersticial. Outros genes em destaque em (B) são o que codifica a subunidade alfa do receptor para GABA (*Gabra1*), os de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (*Grin1*, *Gria2* e *Gria4*) e os canais para sódio ativados por voltagem (*Scn3b* e *Scn2a*). Em (C) os genes de receptores catalíticos, com destaque para o gene do receptor neurotrófico de tirosina quinase ativado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Em (D) o gene *Psap* codifica uma pré proteína altamente conservada e que está envolvida no catabolismo lipídico no encéfalo; já o gene

Calm1 codifica a calmodulina, envolvida na modulação de diversas enzimas, canais e outras proteínas importantes para a sinalização celular.

Na figura 10 estão presentes os principais genes de transportadores expressos no DRN categorizados de acordo com a IUPHAR (os transportadores estão classificados por expressão, independente da família a que pertencem). Foram catalogados 378 transportadores no DRN, dos quais apenas 10% estão presentes na imagem a seguir. Os resultados foram divididos em dois gráficos a fim de melhorar a visualização.

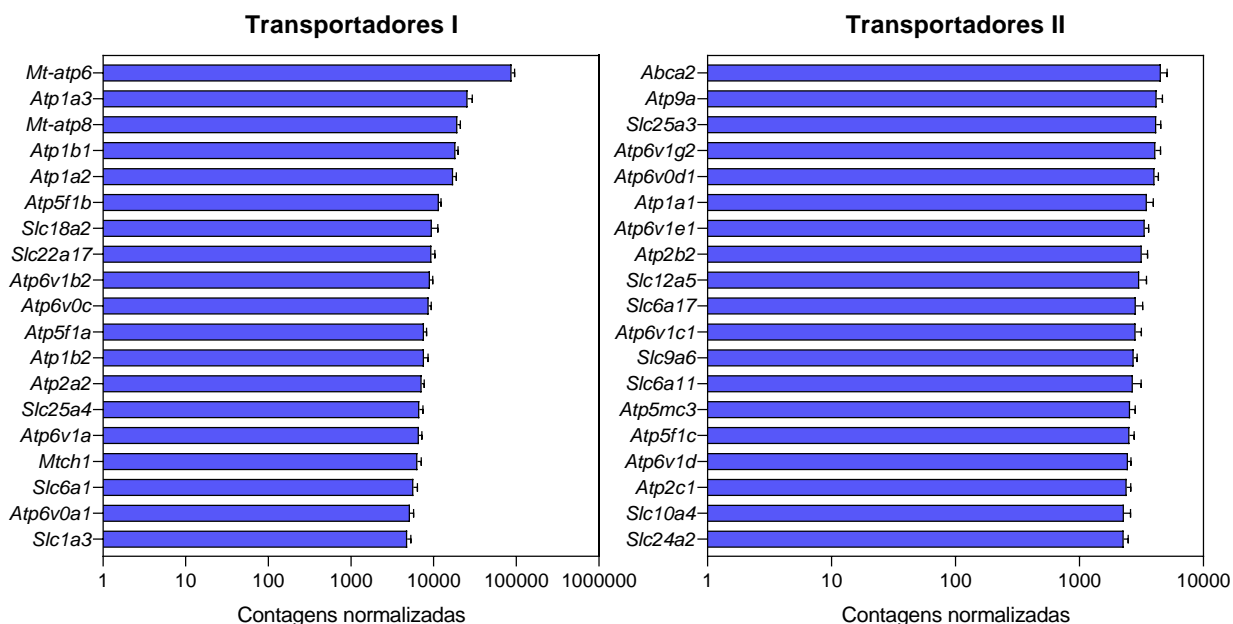


Figura 10. Principais genes de transportadores expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. O primeiro e terceiro genes mais expressos (Mt-atp6, Mt-atp8) codificam enzimas ATP sintases presentes na membrana mitocondrial e pertencentes à família de ATPase/ATP sintase do tipo F. Estão presentes ainda entre os mais expressos, genes que codificam subunidades de ATPases do tipo P (Atp1a3, Atp1a2) pertencentes à subfamília das Na⁺/K⁺ -ATPases

Na figura 11, descrevemos as enzimas do tipo quinase mais expressas no DRN. Segundo a IUPHAR, existem mais de 500 enzimas desta classe catalogadas no ser humano, sendo divididas em cerca de 15 subfamílias. As enzimas quinases encontram-se organizadas pela expressão independente da subfamília. Foram catalogados 384 genes que codificam

enzimas quinases, na figura estão presentes somente os 10% mais expressos.

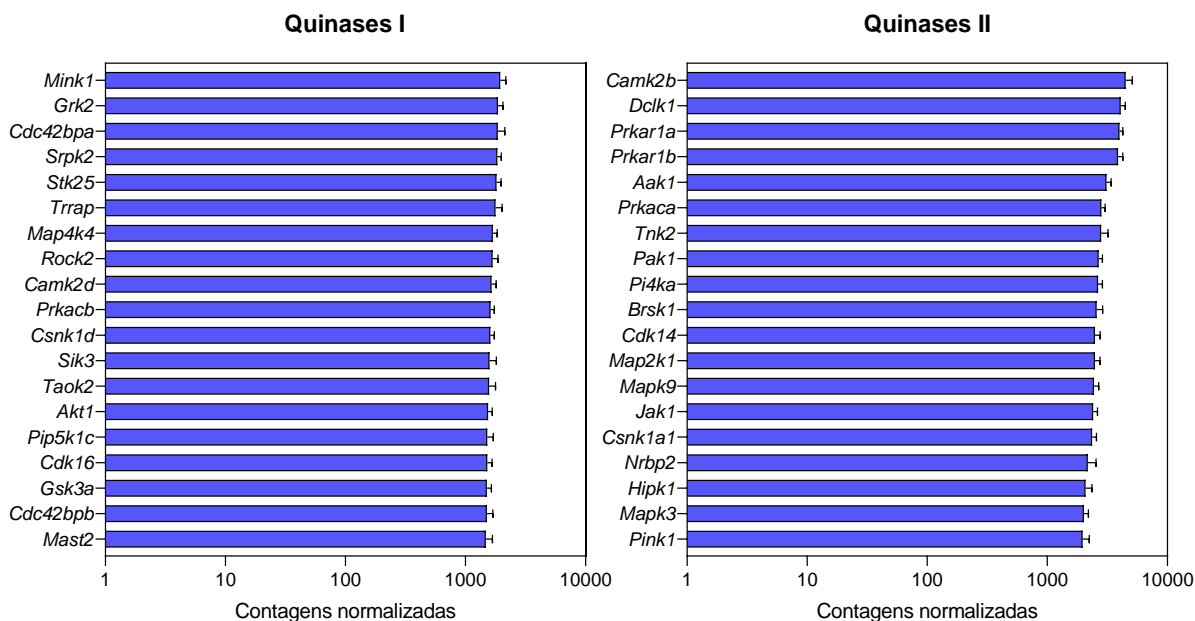


Figura 11. Principais genes de enzimas kinases expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. No topo da lista, o gene que codifica a subunidade beta da enzima quinase dependente de cálcio/calmodulina (*Camk2*) e está relacionada à plasticidade neuronal, formação de sinapses e espinhos dendríticos. O produto do gene *Dclk1*, segundo no ranking, tem a capacidade de se ligar aos microtúbulos, estimulando sua polimerização.

Na figura, observamos os 12 genes que codificam outras enzimas encontradas no DRN. Aqui as enzimas encontram-se organizadas pela expressão independente da subfamília. No total, foram catalogados 522 genes que codificam enzimas (na figura estão presentes somente os 10% mais expressos).

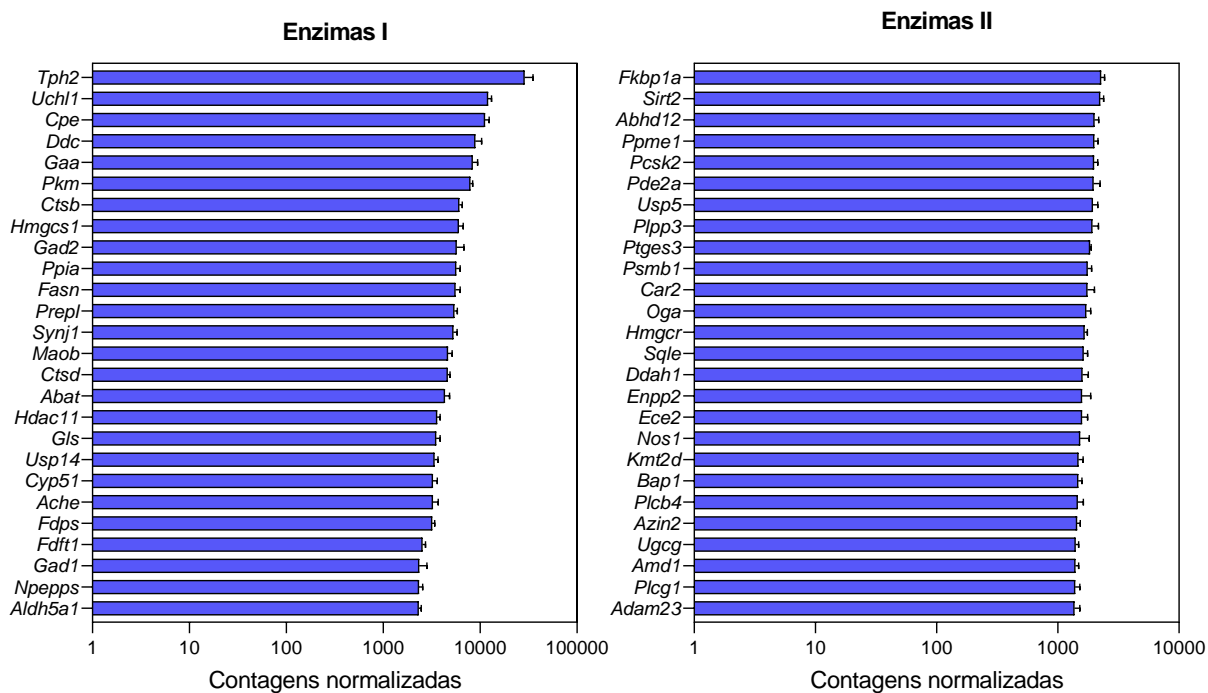


Figura 12. Principais genes que codificam outras enzimas expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com a IUPHAR. O gene de enzima mais expresso na lista é o da *Tph2*, alvo que caracteriza neurônios serotonérgicos por ser altamente expressas nestas células. O gene *Tph2* é a forma predominante no SNC, enquanto o gene que codifica a *Tph1* é a predominante no sistema periférico.

Na figura 13 estão listados os principais fatores de transcrição expressos no DRN categorizados de acordo com Lambert e colaboradores (2018). Foram mapeados com sucesso mais de 600 fatores de transcrição no DRN dos ratos Wistar.

Fatores de Transcrição

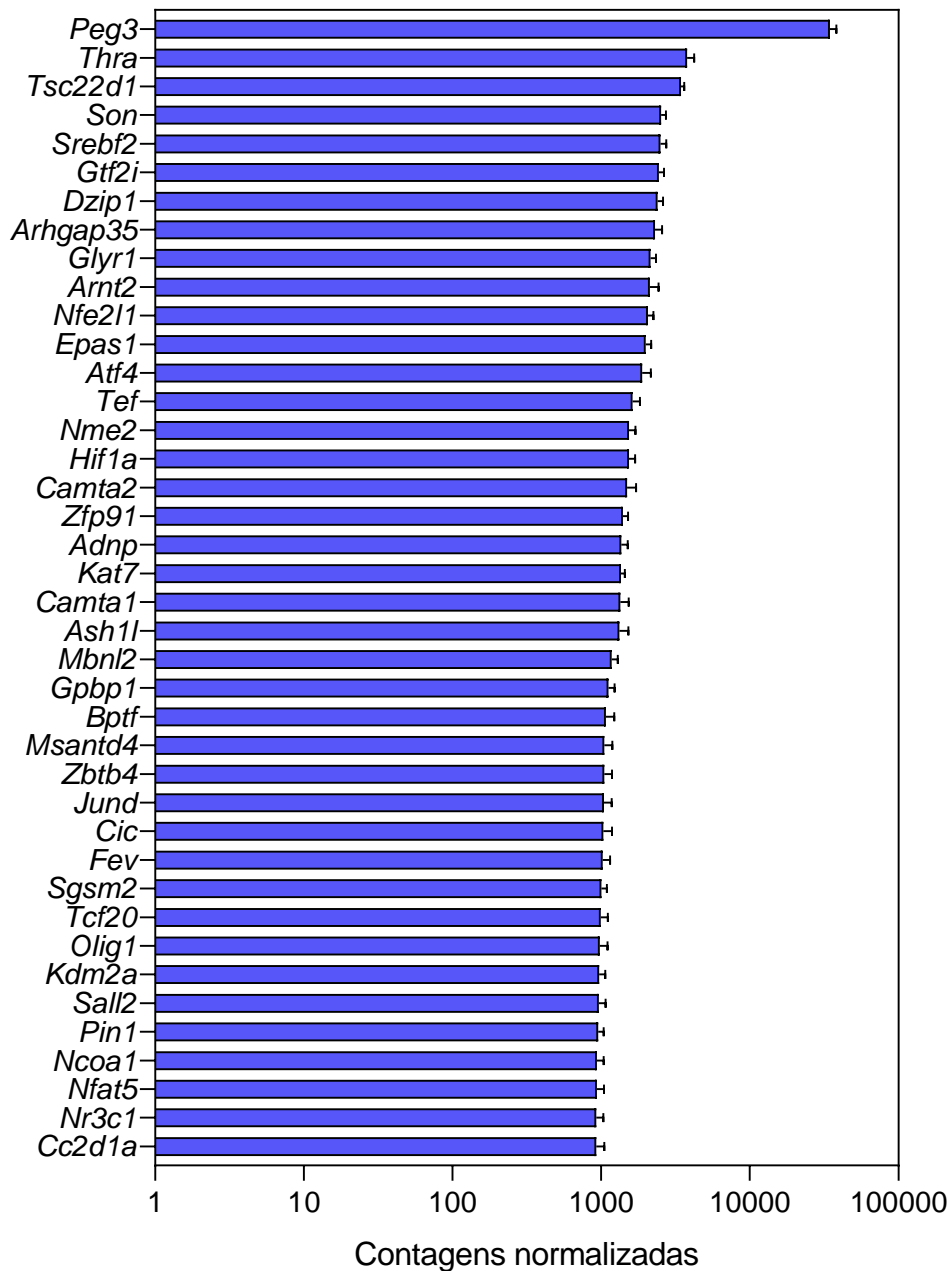


Figura 13. Principais fatores de transcrição expressos no núcleo dorsal da rafe categorizados de acordo com Lambert e colaboradores (2018). Os fatores de transcrição têm ganhado destaque nos anos recentes por sua capacidade em estimular ou inibir a transcrição de outros genes. O gene *Peg3* no topo da lista está envolvido em uma via de apoptose neuronal que é ativada por danos ao DNA, sendo, portanto, muito importante no SNC. O gene *Thra* é o segundo mais expresso e codifica o receptor alfa para hormônio tireoidiano, a proteína expressa tem a capacidade de se ligar ao DNA e inibir ou promover a transcrição gênica.

A figura de número 14 ilustra um diagrama de Venn contendo os genes significativamente alterados nos grupos experimentais. O grupo submetido à sobrecarga salina apresentou o maior número de genes alterados (22 no total), já o grupo de animais submetidos

à dieta pobre não apresentou alteração na expressão de nenhum gene no DRN e o grupo furosemida apresentou apenas 6 genes alterados no protocolo. Por este motivo, decidimos seguir somente com o grupo submetido à sobrecarga salina na etapa seguinte de validação.

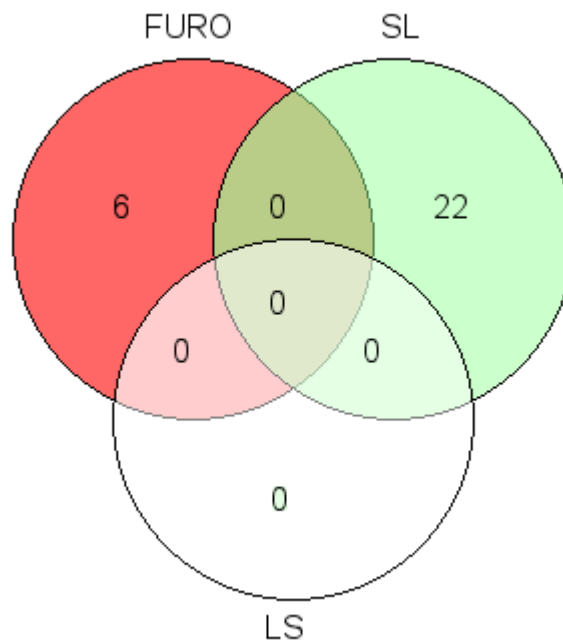


Figura 14. Diagrama de Venn mostrando a comparação entre os genes alterados nos grupos de animais submetidos à dieta pobre, à furosemida na água de beber e à sobrecarga salina. Um total de 22 genes foram alterados pela sobrecarga salina, 6 genes alterados pelo tratamento com a furosemida e nenhum gene alterado pela dieta pobre em sódio. Este gráfico foi gerado através da plataforma GeneVenn (<http://genevenn.sourceforge.net/>).

A figura de número 15 mostra um mapa de calor (*heatmap*) contendo os genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina. A análise do heatmap foi feita com ajuda da plataforma online CustVis (*METSALU; VILO, 2015*).

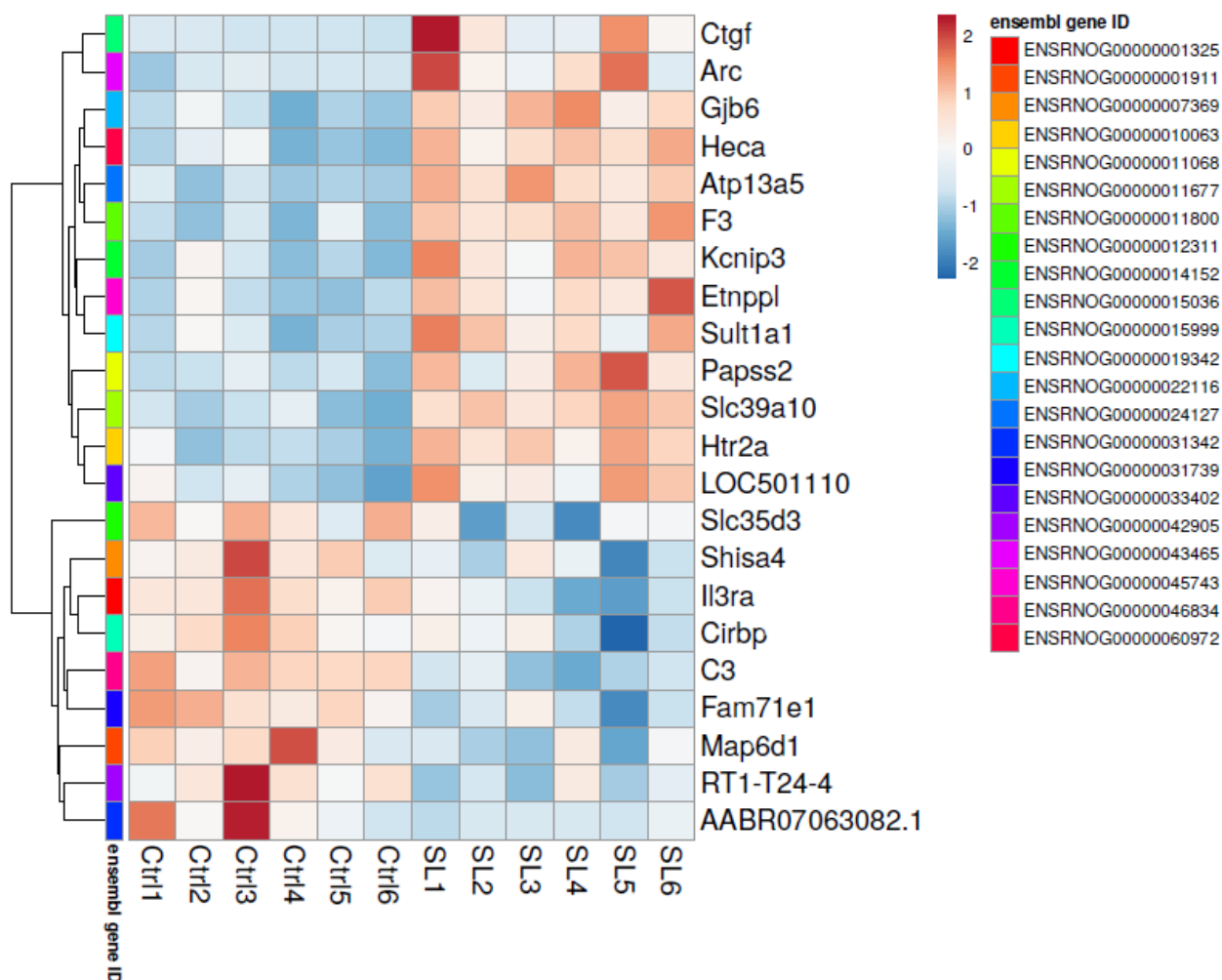


Figura 15. Mapa de calor mostrando os genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina. Com base no valor de p ajustado $<0,05$ determinamos 22 alvos diferencialmente expressos no DRN. Dentre eles, 13 apresentaram aumento em sua expressão e 9 apresentaram redução da expressão.

A figura 16 apresenta a expressão gênica de alvos que caracterizam o sistema serotoninérgico. Os genes *Slc6a4* e *Tph2* foram selecionados por serem altamente expressos em neurônios serotoninérgicos e por seus níveis serem particularmente altos no DRN. Analisamos ainda a expressão dos genes que codificam os receptores 5-HT1a e 5-HT2c que são também altamente expressos em neurônios serotoninérgicos. Na coluna da esquerda, estão os resultados obtidos através da RT-qPCR e na coluna da direita os resultados do RNAseq, mostrando a correspondência entre as técnicas.

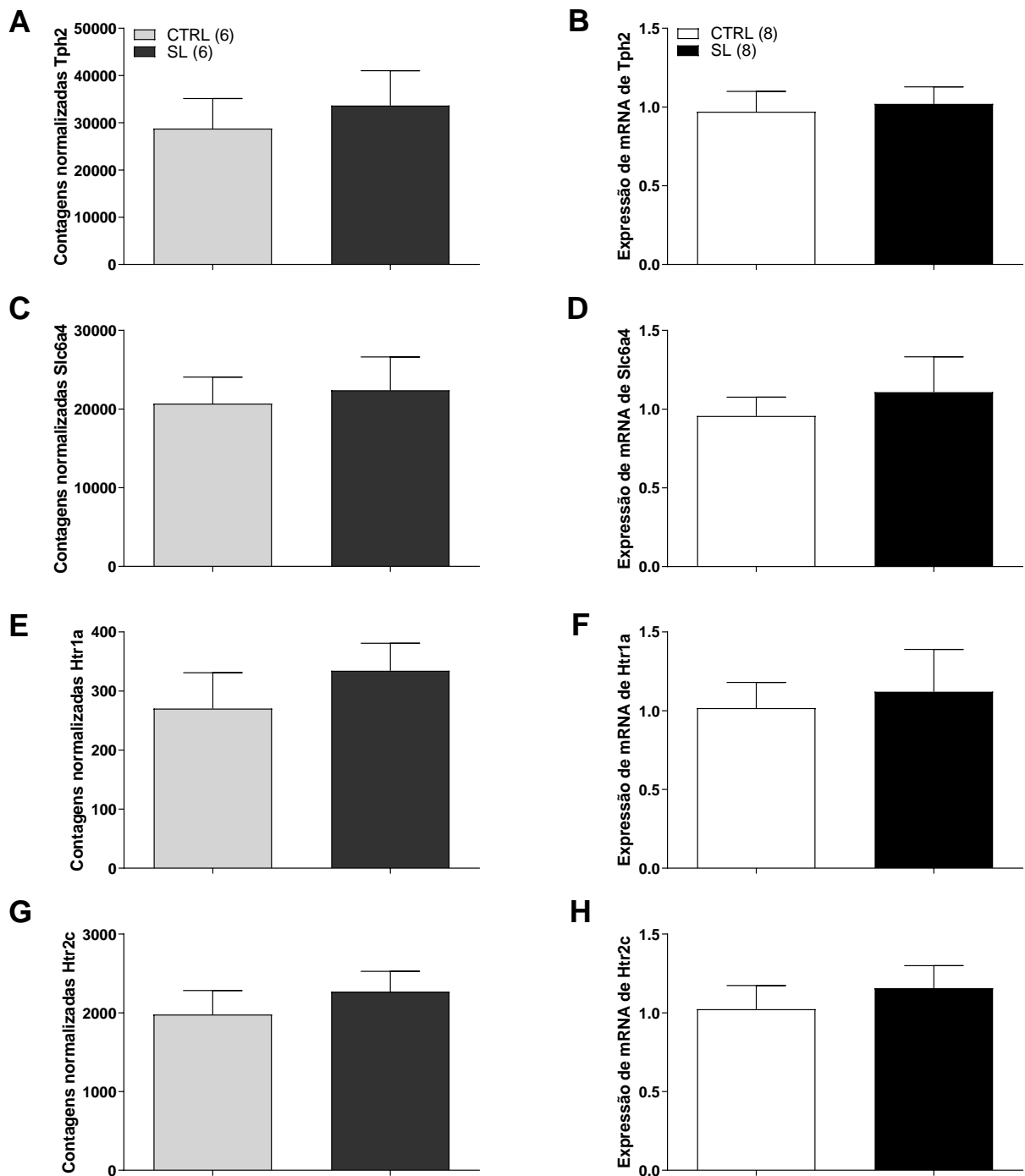


Figura 16. Resultados de RT-qPCR contendo os alvos que caracterizam o sistema 5-HT do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Em (A) e (B) são mostrados os níveis de expressão de mRNA de *Tph2* detectados por RT-qPCR e pelo RNAseq, respectivamente. Nos gráficos (C) e (D) estão os níveis de expressão do gene *Slc6a4* que codifica o transportador 5-HTT/SERT. Em seguida encontram-se os resultados do RT-qPCR (E) e RNAseq (F) do gene *Htr1a* que codifica o receptor para serotonina 5-HT1a. Em (G) e (H) observamos os níveis do gene *Htr2c* obtidos por RNAseq e RT-qPCR, respectivamente.

A figura a seguir apresenta a expressão gênica de alvos diferencialmente expressos no transcriptoma do DRN. A RT- qPCR validou com sucesso 3 genes dentre os 3 presentes na figura 17. Os genes Sult1a1 (Aumento de 125,5% no grupo SL; P=0,0003), Arc (aumento de 104,5% no grupo SL; P=0,0137) e Kcnp3 (Aumento de 40,8% SL; P=0,0301) mostraram-se significativamente suprarregulados tanto no RNAseq, quanto na RT-qPCR.

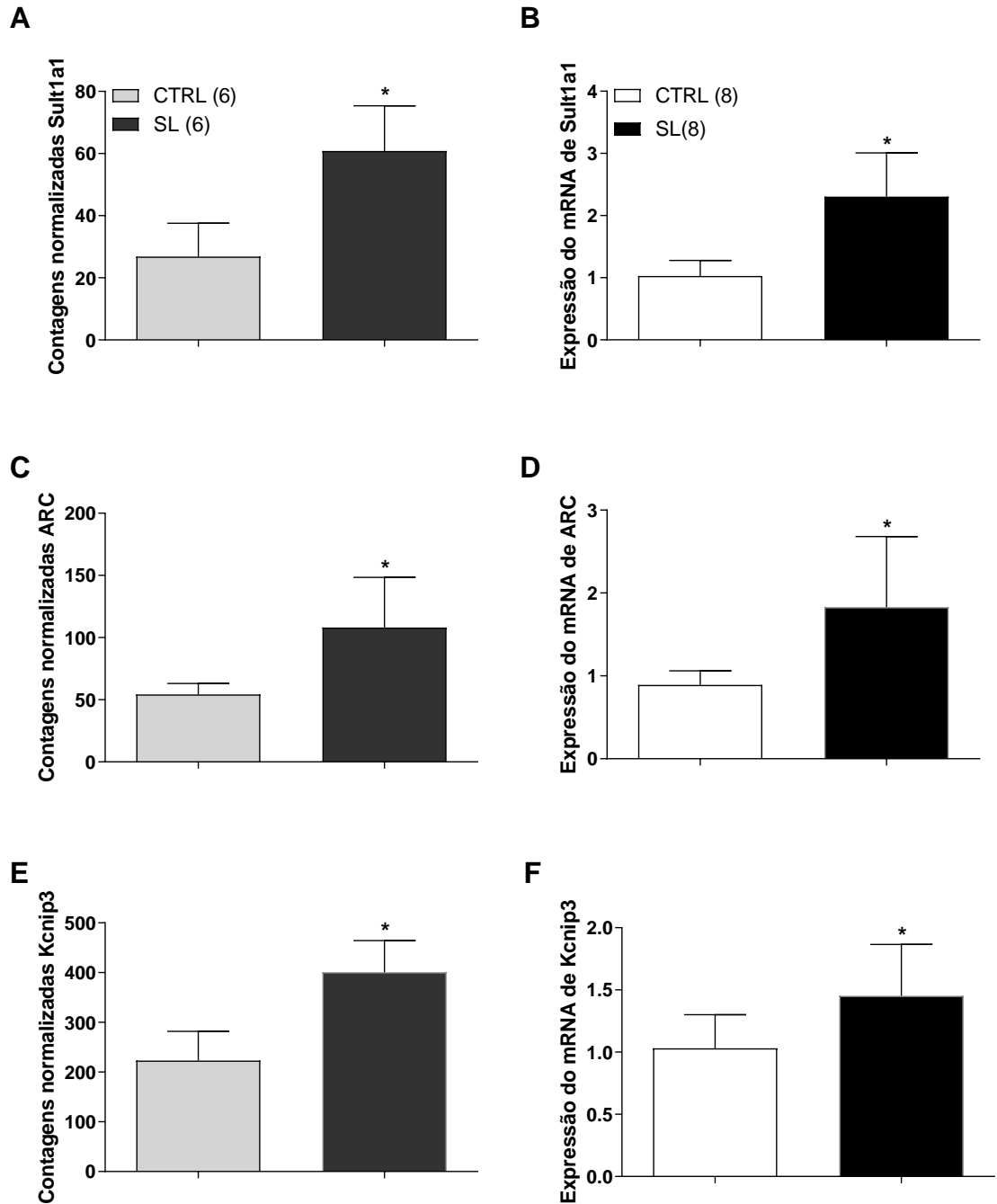


Figura 17. validação dos genes Sult1a1, Arc e Kcnp3 suprarregulados no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Em (A) a validação por RT-qPCR do gene Sult1a1 (SL $2,30 \pm 0,70$ vs CTRL $1,02 \pm 0,25$) e em (B) os valores obtidos pelo RNAseq. Em (C), a

validação do gene *Arc* (SL $1,82 \pm 0,85$ vs CTRL $0,89 \pm 0,16$) e em (D) o resultado do RNAseq. Em (E) o resultado de RT-qPCR do gene *Kcnip3* (SL $1,45 \pm 0,41$ vs CTRL $1,03 \pm 0,27$) e em (F) os valores do RNAseq. Os resultados de RNAseq estão na coluna da esquerda. Na coluna da direita, gráficos que ilustram as mudanças detectadas pelo RT-qPCR. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. * $P < 0,05$.

A figura de número 18 apresenta a expressão gênica de alvos diferencialmente expressos no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina. Ambos os genes *Etnppl* (SL aumento de 63,15%; $P=0,0017$) e *Ctgf* (SL aumento de 143,6%; $P=0,0001$) foram supregulados pela sobrecarga salina tanto no RNAseq quanto na RT-qPCR. O gene *Htr2a* do sistema serotoninérgico também teve sua expressão aumentada no RNAseq e validada pela RT-qPCR (SL aumento de 24,3%; $P=0,0290$). Na coluna da esquerda, estão representados os gráficos obtidos por meio do RNAseq e na direita, os resultados obtidos pela RT qPCR.

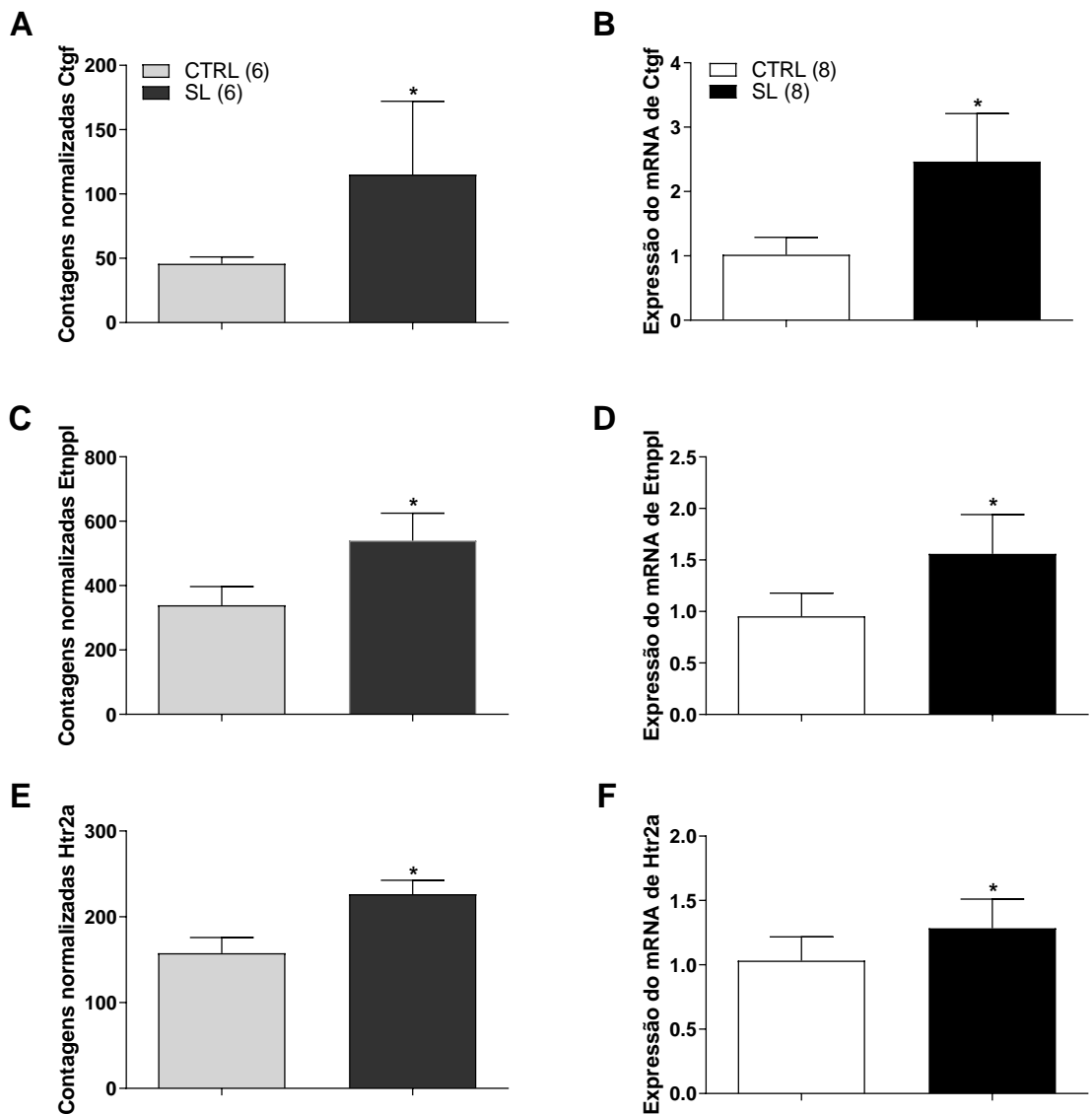


Figura 18. Validação dos genes *Ctgf* e *Etnppl* suprarregulados no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Em (A) o resultado da RT-qPCR para *Ctgf* (SL $2,46 \pm 0,74$ vs CTRL $1,01 \pm 0,27$) confirmando sua suprarregulação detectada pelo RNAseq (B). Em (C) a validação do aumento da expressão do gene *Etnppl* pela RT-qPCR (SL $1,55 \pm 0,38$ vs. CTRL $0,95 \pm 0,22$) e *Ctgf*) e em (D) os resultados obtidos pelo sequenciamento. Em (E) a validação do gene *Htr2a* por RT-qPCR (SL $1,28 \pm 0,22$ vs CTRL $1,03 \pm 0,18$) e em (F) os resultados do RNAseq. Na coluna da esquerda estão os resultados do RNAseq e na direita, gráficos que ilustram as mudanças detectadas pelo RT qPCR. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. $P < 0,05$.

A figura de número 19 apresenta a expressão gênica de alvos diferencialmente expressos no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina. A RT- qPCR validou com sucesso somente 1 gene dos 4 genes infrarregulados no RNAseq. Entre os genes que tiveram sua expressão reduzidas, somente o gene *C3* (SL redução de 18%; $P=0,0349$) teve a redução confirmada por RT-qPCR após a sobrecarga. O restante dos alvos (*Il3ra*, *Fam71e1* e *Slc35d3*) não foram alterados pela sobrecarga segundo validação por RT-qPCR.

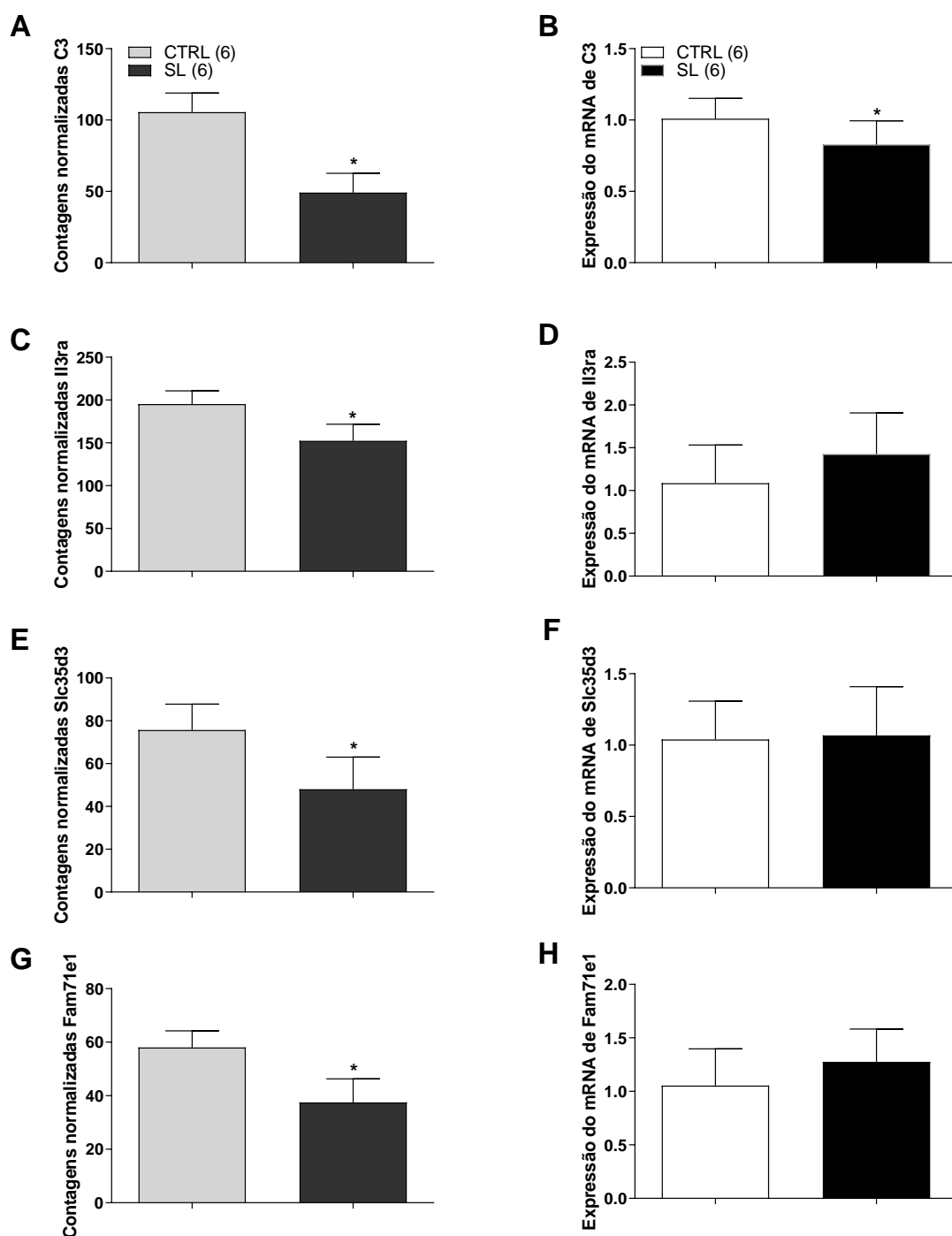


Figura 19. Validação dos genes C3, Il3ra, Slc35d3 e Fam71e1 alterados no transcriptoma do DRN de ratos submetidos à sobrecarga salina por quatro dias. Na coluna da esquerda, gráficos que ilustram as mudanças detectadas pelo RNAseq. Na coluna da direita os resultados da RT-qPCR, onde somente o gene C3 foi validado com sucesso (SL $0,82 \pm 0,16$ vs. CTRL $1,00 \pm 0,14$). O restante dos alvos infraregulados no RNAseq (Il3ra, Fam71e1 e Slc35d3) não foram alterados pela sobrecarga segundo validação por RT-qPCR. O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. * $P < 0,05$.

Na figura 20, observamos as análises realizadas a partir do sangue total (hematócrito) e plasma dos animais submetidos à privação alimentar por 48h. Como já bem descrito, os animais submetidos à privação alimentar apresentaram redução do peso corporal, representados na figura a seguir pelo valor de delta redução do peso corporal em 24h (FD $-12,8 \pm 6$ vs. CTRL $9,7 \pm 1,3$; $P=0,002188$) e 48h (FD $-37,8 \pm 4,4$ vs. CTRL $23,1 \pm 3,8$; $P<0,00001$). Houve aumento significativo somente no hematócrito (FD $46,0 \pm 4,0$ vs. CTRL $40,7 \pm 3,7$; $P=0,0118$).

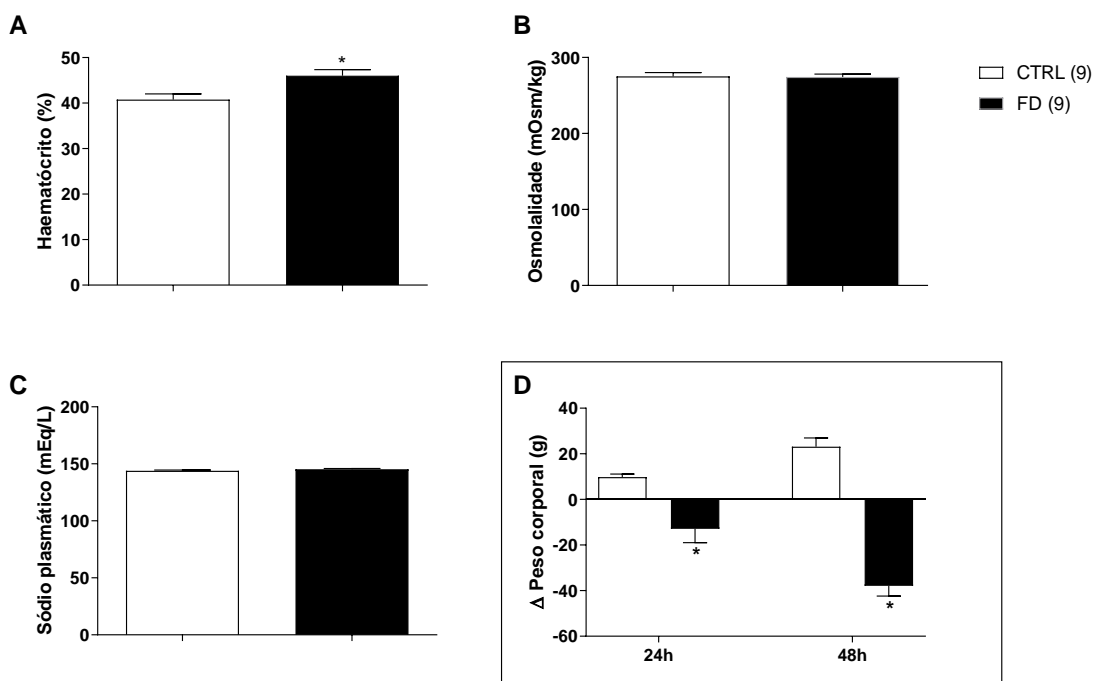


Figura 20. Parâmetros plasmáticos em animais submetidos à privação alimentar por 48h. Resultados do hematócrito (A), osmolalidade plasmática (B), sódio plasmático (C). O gráfico (D) mostra a variação de peso corporal dos animais durante o período de privação alimentar redução do peso corporal em 24h (FD $-12,8 \pm 6$ vs. CTRL $9,7 \pm 1,3$) e 48h (FD $-37,8 \pm 4,4$ vs. CTRL $23,1 \pm 3,8$). O número de animais utilizados está escrito entre parênteses. Os resultados foram analisados através de teste t de Student. * $P<0,05$.

A figura de número 21 ilustra um diagrama de Venn contendo os genes significativamente alterados nos grupos experimentais. O grupo submetido à privação alimentar por 48h apresentou alteração na expressão de 108 genes no total, enquanto o grupo submetido à sobrecarga salina apresentou alteração em 22 genes. Os dois grupos apresentaram 6 genes comumente alterados nos dois protocolos.

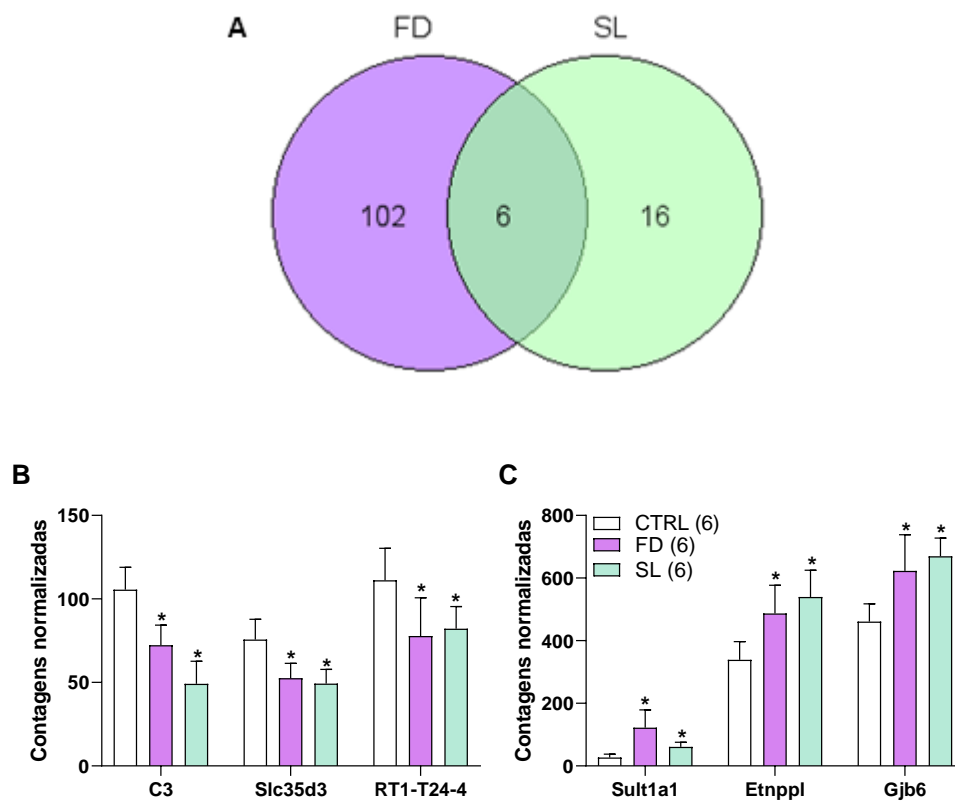


Figura 21. Diagrama de Venn mostrando a comparação entre os genes alterados nos grupos de animais submetidos à privação alimentar por 48h e à sobrecarga salina e níveis de expressão dos genes no RNAseq. Em A diagrama de Venn indicando que o grupo submetido à privação alimentar apresentou alteração na expressão de 108 genes no total, destes, 6 genes também foram alterados pela sobrecarga salina. O grupo SL apresentou um total de 22 genes alterados no RNAseq. Em (B e C) as contagens normalizadas obtidas pelo RNAseq indicando a alteração dos genes em resposta à privação alimentar por 48h e à sobrecarga salina.

Tabela 3. Descrição dos genes alterados tanto na sobrecarga salina quanto na privação alimentar por 48h.

<i>ID Gene</i>	<i>ID Ensembl</i>	<i>Descrição</i>
<i>C3</i>	ENSRNOG00000046834	Complemento C3
<i>Etnppl</i>	ENSRNOG00000045743	Etanolamina-fosfato-fosfo-liase
<i>Gjb6</i>	ENSRNOG00000022116	Proteína de junção comunicante beta 6
<i>RT1-T24-4</i>	ENSRNOG00000042905	RT1 classe I, locus T24, gene 4
<i>Slc35d3</i>	ENSRNOG00000012311	Transportador de solute família 35, membro D3
<i>Sult1a1</i>	ENSRNOG00000019342	sulfotransferase família 1A membro 1

A figura de número 22 mostra um mapa de calor (*heatmap*) contendo os genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à privação alimentar por 48h. Dentre os genes diferencialmente expressos neste protocolo, destaca-se a infrarregulação dos genes

Vip, *Crh* e *Glud1* A análise do heatmap foi feita com ajuda da plataforma online CustVis (METSALU; VILO, 2015).

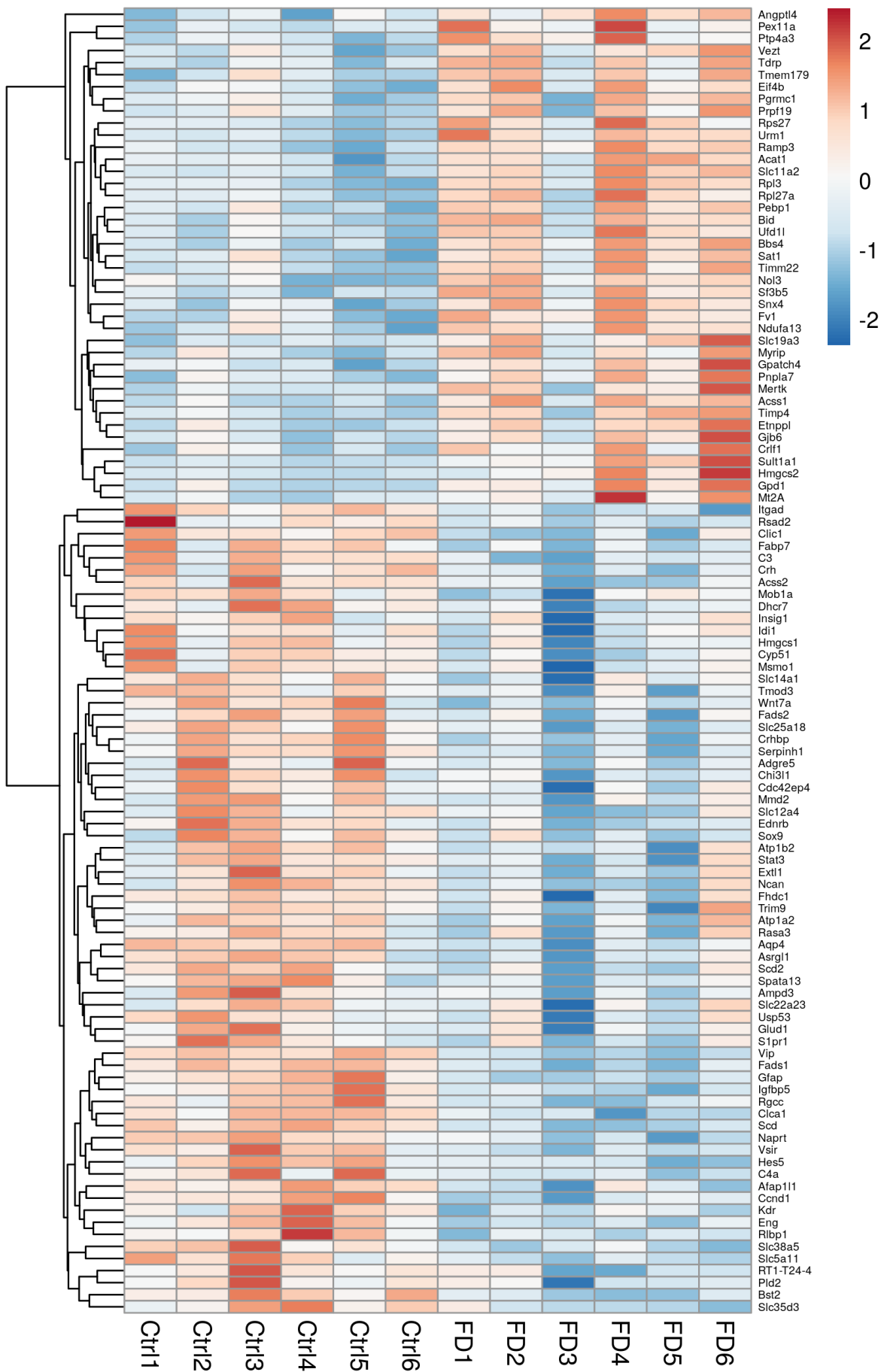


Figura 22. Mapa de calor mostrando os genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à privação alimentar por 48h. O código de cores revela os diferentes níveis de expressão dos genes alterados, o vermelho representa os genes que tiveram sua expressão aumentada e o azul representa os genes que tiveram sua expressão diminuída.

Na figura de número 23, observamos um diagrama contendo os componentes celulares relacionados aos genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à privação alimentar por 48h.

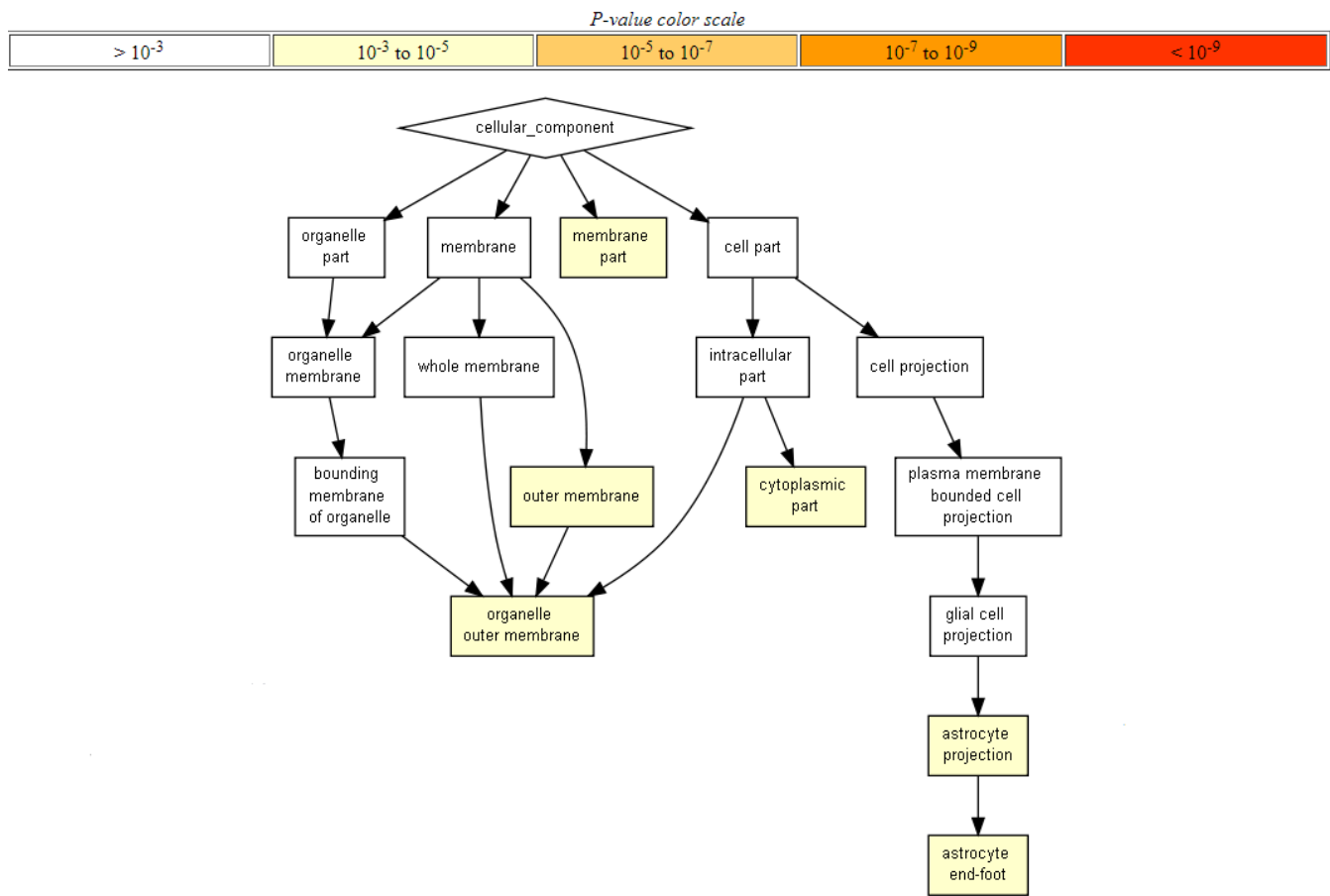


Figura 23. Análise de enriquecimento de componente celular, mostrando as principais regiões celulares identificadas na lista de genes. Os genes que apresentaram maior enriquecimento correspondem a componentes de astrócitos, sendo eles Aqp4, Atp1b2 e Gfap (tabela 3 nos anexos). Imagem obtida através da plataforma GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>).

A figura de número 23 traz uma representação gráfica dos valores de RNAseq dos genes diferencialmente expressos no DRN de ratos submetidos à privação alimentar por 48h. A figura a seguir é um desdobramento do diagrama anterior e destaca os genes relacionados aos astrócitos segundo a análise de enriquecimento.

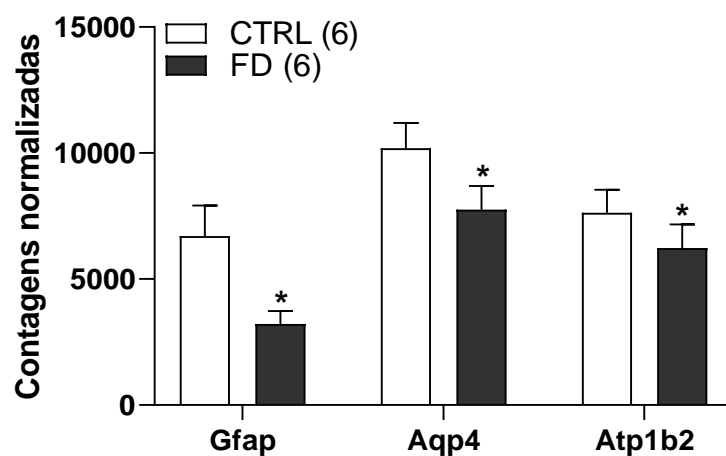


Figura 24. Valores de expressão obtidos pelo RNAseq dos alvos identificados pela análise de enriquecimento de componente celular. Os genes Aqp4 (FD 7.762 ± 935 vs. CTRL 10.198 ± 988), Atp1b2 (FD 6.234 ± 97 vs. CTRL 7.636 ± 66) e Gfap (FD 3.213 ± 518 vs. CTRL 6.700 ± 1214) foram identificados como componentes astrocitários alterados no RNAseq (descrição na tabela 3 nos anexos). * $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os modelos usados neste trabalho foram escolhidos com o intuito de verificar como a sobrecarga corporal de sódio ou sua depleção influenciariam a expressão gênica no DRN. Apesar de ter induzido discreta redução na natremia e aumento no hematócrito, nosso modelo de depleção de sódio pelo tratamento com furosemida na água de beber por 4 dias não alterou significativamente a osmolalidade plasmática como esperado (DUTRA et al., 2020; LUNDY et al., 2003). Em experimentos anteriores, quando avaliamos a ingestão diária de líquidos nestes animais, observamos uma grande ingestão de solução contendo furosemida quando comparados ao controle, efeito mais proeminente no último dia de tratamento (4º dia). Além disso, é necessário considerar também que o uso por via oral de um fármaco tipicamente injetável pode diminuir sua biodisponibilidade devido ao efeito de metabolismo de primeira passagem (BOLES PONTO; SCHOENWALD, 1990a, 1990b; LEE; CHIOU, 1983). A biodisponibilidade deste fármaco por via oral é em torno de 60%: em trabalhos recentes, foi visto que isto pode ser significativamente influenciado por transportadores presentes nos enterócitos (CHAPA et al., 2020). Além disso, outra possibilidade seria a mobilização de sódio presente no reservatório cutâneo induzida ao longo dos 4 dias de tratamento com furosemida. Já foi demonstrado que o tratamento agudo com furosemida é capaz de levar ao aumento do sódio osmoticamente ativo na pele, para então ser mobilizado para a circulação (LOPES-MENEZES et al., 2019). Por estes motivos e pelo resultado modesto de genes diferencialmente expressos no transcriptoma (apenas 6), decidimos prosseguir com a validação dos genes alterados somente nos grupos sobrecarga salina e privação alimentar. Com os grupos submetidos à sobrecarga salina, à dieta pobre em sódio e ao tratamento com furosemida o intuito era de avaliar a expressão gênica no DRN em face às alterações da homeostase hidromineral causadas pelos protocolos que deflagram a sede e/ou o apetite ao sódio (BADAUÊ-PASSOS et al., 2007; GODINO et al., 2013; MECAWI et al., 2013). Porém, já é muito bem descrito que a desidratação causada pela sobrecarga salina leva a anorexia e consequente redução do peso corporal (BOYLE et al., 2013; GREENWOOD et al., 2015b), de forma que este modelo se sobrepõe parcialmente à privação alimentar. Além disso, seis alvos (*C3*, *Etnppl*, *Gjb6*, *RT1-T24-4*, *Slc35d3* e *Sult1a1*) foram alterados em ambos os protocolos, ressaltando uma convergência, mesmo que parcial, entre os dados obtidos no modelo da sobrecarga salina e de privação alimentar. Assim, os resultados serão discutidos separadamente, mas com algumas intersecções, sempre que cabível.

Como era esperado, a sobrecarga salina por quatro dias levou ao aumento significativo do hematócrito, sódio e osmolalidade plasmática, causando um quadro de desidratação intracelular. Além disto, este modelo experimental também induz a redução da ingestão alimentar, levando à perda de peso (GREENWOOD et al., 2015b). Ao analisarmos o transcriptoma do DRN destes animais, notamos um total de 22 genes significativamente alterados, um número bem modesto quando comparado a experimentos semelhantes usando núcleos hipotalâmicos (GREENWOOD et al., 2015b; HINDMARCH et al., 2006; JOHNSON et al., 2015; STEWART et al., 2011). Todavia, estes resultados encontram respaldo na literatura, onde alterações na expressão gênica no DRN mostram-se bem mais discretas quando comparadas às alterações em núcleos hipotalâmicos, em modelo de estresse social crônico (SMAGIN et al., 2016). Vale ressaltar que isso parece depender do modelo utilizado e o tempo de tratamento dos animais, uma vez que experimentos crônicos parecem gerar mudanças mais significativas (LOUGHRIDGE et al., 2013; MCCLINTICK et al., 2011). Dito isso, a validação dos alvos pela RT-qPCR mostrou que a maior parte das mudanças detectadas pela análise do transcriptoma utilizando o RNAseq corresponde a alterações reais na expressão gênica. A seguir, um resumo com as principais informações acerca dos alvos validados:

Kcni3 (Potassium voltage-gated channel interacting protein 3)

Um gene notável é o *Kcni3* que codifica uma proteína membro da família neuronal de sensores de cálcio e parece estar envolvido em uma série de funções celulares, podendo funcionar como um repressor transcricional ou até mesmo como modulador de canais ou receptores, dentre eles os canais para potássio Kv4, glutamatérgicos do tipo NMDA e mecanossensíveis de potencial transitório do tipo vanilóide TRPV1 (GUO et al., 2019; RAMACHANDRAN et al., 2012), modulando potencialmente a excitabilidade neuronal ao favorecer a hiperpolarização. Através de experimentos com animais knockout para *Kcni3*, esse canal tem sido implicado na sensibilidade à dor e na consolidação de memória relacionada ao medo condicionado (ALEXANDER et al., 2009; GUO et al., 2019; TIAN et al., 2018). O aumento da expressão deste gene em nosso protocolo pode indicar uma alteração da excitabilidade neuronal no DRN causado pela sobrecarga salina.

Sult1a1 (Sulfotransferase Family 1A member 1)

O gene *Sult1a1* codifica uma enzima pertencente ao grupo das sulfotransferases (SULTs), enzimas de metabolismo de fase II muito importantes para a metabolização de drogas e de diversos compostos xenobióticos (COOK; WANG; LEYH, 2015). As SULTs catalisam as reações de biotransformação de diversos hormônios e neurotransmissores, geralmente impedindo que estes se liguem a seus receptores (COOK; WANG; LEYH, 2015). As ações destas enzimas parecem variar de acordo com o tecido onde são encontradas e o substrato utilizado, a *Sult1a1*, em particular, apresenta grande variação genética em humanos, o que pode corresponder a diferenças de metabolização de compostos endógenos ou fármacos (SULTA, 2014). Greenwood (GREENWOOD et al., 2015c) demonstrou o aumento da corticosterona em animais submetidos à sobrecarga salina, reforçando a influência dos glicocorticoides neste modelo. Em artigo recente, o aumento da expressão desta enzima foi relacionada ao estresse por contenção (BALYAN et al., 2019), dado que corrobora com trabalho relacionando o aumento da expressão do gene *Sult1a1* à ação de glicocorticoides (JUSZCZAK; STANKIEWICZ, 2018). Com isso, o aumento da expressão deste gene em nosso modelo pode estar relacionado ao estresse osmótico por ele induzido.

Arc (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein)

O *Arc*, também chamado *Arg3.1*, é considerado um gene precoce imediato que tem sido implicado na plasticidade sináptica e formação de memórias (MOORMAN; MELLO; BOLHUIS, 2011; NIKOLAIENKO et al., 2018). A alteração deste gene pela sobrecarga salina pode indicar uma possível plasticidade neuronal em resposta à sobrecarga de sódio. A proteína codificada por este gene apresenta uma capacidade incomum de formar estruturas semelhantes a capsídeos virais que encapsulam o RNA, podendo transferi-lo a outras células (PASTUZYŃ et al., 2018). É um gene bastante estudado nos últimos anos, mas cujas funções ainda não foram completamente esclarecidas (ZHANG et al., 2020). Representa assim, um interessante candidato para avaliações mais detalhadas sobre seu papel específico no DRN.

Etnppl (Ethanolamine-phosphate phosphor-lyase)

O gene *Etnppl* (anteriormente conhecido como *Agxt211*) codifica uma enzima implicada no catabolismo da fosfoetanolamina, e que permanece, até o presente momento pouquíssimo

estudado (LEVENTOUX et al., 2020; VEIGA-DA-CUNHA et al., 2012). São poucas as fontes na literatura que citam o nome atual ou mesmo anterior desse gene, dentre tais, destaca-se um trabalho de 2008 que indicou o envolvimento do gene *Agxt211/Etnppl* em transtornos como bipolaridade e esquizofrenia (SHAO; VAWTER, 2008). Posteriormente, foi mostrado que esse gene se encontra expresso de forma relevante no encéfalo, podendo ser relacionado ao estresse social (STANKIEWICZ et al., 2014). Por fim, foi demonstrado que este gene pode estar relacionado à inibição do crescimento de gliomas, podendo possuir outras funções ainda pouco exploradas no SNC (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2020; LEVENTOUX et al., 2020). Portanto, é possível que seu aumento na sobrecarga salina esteja relacionado a alterações na morfologia das células da glia, como o processo de retração glial já descrito no hipotálamo (CHOE et al., 2016).

Ctgf (Ccn2 – Cellular communication network factor 2)

O fator de crescimento do tecido conectivo (Ctgf ou Ccn2) promove adesão e migração celular em diversos tecidos (GONZALEZ et al., 2018). Ele é amplamente expresso no cérebro, e geralmente encontra-se suprarregulado em doenças crônicas (ERCAN et al., 2017; GONZALEZ et al., 2018). Entretanto, o seu aumento pode estar relacionado a uma estratégia de neuroproteção, facilitando a captura de elementos nocivos aos neurônios pelas células da glia (YANG et al., 2017). É possível que seu aumento em nosso protocolo esteja relacionado a uma maior interação de células da glia a fim de aumentar o *clearance* do próprio sódio ou outros elementos nocivos produzidos por apoptose.

C3 (Complement C3)

Os componentes do sistema complemento são majoritariamente sintetizados no fígado, mas apresentam também síntese local em outros tecidos como o cérebro, em especial pelas células endoteliais e astrócitos (ALEXANDER, 2018). O gene C3 codifica proteína de mesmo nome que compõe este sistema e tem sido relacionada não só a defesa do órgão, como ao seu desenvolvimento adequado (GORELIK et al., 2017). O C3 está possivelmente envolvido também na regulação do brotamento sináptico e problemas em sua expressão e/ou funcionamento podem estar ligados à gênese da neuro-inflamação relacionada a distúrbios psiquiátricos (DRUART; LE MAGUERESSE, 2019). Em nosso modelo de sobrecarga salina, é possível que este gene esteja implicado num processo de plasticidade sináptica, ou seja um indicador do processo de neuro-inflamação envolvendo ativação da micróglia.

Htr2a (5-hydroxytryptamine receptor 2a)

Dentre os genes validados, o que nos chamou mais atenção foi o Htr2a, que codifica o receptor para serotonina 5-HT_{2a}. Esse resultado é particularmente interessante porque os receptores 5-HT_{2a} parecem estar envolvidos na liberação do neurotransmissor inibitório GABA, sendo um potencial alvo farmacológico (BOOTHMAN; SHARP, 2005; GUIARD; DI GIOVANNI, 2015; QUÉRÉE; PETERS; SHARP, 2009). Um outro ponto interessante é que esse receptor tem a capacidade de formar heterodímeros com outros GPCRs, incluindo o receptor para glutamato mGluR2 e para dopamina D2, o que poderia levar à regulação de sua sinalização de forma independente de ligante (GUIARD; DI GIOVANNI, 2015). Este receptor parece ainda estar envolvido na resposta de neurônios serotoninérgicos aos antidepressivos, tendo a capacidade de reduzir a taxa de disparo neuronal após administração aguda desta classe de

fármacos (QESSEVEUR et al., 2016; QUESSEVEUR et al., 2013). Este conjunto de evidências poderia indicar uma redução na atividade do sistema serotoninérgico em nosso modelo de sobrecarga salina, a fim de inibir a ingestão de sódio.

Alguns pontos em comum podem ser identificados a partir destes genes, o primeiro é o aumento da expressão de do *Sult1a1* (BALYAN et al., 2019; JUSZCZAK; STANKIEWICZ, 2018) e *Etnppl* (STANKIEWICZ et al., 2014) em modelos de estresse. Isso se encaixa em nosso modelo, uma vez que a sobrecarga salina gera um estresse osmótico nos animais, cursando com aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides (ELIAS; CAMPOS; MOREIRA, 2002; GREENWOOD et al., 2015b). Estes, por sua vez, têm a capacidade de alterar a expressão gênica em diversos tecidos (GREENWOOD et al., 2015a; JUSZCZAK; STANKIEWICZ, 2018). O segundo ponto é o envolvimento de alguns destes alvos no fenômeno de plasticidade sináptica (*Arc* e *C3*), o que poderia indicar um processo de adaptação neuronal e/ou glial frente ao desafio imposto pela sobrecarga salina. Já é bem descrito na literatura que durante a hipernatremia, as células da glia no SON sofrem mudanças em sua morfologia, causando intensa retração glial (CHOE et al., 2016; HATTON, 2002; WANG; PARPURA, 2018). Apesar deste processo ser bem caracterizado no SON, nunca foi descrito em áreas como o DRN. Como alguns dos alvos identificados em nossos experimentos são expressos por neurônios, e outros por células da glia, é provável que as alterações plásticas envolvam tanto neurônios quanto células gliais (MEDEROS; GONZÁLEZ-ARIAS; PEREA, 2018; PEREZ-CATALAN; DOE; ACKERMAN, 2021). Vale ressaltar que a sobrecarga salina pode ser usada também como modelo de anorexia induzida por desidratação, neste contexto, foi demonstrado que ocorre redução da densidade de astrócitos no corpo caloso de ratos submetidos ao modelo, e que isso ocorre de forma mais discreta em animais que tiveram sua dieta restringida (REYES-HARO et al., 2016). Isto reforça o papel das células da glia tanto no estresse osmótico quanto na ingestão alimentar.

Os genes alterados em comum com a privação alimentar parecem sustentar essa hipótese. Dentre os seis genes diferencialmente expressos em ambos os grupos, quatro foram selecionados para a validação, *Etnppl*, *C3*, *Sult1a1* e *Slc35d3* e somente o último não foi validado. Os grupos também apresentaram em comum o aumento da expressão do gene *Gjb6* que codifica a proteína conexina 30. Ao realizar uma análise de enriquecimento funcional, observamos que uma parte significativa dos genes alterados na privação alimentar estão relacionadas aos astrócitos, incluindo o *Gjb6*. A proteína codificada por este gene foi por muito tempo considerada exclusiva de astrócitos no SNC, mas localizada também em grupos de pericitos no encéfalo do camundongo (MAZARÉ et al., 2018).

É possível que tanto células da glia, quanto neurônios e quiçá pericitos tenham sua expressão gênica alterada nestes protocolos, indicado pelas alterações de genes expressos em neurônios (*Htr2a*) e em células da glia (*Gjb6* e *Gfap*). Vale ressaltar que apesar de conter grande concentração de neurônios serotoninérgicos, outras populações neuronais estão presentes no DRN. Técnicas mais modernas de sequenciamento de célula única permitiram fazer um mapeamento mais fidedigno deste núcleo, mostrando a alta diversidade de fenótipos neuronais (OKATY et al., 2015). Estes estudos têm mostrado que grupamentos de neurônios no DRN podem ser identificados através dos transcritos por eles expressos, podendo ajudar num futuro próximo a caracterizar subnúcleos ou grupamentos com conexões específicas com outros núcleos encefálicos, formando verdadeiros sub-sistemas (HUANG et al., 2019).

Um dos resultados mais interessantes obtidos no modelo de privação alimentar foi a redução da expressão do *Vip*, que já foi caracterizado no DRN ainda na década de 90 (PETIT

et al., 1995). Mais tarde, foi demonstrada a co-localização do neuropeptídeo com a dopamina, definindo o fenótipo destes neurônios como dopaminérgico (DOUGALIS et al., 2012; MATTHEWS et al., 2016). Estudos mais recentes de transcriptomas de célula única confirmaram o fenótipo dopaminérgico destes neurônios, a segunda população mais abundante no DRN, após os neurônios 5-HT (HUANG et al., 2019). Talvez essa alteração esteja relacionada a uma modulação das vias de recompensa relacionadas aos comportamentos motivados, a fim de orientar a busca por alimento durante o estado de privação alimentar.

Apesar da facilidade em se determinar os fenótipos celulares através do RNAseq de célula única, informações valiosas podem ser perdidas durante a separação das células. Portanto, o sequenciamento de núcleos intactos segue como uma valiosa ferramenta para investigação de alvos gênicos. A associação das informações de ambas as técnicas é fator essencial para que no futuro possamos entender melhor as bases moleculares dos sistemas neurais envolvidos na gênese dos comportamentos motivados.

7 CONCLUSÃO

A sobrecarga salina por quatro dias foi capaz de alterar a expressão gênica no DRN de ratos Wistar. Os dados obtidos no RNAseq foram validados com sucesso pela RT-qPCR com uma taxa de sucesso de setenta por cento. Apesar de não ser possível precisar os fenótipos celulares, os resultados indicam que tais genes alterados podem ser expressos tanto em neurônios quanto em células da glia.

Os resultados da expressão gênica diferencial da privação alimentar, apesar de ainda não validados, corroboram os resultados observados na sobrecarga salina. Os genes alterados em ambas as condições podem estar relacionados ao estresse ocasionado pelos protocolos experimentais, mas isso só se justifica em parte dos resultados. Esses genes convergentes são excelentes candidatos a investigações futuras para avaliar as possíveis interações entre neurônios e células da glia no DRN. Além disso, alguns dos alvos alterados somente em um dos protocolos possibilitam o uso de fármacos específicos voltados às proteínas codificadas por estes genes, o que abre caminho para diversos trabalhos futuros.

PERSPECTIVAS

Será necessário ainda avaliar a síntese proteica dos alvos em questão para verificar se as alterações gênicas resultaram em alteração das proteínas. Por fim, experimentos funcionais para verificar se há relação de causalidade nas alterações observadas são essenciais para fazer a ponte entre a biologia molecular e a fisiologia. Neste contexto, a alteração do gene *Htr2a* é particularmente interessante visto que sua manipulação farmacológica é relativamente fácil pela abundância de drogas que afetam o funcionamento do receptor. Deste modo, seria possível canular o DRN de ratos Wistar e injetar agonistas e/ou antagonistas 5-HT_{2a} para avaliar as respostas comportamentais a partir da manipulação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. C. et al. The role of calsenilin/DREAM/KChIP3 in contextual fear conditioning. **Learning and Memory**, v. 16, n. 3, p. 167–177, 2009.

ALEXANDER, J. J. Blood-brain barrier (BBB) and the complement landscape. **Molecular Immunology**, v. 102, n. June, p. 26–31, 2018.

ANAND, BK AND BROBECK, J. HYPOTHALAMIC CONTROL OF FOOD INTAKE IN RATS AND CATS. 1951.

ANDERSSON, B. Regulation of water intake. **Physiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 582, 1978.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.

AZMITIA, E. C. **Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin**. [s.l: s.n.].

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 179, n. 3, p. 641–667, 1978.

BADAUÊ-PASSOS, D. et al. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by depletion-induced sodium ingestion. **Experimental Neurology**, v. 206, n. 1, p. 86–94, 2007.

BALYAN, R. et al. Repeated restraint stress upregulates rat sulfotransferase 1A1. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 265–273, 2019.

BARKHOLT, P. et al. Global transcriptome analysis of rat hypothalamic arcuate nucleus demonstrates reversal of hypothalamic gliosis following surgically and diet induced weight loss. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 2, p. 189–287, 1996.

BOLES PONTO, L. L.; SCHOENWALD, R. D. Furosemide (Frusemide): A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Review (Part I). **Clinical Pharmacokinetics**, v. 18, n. 6, p. 460–471, 1990a.

BOLES PONTO, L. L.; SCHOENWALD, R. D. Furosemide (Frusemide): A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Review (Part I). **Clinical Pharmacokinetics**, v. 18, p. 460–471, 1990b.

BOOTHMAN, L. J.; SHARP, T. A role for midbrain raphe γ aminobutyric acid neurons in 5-hydroxytryptamine feedback control. **NeuroReport**, v. 16, n. 9, p. 891–896, 2005.

BOTTARI, S. P. et al. **Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications** *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1993.

BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H.; RICHARD, D. **Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation.***Frontiers in neuroendocrinology*, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302284710107>>

BOYLE, C. N. et al. Dehydration-Anorexia Derives From A Reduction In Meal Size, But Not Meal Number. **Physiol Behav.**, v. 105, n. 4, p. 305–314, 2013.

BREISCH, S., ZEMLAN, F., & HOEBEL, B. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. **Science**, v. 192(4237), p. 382–385, 1976.

CAMPBELL, J. N. et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 484–496, 2017.

CANCELLIERE, N. M.; FERGUSON, A. V. Subfornical organ neurons integrate cardiovascular and metabolic signals. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 2, p. R253–R262, 2017.

CAVALCANTE-LIMA et al. Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica [et al]**, v. 38, n. 11, p. 1669–1675, 2005a.

CAVALCANTE-LIMA, H. R. et al. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neuroscience letters**, v. 374, n. 1, p. 5–10, 2005b.

CHAPA, R. et al. Contribution of Uptake and Efflux Transporters to Oral Pharmacokinetics of Furosemide. **ACS Omega**, v. 5, n. 51, p. 32939–32950, 2020.

CHOE, K. Y. et al. Effects of Salt Loading on the Morphology of Astrocytes in the Ventral Glia Limitans of the Rat Supraoptic Nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 4, 2016.

CHOE, K. Y.; OLSON, J. E.; BOURQUE, C. W. Taurine release by astrocytes modulates osmosensitive glycine receptor tone and excitability in the adult supraoptic nucleus. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 36, p. 12518–12527, 2012.

CIURA, S., B. C. W. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 35, p. 9069–9075, 2006.

COLIN, C.; HINDMARCH, T.; FERGUSON, A. V. Physiological roles for the subfornical organ : a dynamic transcriptome shaped by autonomic state. v. 6, n. August 2014, p. 1581–1589, 2016.

COOK, I.; WANG, T.; LEYH, T. S. Sulfotransferase 1A1 Substrate Selectivity: A Molecular Clamp Mechanism. **Biochemistry**, v. 54, n. 39, p. 6114–6122, 2015.

DE GASPARO, M. et al. International Union of Pharmacology . XXIII . The Angiotensin II Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 415–472, 2000.

- DOUGALIS, A. G. et al. Functional properties of dopamine neurons and co-expression of vasoactive intestinal polypeptide in the dorsal raphe nucleus and ventro-lateral periaqueductal grey. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 10, p. 3322–3332, 2012.
- DRUART, M.; LE MAGUERESSE, C. Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. August, p. 1–13, 2019.
- DUTRA, S. G. V et al. Erratum: Physiological and transcriptomic changes in the hypothalamic-neurohypophysial system after 24 h of furosemide-induced sodium depletion (Neuroendocrinology. DOI: 10.1159/000505997). **Neuroendocrinology**, v. 111, n. 1–2, p. 178, 2020.
- ELIAS, L. L. K.; CAMPOS, A. D.; MOREIRA, A. C. The opposite effects of short- and long-term salt loading on pituitary adrenal axis activity in rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, n. 4, p. 207–211, 2002.
- EPSTEIN, A. N.; FITZSIMONS, J. T.; ROLLS, B. J. Drinking induced by injection of angiotensin into the rain of the rat. **The Journal of physiology**, v. 210, p. 457–474, 1970.
- ERCAN, E. et al. Neuronal CTGF/CCN2 negatively regulates myelination in a mouse model of tuberous sclerosis complex. **The Journal of experimental medicine**, v. 214, n. 3, p. 681–697, 2017.
- FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L. Rapid elicitation of salt appetite by an intravenous infusion of angiotensin II in rats. **American Physiological Society**, 1996.
- FITZSIMONS, B. J. T.; SIMONS, B. J. The effect on drinking in the rat of intravenous infusion of angiotensin , given alone or in combination with other stimuli of thirst. **J. Physiol.**, v. 203, p. 45–57, 1969.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin , Thirst , and Sodium Appetite. **Physiological reviews**, v. 78, p. 583–686, 1998.
- FLETCHER, P. J.; DAVIES, M. Dorsal raphe microinjection of 5-HT and indirect 5-HT agonists induces feeding in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 184, n. 2–3, p. 265–271, 1990.
- FONSECA, F. V. et al. Role of the 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptor in the dorsal raphe nucleus on salt satiety signaling in rats. **Experimental Neurology**, v. 217, n. 2, p. 353–360, 2009.
- FRANCHINI, L. F. et al. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 282, n. 1, p. R235-43, 2002.
- FRY M, F. A. The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. **Physiol Behav**, v. 24;91, n. 4, p. :413-23, 2007.
- GARATTINI, S. et al. Biochemical pharmacology of the anorectic drug fenfluramine: A review. **Current Medical Research and Opinion**, v. 6, n. S1, p. 15–27, 1979.

GARATTINI, S. et al. Neurochemical mechanism of action of drugs which modify feeding via the serotonergic system. **Appetite**, v. 7, p. 15–38, 1986.

GARATTINI, S.; MENNINI, T.; SAMANIN, R. Reduction of food intake by manipulation of central serotonin: Current experimental results. **British Journal of Psychiatry**, v. 155, n. DEC. SUPPL. 8, p. 41–51, 1989.

GHORBEL, M. T. et al. Microarray screening of suppression subtractive hybridization-PCR cDNA libraries identifies novel RNAs regulated by dehydration in the rat supraoptic nucleus. n. 15, p. 163–172, 2006.

GODINO, A. et al. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1027–R1036, 2007.

GODINO, A. et al. Body sodium overload modulates the firing rate and fos immunoreactivity of serotonergic cells of dorsal raphe nucleus. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74689, 2013.

GONZÁLEZ-GARCÍA, N. et al. Multivariate analysis reveals differentially expressed genes among distinct subtypes of diffuse astrocytic gliomas: diagnostic implications. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

GONZALEZ, D. et al. The inhibition of CTGF/CCN2 activity improves muscle and locomotor function in a murine ALS model. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 16, p. 2913–2926, 2018.

GORELIK, A. et al. Developmental activities of the complement pathway in migrating neurons. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–12, 2017.

GRAEBNER, A. K.; IYER, M.; CARTER, M. E. Understanding how discrete populations of hypothalamic neurons orchestrate complicated behavioral states. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, n. AUGUST, p. 1–16, 2015.

GREENWOOD, M. et al. Transcription Factor CREB3L1 Regulates Vasopressin Gene Expression in the Rat Hypothalamus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 11, 2014a.

GREENWOOD, M. et al. Transcription factor CREB3L1 mediates cAMP and glucocorticoid regulation of arginine vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. **Molecular Brain**, p. 1–12, 2015a.

GREENWOOD, M. P. et al. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104802, 2014b.

GREENWOOD, M. P. et al. A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 7, 2015b.

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 308:, p. 559–568, 2015c.

GREENWOOD, M. P. et al. Rasd1, a small G protein with a big role in the hypothalamic response to neuronal activation. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2016.

GUIARD, B. P.; DI GIOVANNI, G. Central serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: The missing link? **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. MAR, p. 1–17, 2015.

GUO, Y. P. et al. Global gene knockout of knip3 enhances pain sensitivity and exacerbates negative emotions in rats. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. January, 2019.

HATTON, G. I. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, v. 26, n. 1–4, p. 225–237, 2002.

HETHERINGTON, A. W. AND RANSON, S. W. Experimental Hypothalamico-Hypophyseal Obesity in the Rat. p. 465–466, 1938.

HINDMARCH, C. et al. A comprehensive description of the transcriptome of the hypothalamoneurohypophyseal system in euhydrated and dehydrated rats. v. 103, n. 5, 2006.

HINDMARCH, C. et al. Microarray analysis of the transcriptome of the subfornical organ in the rat : regulation by fluid and food deprivation. v. 6, p. 1914–1920, 2008.

HINDMARCH, C. et al. Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. v. 114, p. 185–195, 2016.

HINDMARCH, C. C. T. et al. The transcriptome of the medullary area postrema : the thirsty rat , the hungry rat and the hypertensive rat. p. 495–504, 2011.

HINDMARCH, C. C. T. et al. Whole transcriptome organisation in the dehydrated supraoptic nucleus. v. 46, p. 1000–1006, 2013.

HIYAMA, T. Y. The Subfornical Organ is the Primary Locus of Sodium-Level Sensing by Nax Sodium Channels for the Control of Salt-Intake Behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9276–9281, 2004.

HOENIG, M. P.; ZEIDEL, M. L. Homeostasis, the Milieu Intérieur, and the Wisdom of the Nephron. **Clin J Am Soc Nephrol 9:**, v. 9, p. 1–10, 2014.

HOLMES, F. L. Claude Bernard, The “Milieu Intérieur”, and Regulatory Physiology. **History and Philosophy of the Life Sciences**, v. 8, n. 1, p. 3–25, 1986.

HUANG, K. W. et al. Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. **bioRxiv**, p. 1–34, 2019.

HUSSY, N. et al. Osmoregulation of vasopressin secretion via activation of neurohypophysial nerve terminals glycine receptors by glial taurine. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7110–7116, 2001.

ISHIMURA, K. et al. Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 91, n. 3, p. 265–270, 1988.

JOHNSON, A. K.; GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 8, p. 678–686, 1993.

JOHNSON A. K, T. R. L. The neuroendocrinology, neurochemistry and molecular biology of thirst and salt appetite. In: LAJTHA A, B. J. D. (Ed.). . **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**. 3rd. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 641–687.

JOHNSON, K. R. et al. A RNA-Seq Analysis of the Rat Supraoptic Nucleus Transcriptome : Effects of Salt Loading on Gene Expression. p. 1–28, 2015.

JUSZCZAK, G. R.; STANKIEWICZ, A. M. Glucocorticoids, genes and brain function. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 82, n. November 2017, p. 136–168, 2018.

KONOPACKA, A. et al. Osmoregulation requires brain expression of the renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 13, p. 5144–55, 2015a.

KONOPACKA, A. et al. RNA binding protein Caprin-2 is a pivotal regulator of the central osmotic defense response. p. 1–23, 2015b.

LAMBERT, S. A. et al. The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 650–665, 2018.
LECHNER, S. G. et al. The molecular and cellular identity of peripheral osmoreceptors. **Neuron**, v. 69, n. 2, p. 332–344, 2011.

LEE, M. G.; CHIOU, W. L. Evaluation of potential causes for the incomplete bioavailability of furosemide: Gastric first-pass metabolism. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 11, n. 6, p. 623–640, 1983.

LENKEI, Z. et al. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain : a functional neuroanatomical review. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 18, p. 383–439, 1997.

LEVENTOUX, N. et al. Transformation Foci in IDH1-mutated Gliomas Show STAT3 Phosphorylation and Downregulate the Metabolic Enzyme ETNPPL, a Negative Regulator of Glioma Growth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

LIEDTKE, W. B. et al. Relation of addiction genes to hypothalamic gene changes subserving genesis and gratification of a classic instinct , sodium appetite. v. 108, n. 30, p. 12509–12514, 2011.

LIMA, H. R. C. et al. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 1, p. 85–92, 2004.

LIND RW, T. R. & J. A. The subfornical organ and the integration of multiple factors in thirst. **Physiology and Behavior**, v. 32, p. 69- 74., 1984.

LOPES-MENEZES, V. C. et al. Acute body sodium depletion induces skin sodium mobilization in female Wistar rats. **Experimental Physiology**, v. 104, n. 12, p. 1754–1761, 2019.

LOUGHRIDGE, A. B. et al. Microarray analyses reveal novel targets of exercise-induced stress resistance in the dorsal raphe nucleus. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. APR 2013, p. 1–21, 2013.

LUNDY, R. F. et al. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 3, p. 449–458, 2003.

MATTHEWS, G. A. et al. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 617–631, 2016.

MAZARÉ, N. et al. Connexin 30 is expressed in a subtype of mouse brain pericytes. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 2, p. 1017–1024, 2018.

MCCLINTICK, J. N. et al. Gene expression changes in serotonin, GABA-A receptors, neuropeptides and ion channels in the dorsal raphe nucleus of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

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

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2004.

MECAWI, A. S. et al. The role of angiotensin II on sodium appetite after a low-sodium diet. **Journal of neuroendocrinology**, v. 25, p. 281–91, 2013.

MECAWI, A. DE S. et al. Neuroendocrine regulation of hydromineral homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, 2015.

MECAWI, A. S. et al. Estradiol potentiates hypothalamic vasopressin and oxytocin neuron activation and hormonal secretion induced by hypovolemic shock. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, p. 905–915, 2011.

MEDEIROS, M. A. et al. A reassessment of the role of serotonergic system in the control of feeding behavior. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 1, p. 103–111, 2005.

MEDEROS, S.; GONZÁLEZ-ARIAS, C.; PEREA, G. Astrocyte–Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, n. November, p. 1–12, 2018.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W566–W570, 2015.

MIMEE, A.; SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. **Circumventricular organs: Targets for integration of circulating fluid and energy balance signals?** *Physiology and Behavior*, 2013.

MOE KE, WEISS ML, E. A. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. *Am J Physiol.*, v. 247, n. 2 Pt 2, p. R356- 65., 1984.

MOORMAN, S.; MELLO, C. V.; BOLHUIS, J. J. From songs to synapses: Molecular mechanisms of birdsong memory. *BioEssays*, v. 33, n. 5, p. 377–385, 2011.

MUTZ, K. et al. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. p. 22–30, 2013.

NECTOW, A. R. et al. Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. *Cell*, v. 170, n. 3, p. 429- 442.e11, 2017.

NEILL, J. C.; COOPER, S. J. Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats: evidence for possible 5-HT_{1C} receptor mediation. *Psychopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 196–201, 1989.

NIKOLAIENKO, O. et al. Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 77, p. 33–42, 2018.

NODA, M.; HIYAMA, T. Y. Sodium sensing in the brain. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v. 467, n. 3, p. 465–474, 2015.

OKATY, B. W. et al. Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron*, v. 88, n. 4, p. 774–791, 2015.

OLIVARES, E. L. et al. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, n. 12, p. 1709–1716, 2003.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain ~ nuclei of the rat. v. 59, p. 449–450, 1973.

PASTUZYN, E. D. et al. The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular RNA Transfer. *Cell*, v. 173, n. 1, p. 275, 2018.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego, CA: Academic Press, 2004.

PEREZ-CATALAN, N. A.; DOE, C. Q.; ACKERMAN, S. D. The role of astrocyte-mediated plasticity in neural circuit development and function. *Neural Development*, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2021.

PETIT, J. M. et al. VIP-like immunoreactive projections from the dorsal raphe and caudal linear raphe nuclei to the bed nucleus of the stria terminalis demonstrated by a double immunohistochemical method in the rat. *Neuroscience Letters*, v. 193, n. 2, p. 77–80, 1995.

POLLAK DOROCIC, I. et al. A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the

Dorsal and Median Raphe Nuclei. **Neuron**, v. 83, n. 3, p. 663–678, 2014.

PORCARI, C. Y. et al. Whole body sodium depletion modifies AT1 mRNA expression and serotonin content in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 4, p. 1–10, 2019.

QESSEVEUR, G. et al. Genetic dysfunction of serotonin 2A receptor hampers response to antidepressant drugs: A translational approach. **Neuropharmacology**, v. 105, p. 142–153, 2016.

QUÉRÉE, P.; PETERS, S.; SHARP, T. Further pharmacological characterization of 5-HT_{2C} receptor agonist-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the dorsal raphe nucleus in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 6, p. 1477–1485, 2009.

QUESSEVEUR, G. et al. 5-HT_{2A} receptor inactivation potentiates the acute antidepressant-like activity of escitalopram: Involvement of the noradrenergic system. **Experimental Brain Research**, v. 226, n. 2, p. 285–295, 2013.

QUINTON, R. **L'eau De Mer, Milieu Organique: Constance Du Milieu Marin Originel, Comme Milieu Vital Des Cellules, À Travers La Série Animale**. [s.l.: s.n.].

RAMACHANDRAN, P. L. et al. The potassium channel interacting protein 3 (DREAM/KChIP3) heterodimerizes with and regulates calmodulin function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39439–39448, 2012.

REIS, L. C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 261–83, 2007.

REYES-HARO, D. et al. Anorexia Reduces GFAP + Cell Density in the Rat Hippocampus. v. 2016, p. 1–11, 2016.

RITZ, E. Salt appetite and addiction — unholy twins ? v. 32, n. May, p. 2146–2148, 2012.

RODRÍGUEZ, E. M.; BLÁZQUEZ, J. L.; GUERRA, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. **Peptides**, v. 31, n. 4, p. 757–776, 2010.

ROUAH-ROSILIO M, OROSCO M, N. S. Serotonergic Modulation of Sodium Appetite in the Rat. v. 55, n. 5, p. 811–816, 1994.

SAKAI, E. G. K. AND R. R. Richter and sodium appetite: from adrenalectomy to molecular biology. **Appetite**, v. 49, n. 2, p. 353–367, 2007.

SAKAI, K. et al. causes elevated drinking Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. v. 117, n. 4, p. 1088–1095, 2007.

SAKUTA, H. et al. Na^x signaling evoked by an increase in [Na²⁺] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation. n. 37, 2016.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, 2000.

SHAO, L.; VAWTER, M. P. Shared Gene Expression Alterations in Schizophrenia and Bipolar. **Biol Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

SHARIF NAEINI, R. et al. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 93–8, 2006.

SMAGIN, D. A. et al. Dysfunction in Ribosomal Gene Expression in the Hypothalamus and Hippocampus following Chronic Social Defeat Stress in Male Mice as Revealed by RNA-Seq. v. 2016, 2016.

SOIZA-REILLY, M.; GASPAR, P. From B1 to B9: a guide through hindbrain serotonin neurons with additional views from multidimensional characterization. In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**. [s.l: s.n.]. v. 31p. 23–40.

STANKIEWICZ, A. M. et al. Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex. **BMC Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2014.

STEINBUSCH, H. W. M. **Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-Cell bodies and terminals**. [s.l: s.n.]. v. 6

STELLAR, E. Salt appetite: its neuroendocrine basis. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 53, n. 3, p. 475–84, 1993.

STEWART, L. et al. Hypothalamic Transcriptome Plasticity in Two Rodent Species Reveals Divergent Differential Gene Expression But Conserved Pathways Neuroendocrinology. n. 13, p. 177–185, 2011.

SULTA, P. Pharmacogenomics. v. 15, p. 1823–1838, 2014.

SWANSON, L. G. S. AND L. W. Drinking induced by injections of angiotensin into forebrain and mid-brain sites of the monkey. **J Physiol.**, v. 239, n. 3, p. 595–622, 1974.

TANAKA J, USHIGOME A, H. K. & N. M. Response of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 45, p. 315- 318., 1998.

TANAKA, J. et al. Efferent pathways from the region of the subfornical organ to hypothalamic paraventricular nucleus: an electrophysiological study in the rat. **Experimental Brain Research**, v. 62, n. 3, p. 509–514, 1986.

TIAN, N. X. et al. KCHIP3 N-terminal 31-50 fragment mediates its association with TRPV1 and alleviates inflammatory hyperalgesia in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 7, p. 1756–1773, 2018.

VEIGA-DA-CUNHA, M. et al. Molecular identification of hydroxylysine kinase and of ammoniophospholyases acting on 5-phosphohydroxy-L-lysine and phosphoethanolamine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7246–7255, 2012.

- VENTURA, R. R. et al. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. **Neuroscience letters**, v. 379, n. 2, p. 75–80, 2005.
- VERBALIS, E. M. S. AND J. G. Hormones and Behavior: The Biology of Thirst and Sodium Appetite. **Scientist, American**, v. 76, n. 3 (May-June), p. 261–267, 1988.
- VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 471–503, 2003.
- VERNEY, E. B. The Antidiuretic Hormone and the Factors Which Determine Its Release. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 135, n. 878, p. 25–106, 1947.
- WANG, Y. F.; PARPURA, V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. June, p. 1–18, 2018.
- WATANABE, E. et al. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7743–7751, 2000.
- WATANABE, E. et al. Nax sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. **Neuroscience Letters**, v. 330, n. 1, p. 109–113, 2002.
- WESTERHAUS, M. J.; LOEWY, A. D. Sympathetic-related neurons in the preoptic region of the rat identified by viral transneuronal labeling. **Journal of Comparative Neurology**, v. 414, n. 3, p. 361–378, 1999.
- WOLF, G.; STRICKER, E. Sodium appetite elicited by hypovolemia in adrenalectomized rats: reevaluation of the “reservoir” hypothesis. **J Comp Physiol Psychol.**, v. Apr;63(2), p. 252–7, 1967.
- WU, C. et al. RNA sequencing in post-mortem human brains of neuropsychiatric disorders. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 71, n. 10, p. 663–672, 2017.
- XU, Z.; XINGHONG, J. Drinking and Fos-immunoreactivity in rat brain induced by local injection of angiotensin I into the subfornical organ. p. 67–74, 1999.
- YAMADA, J. et al. Role of serotonergic mechanisms in leptin-induced suppression of milk intake in mice. **Neuroscience Letters**, v. 348, n. 3, p. 195–197, 2003.
- YANG, C. N. et al. Differential protective effects of connective tissue growth factor against A β neurotoxicity on neurons and glia. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 20, p. 3909–3921, 2017.
- ZHANG, W. et al. Arc oligomerization is regulated by CaMKII phosphorylation of GAG domain; an essential mechanism for plasticity and memory formation. **Mol Cell.**, v. 75, n. 1, p. 13–25, 2020.

9 APÊNDICE

As figuras a seguir representam os níveis de expressão de todos os alvos detectados pelo RNAseq no DRN de ratos Wistar controle cuja classificação foi possível. A catalogação foi feita de acordo com o descrito no site da IUPHAR (<https://www.guidetopharmacology.org/>).

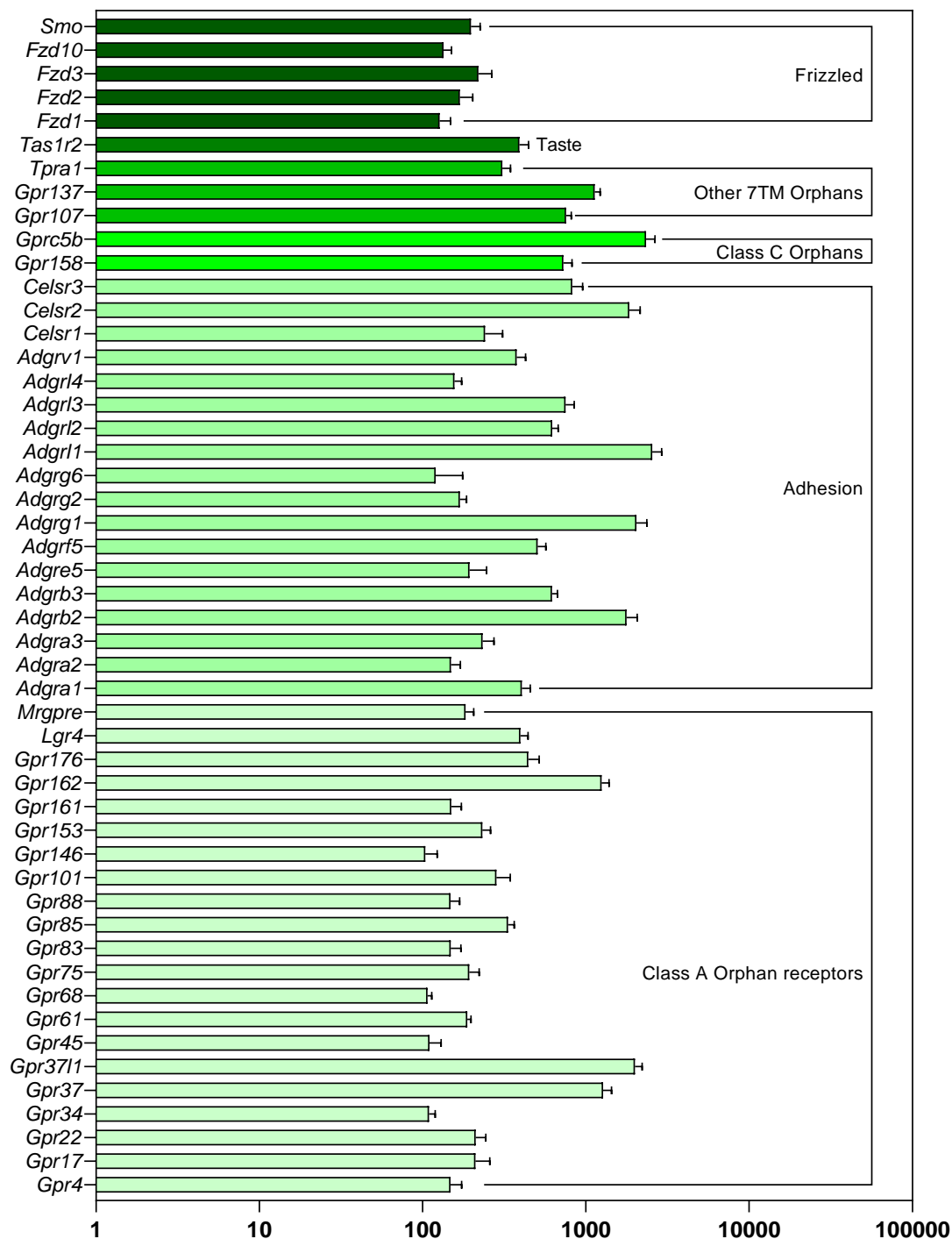


Figura 25. Expressão de mRNA dos principais GPCRs presentes no DRN.

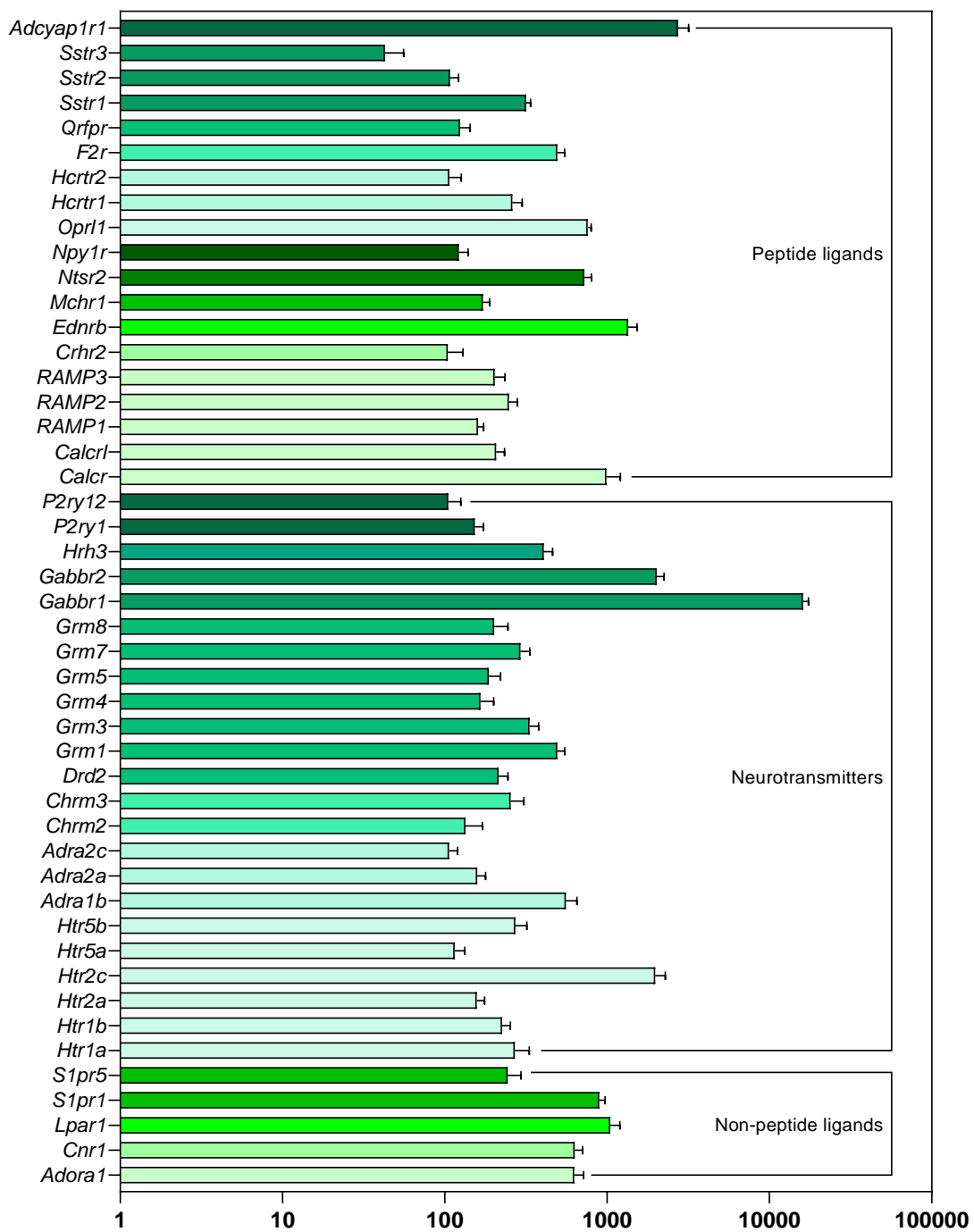


Figura 26. Expressão de mRNA dos principais GPCRs presentes no DRN.

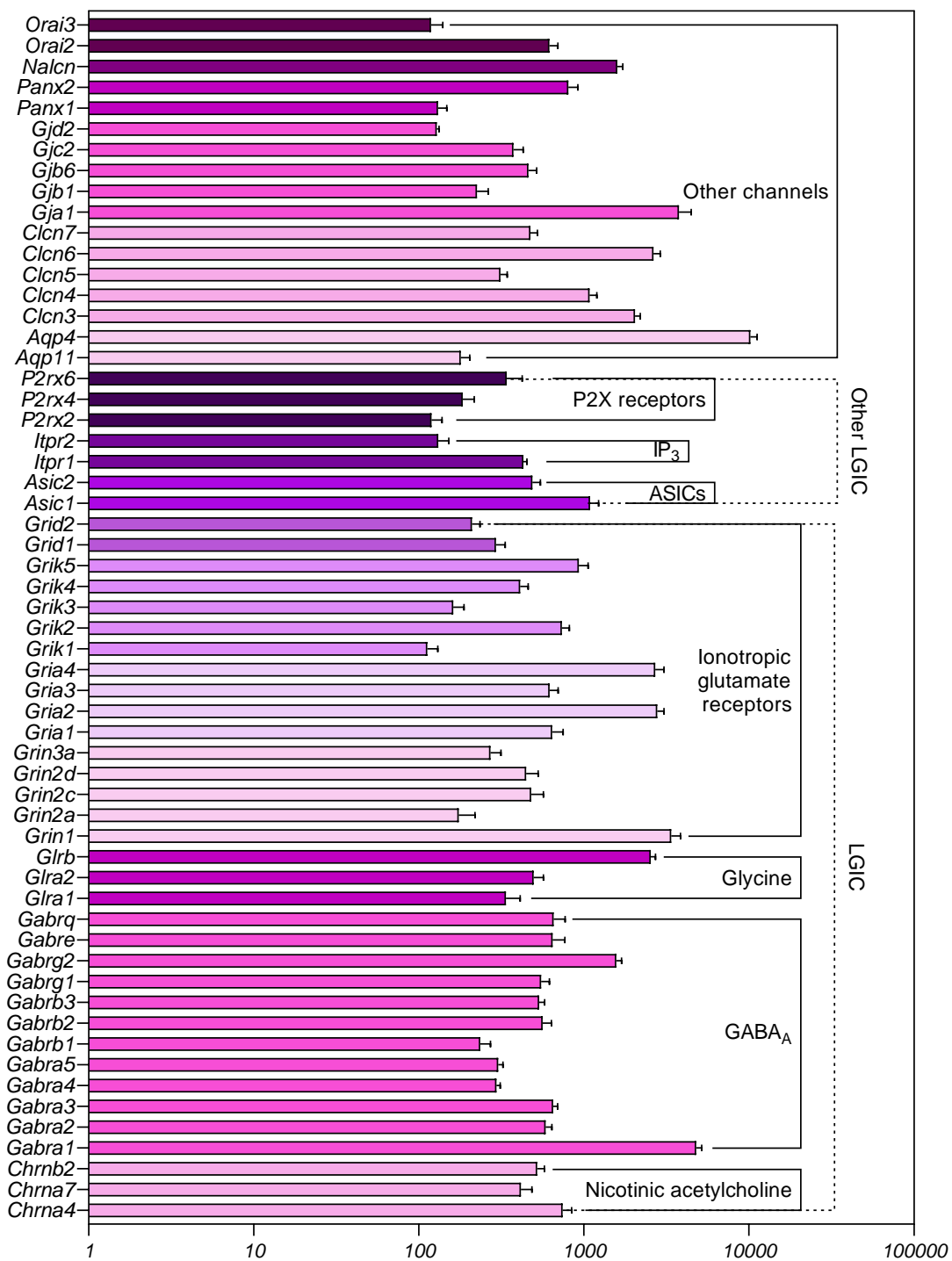


Figura 27. Expressão de mRNA dos principais canais iônicos presentes no DRN.

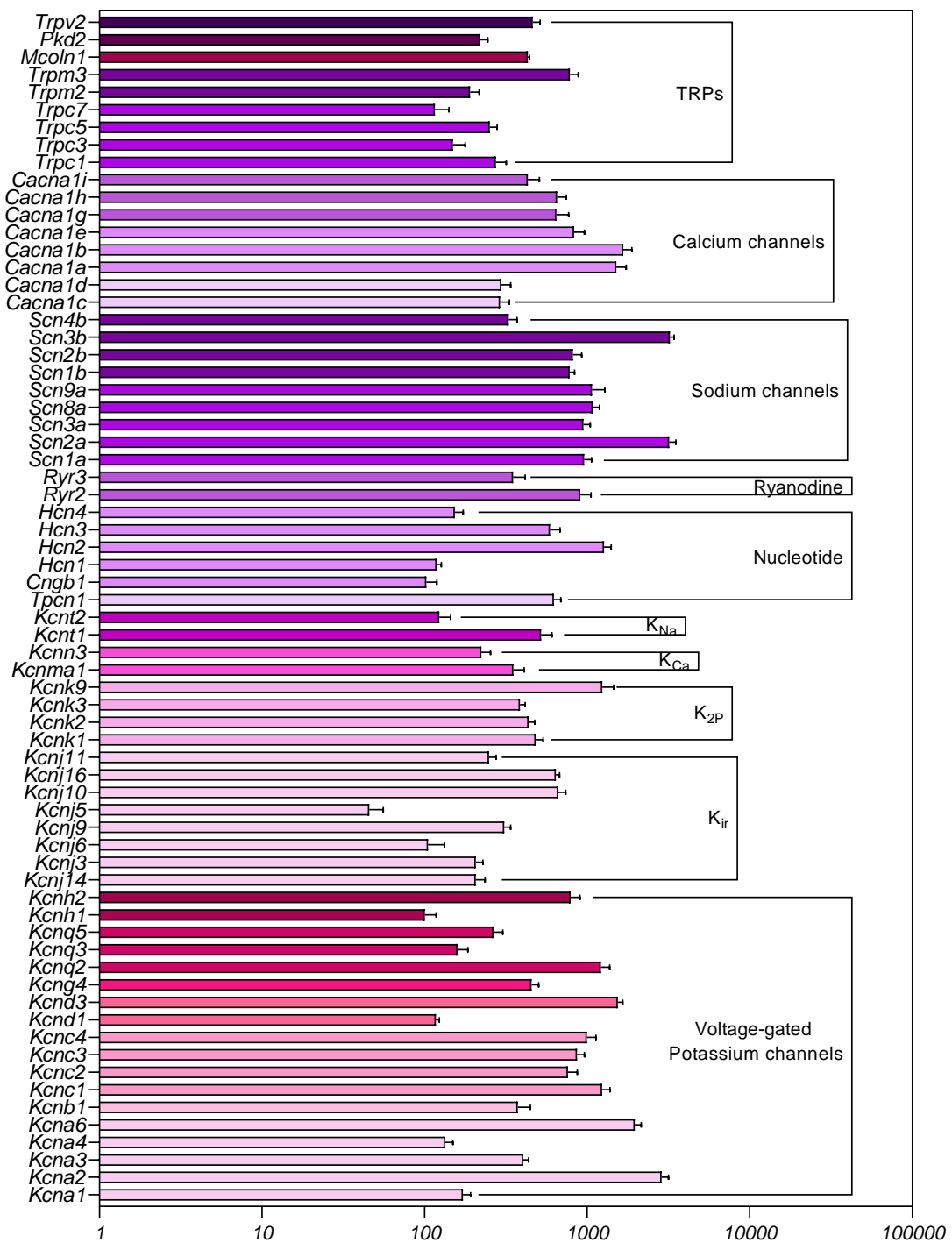


Figura 28. Expressão de mRNA dos principais canais iônicos presentes no DRN.

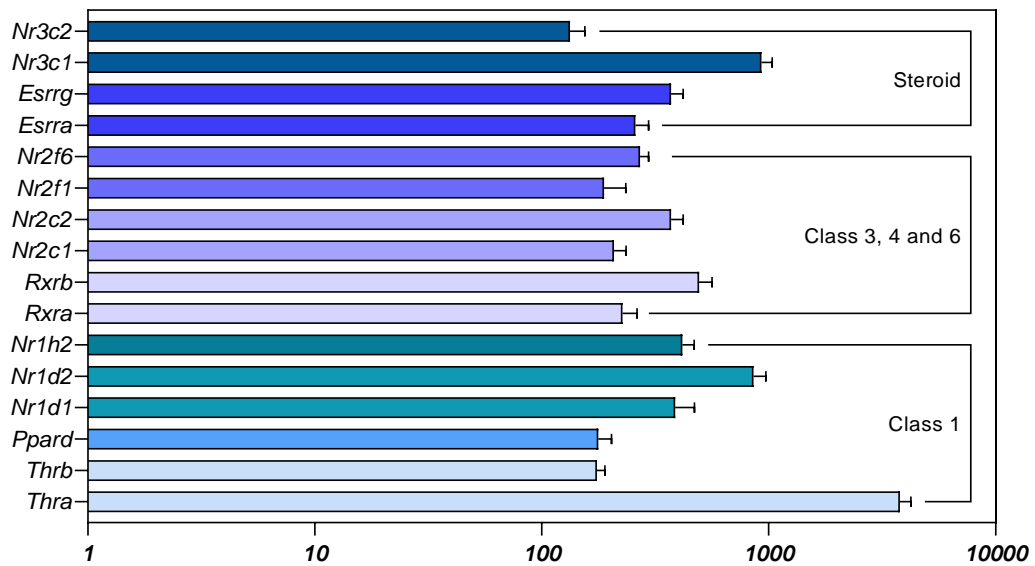


Figura 29. Expressão de mRNA dos principais receptores nucleares presentes no DRN.

As figuras de número 30 a 34 representam as enzimas kinases mais identificadas no DRN através do sequenciamento de RNA. As enzimas foram categorizadas de acordo com as classes, famílias e subfamílias descritas no site da IUPHAR.

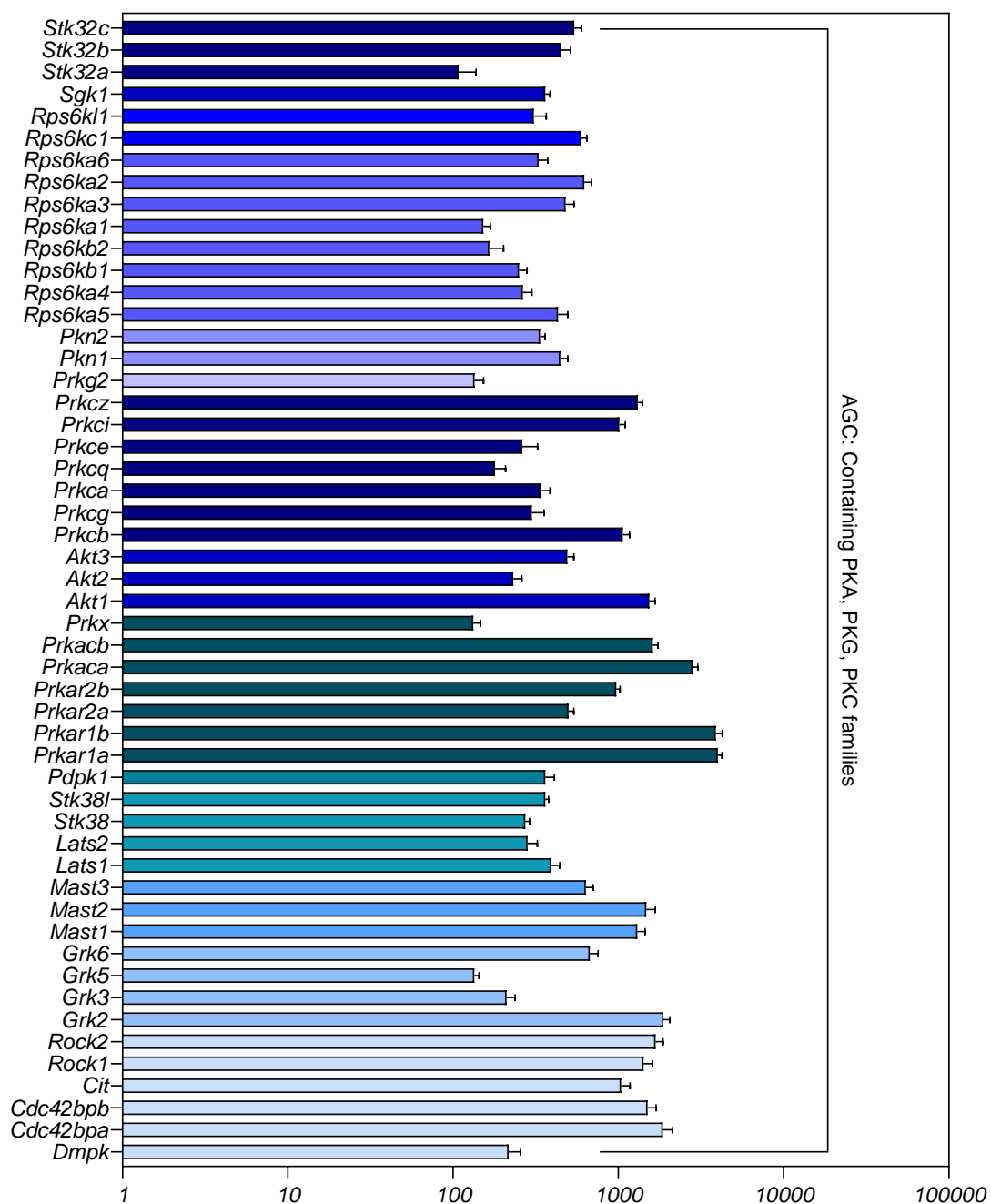


Figura 30. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.

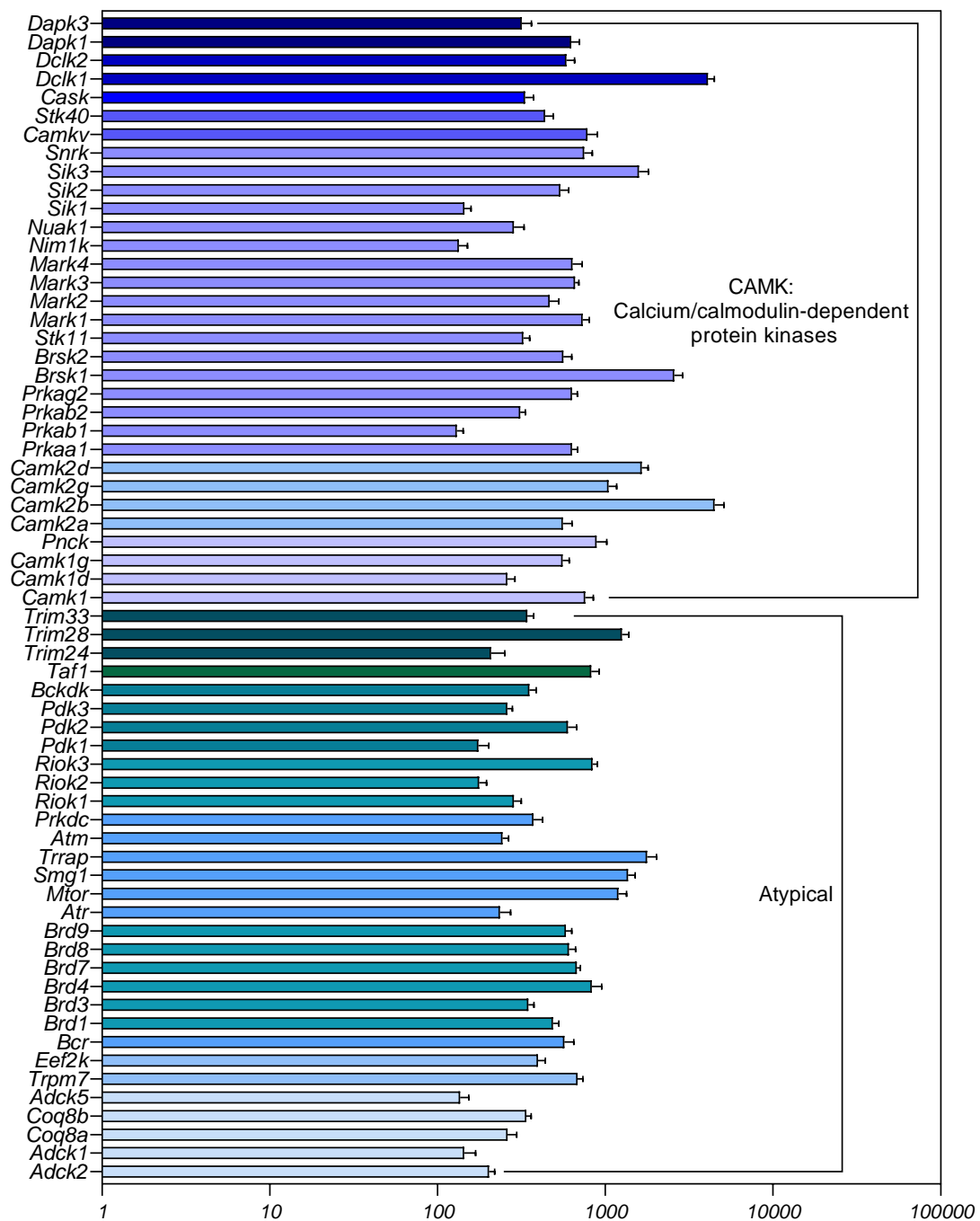


Figura 31. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.

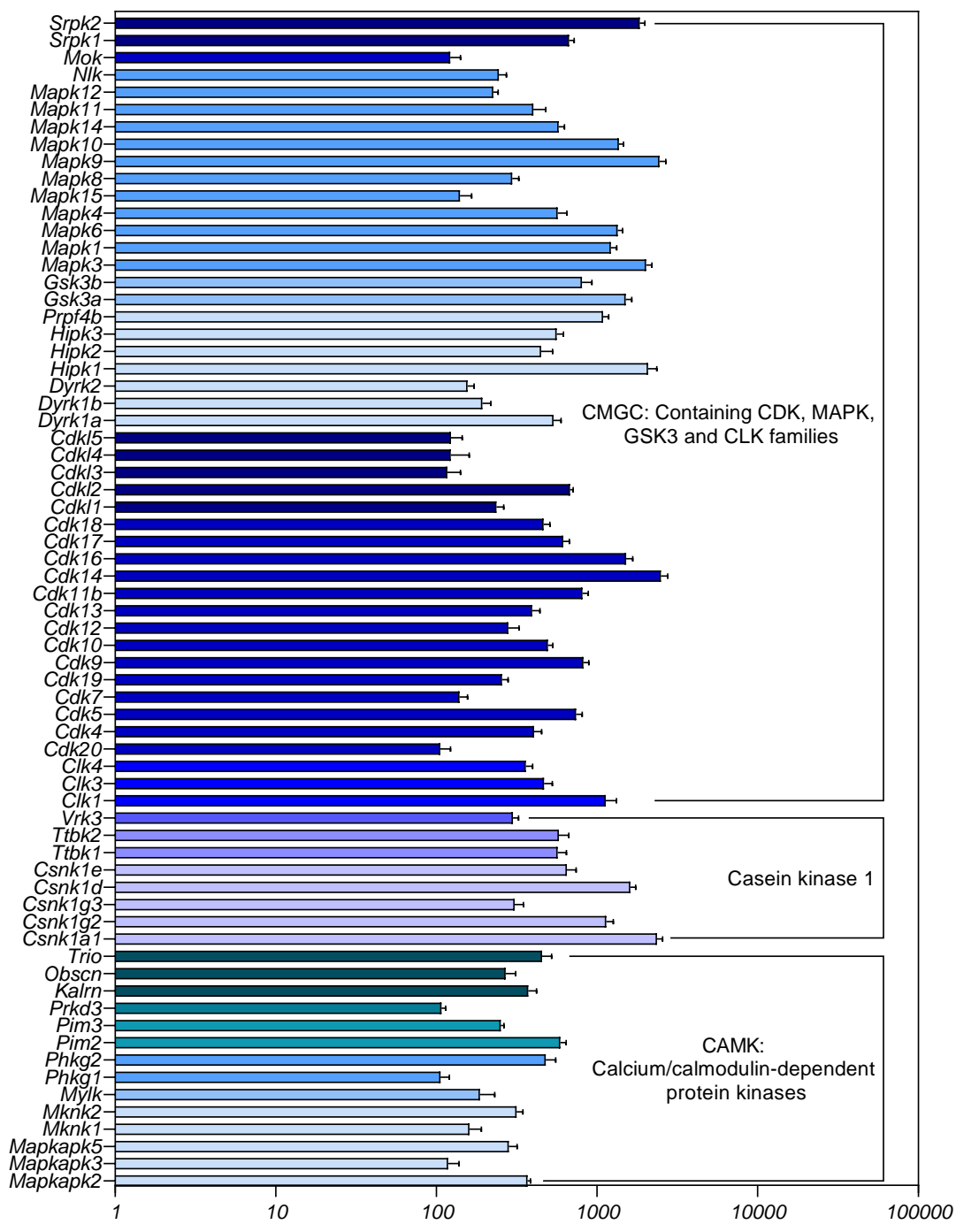


Figura 32. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.

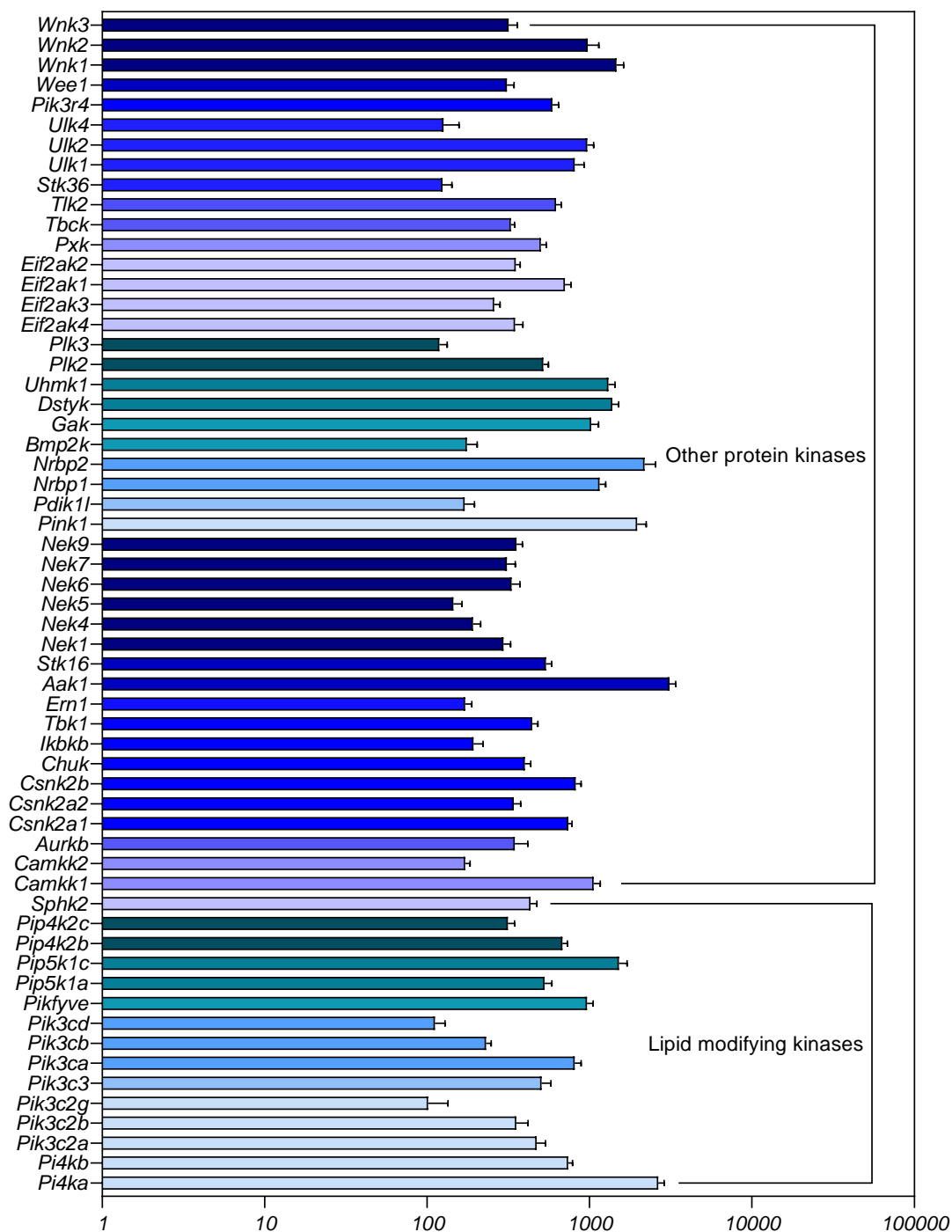


Figura 33. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.

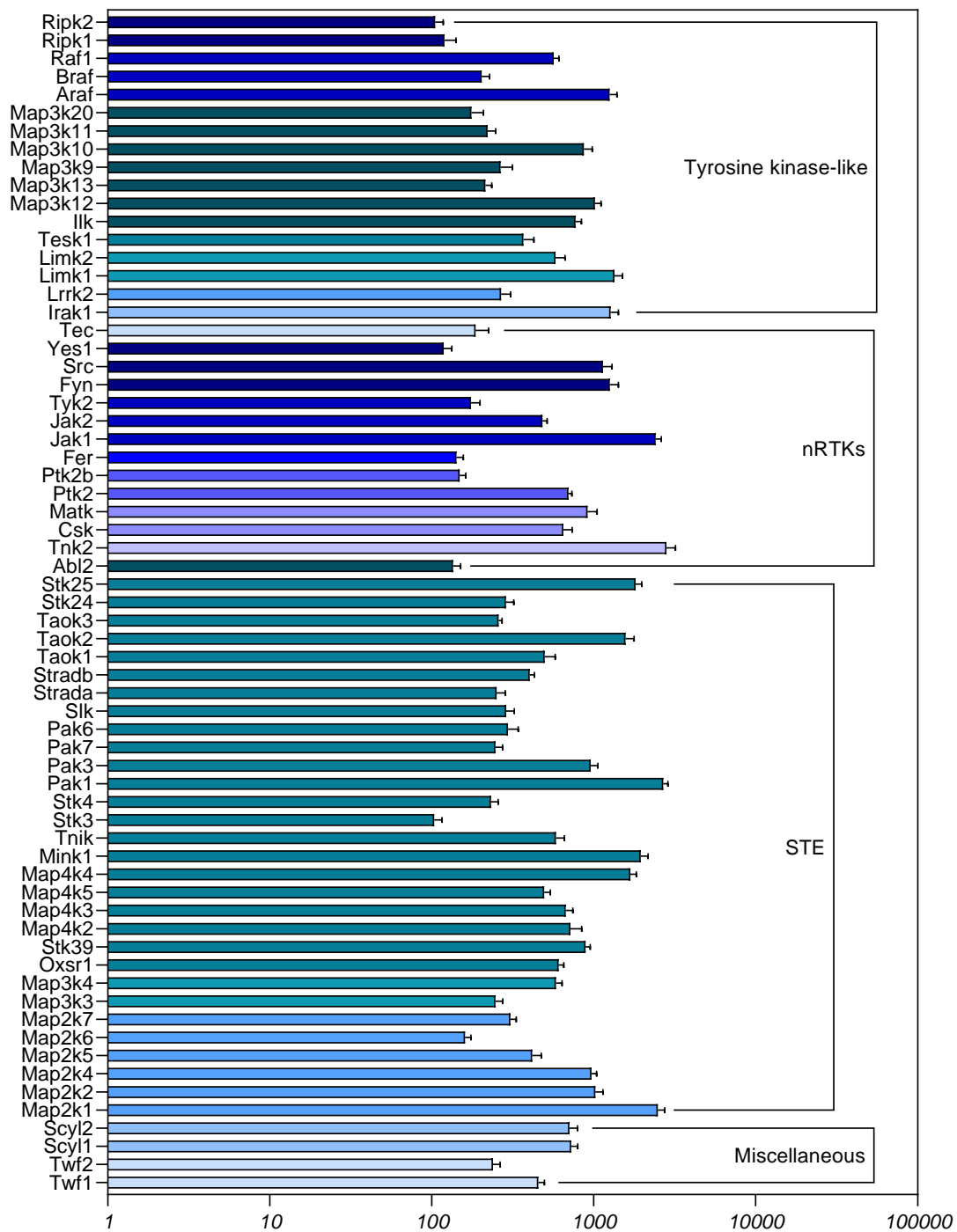


Figura 34. Expressão de mRNA das principais enzimas do tipo quinase presentes no DRN.

Os gráficos abaixo representam a expressão global de mRNA de receptores catalíticos no DRN que foram categorizados de acordo com a IUPHAR.

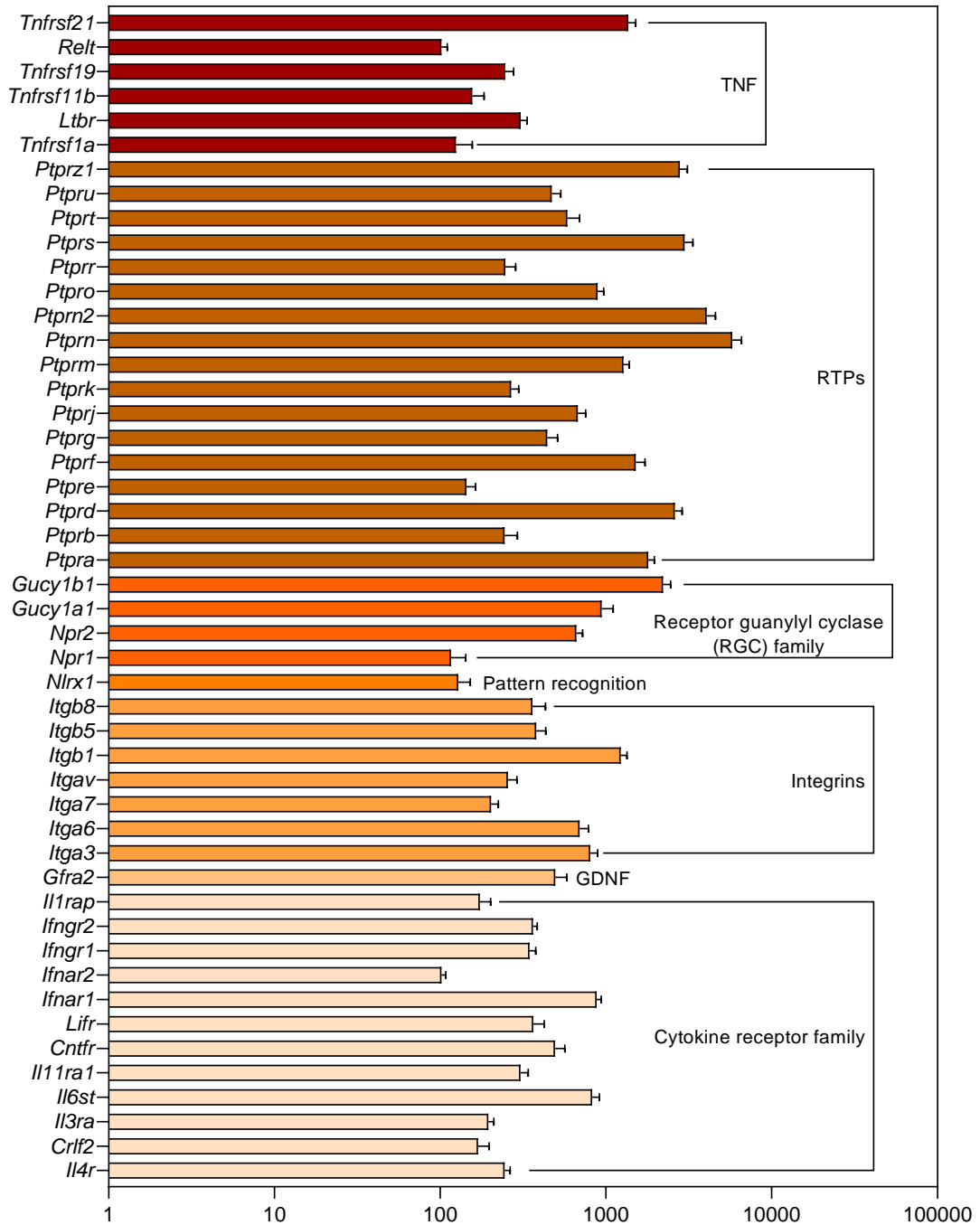


Figura 35. Expressão de mRNA dos principais receptores catalíticos presentes no DRN.

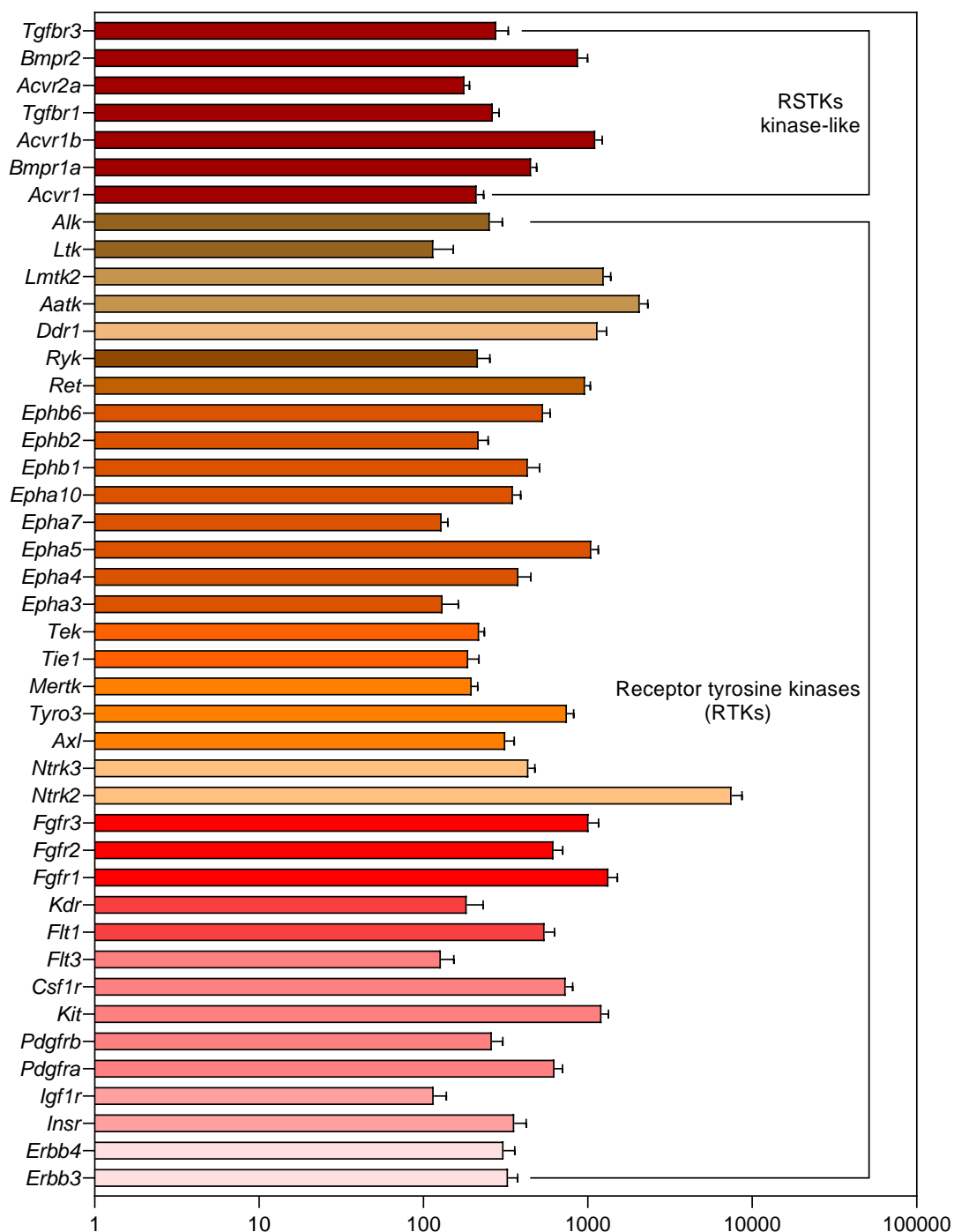


Figura 36. Expressão de mRNA dos principais receptores catalíticos presentes no DRN.

Os gráficos abaixo representam a expressão global de mRNA dos principais transportadores expressos no DRN e categorizados de acordo com a IUPHAR.

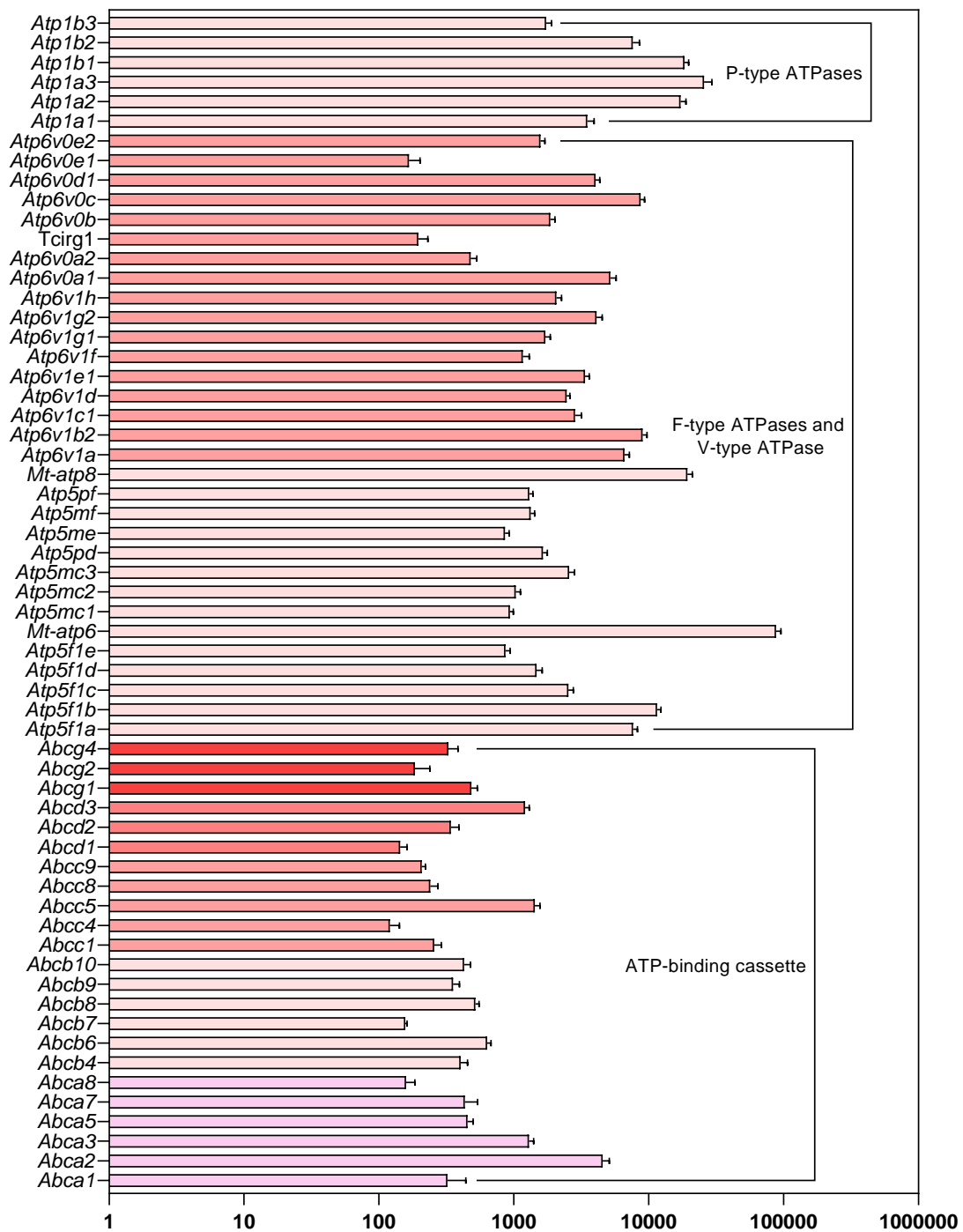


Figura 37. Expressão de mRNA dos transportadores das famílias ABC e ATPases do tipo F e V presentes no DRN.

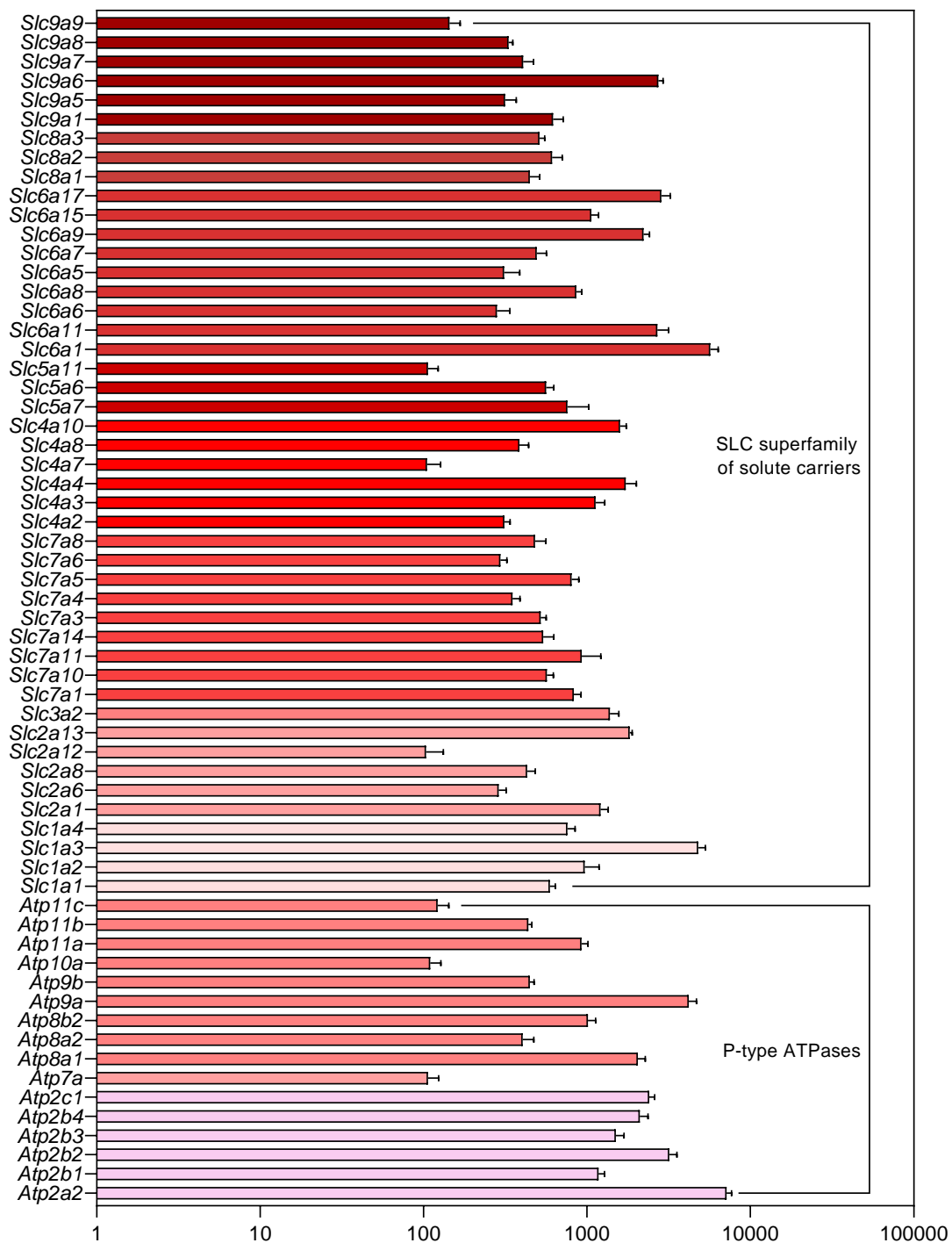


Figura 38. Expressão de mRNA dos transportadores das famílias ABC e ATPase do tipo P, e transportadores SLC de 1 a 9, pertencentes à superfamília SLC.

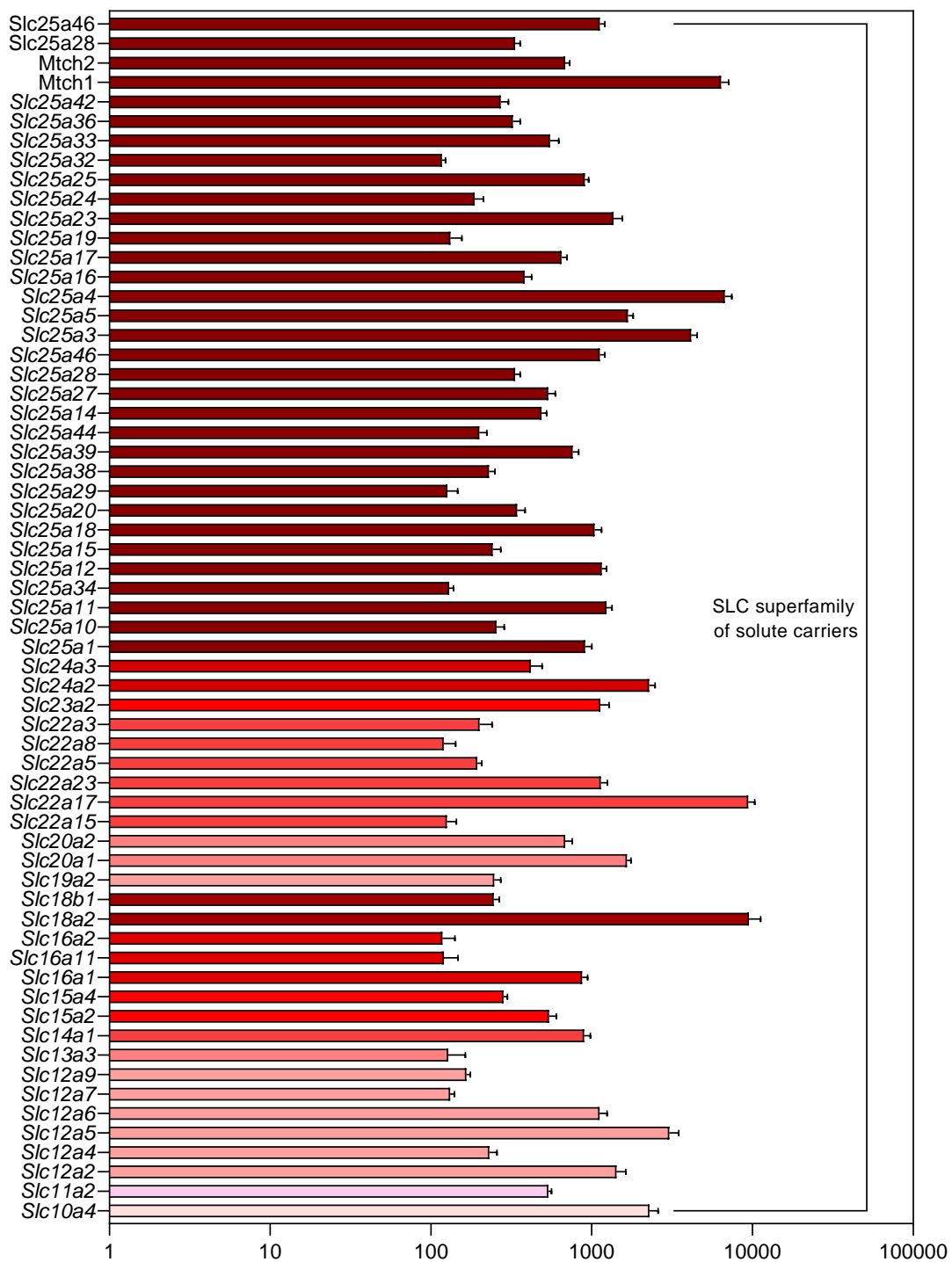


Figura 39. Expressão de mRNA dos transportadores pertencentes à superfamília SLC.

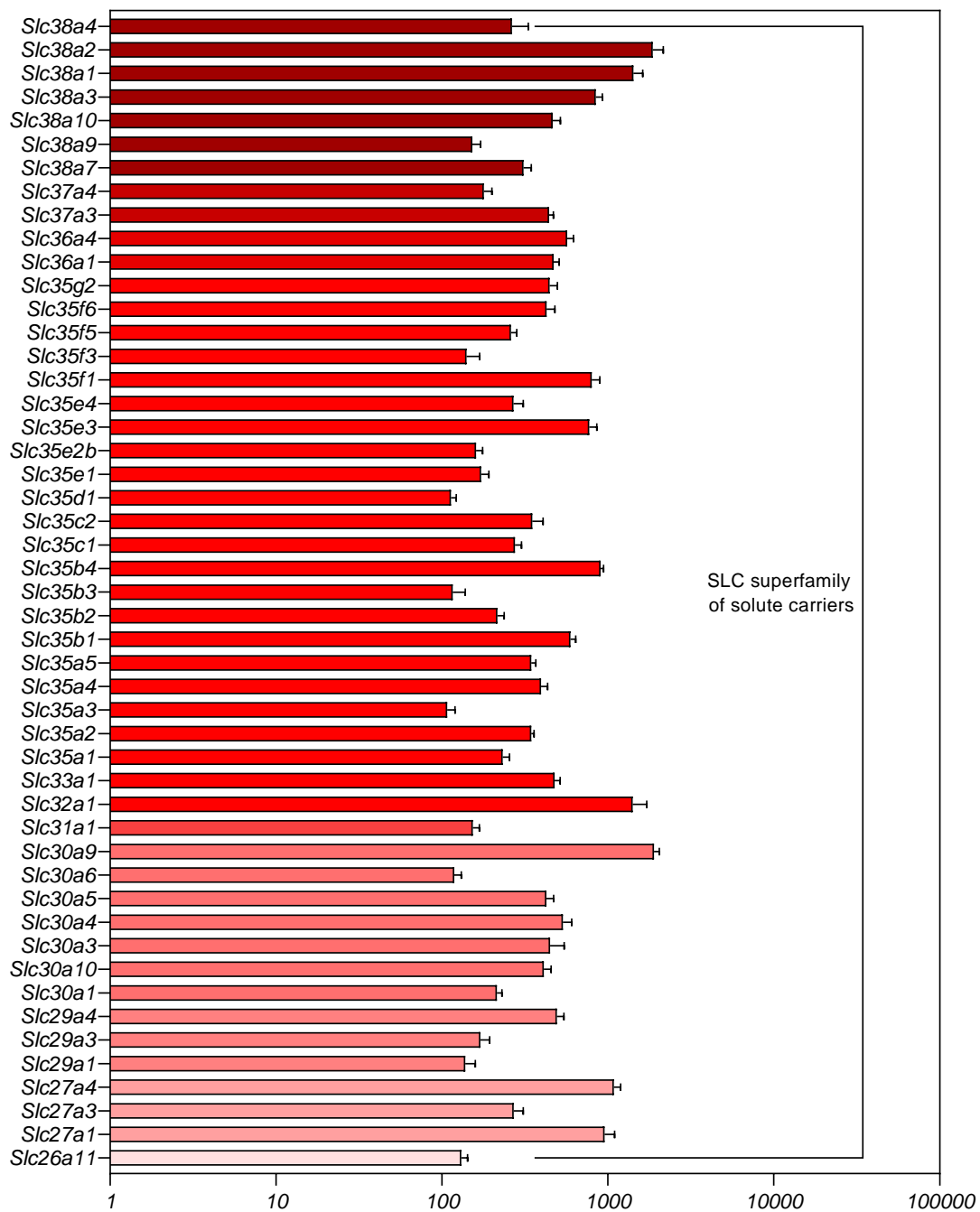


Figura 40. Expressão de mRNA dos transportadores pertencentes à superfamília SLC.

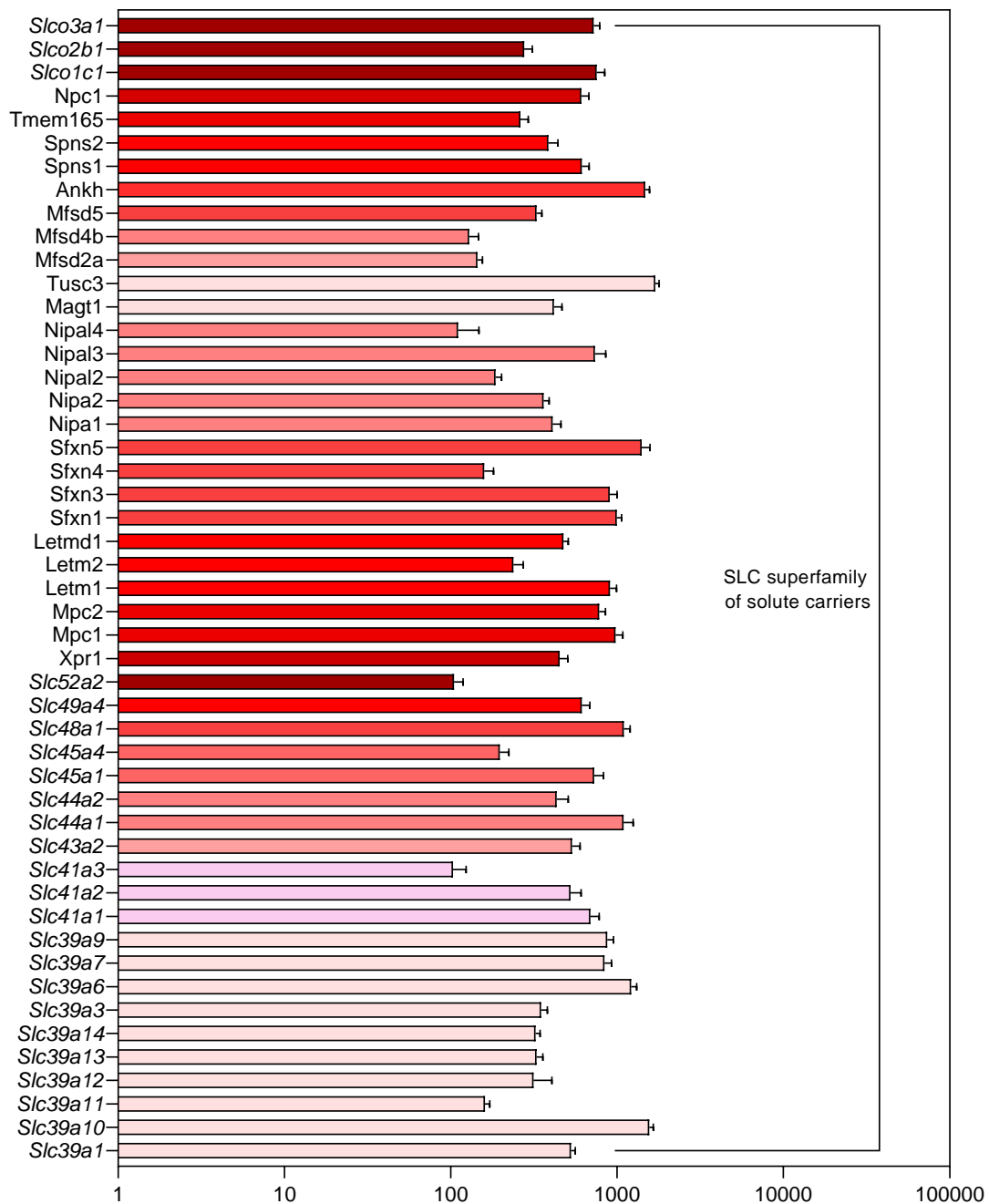


Figura 41. Expressão de mRNA dos transportadores pertencentes à superfamília SLC.

Os gráficos abaixo representam a expressão global de mRNA das principais enzimas expressas no DRN.

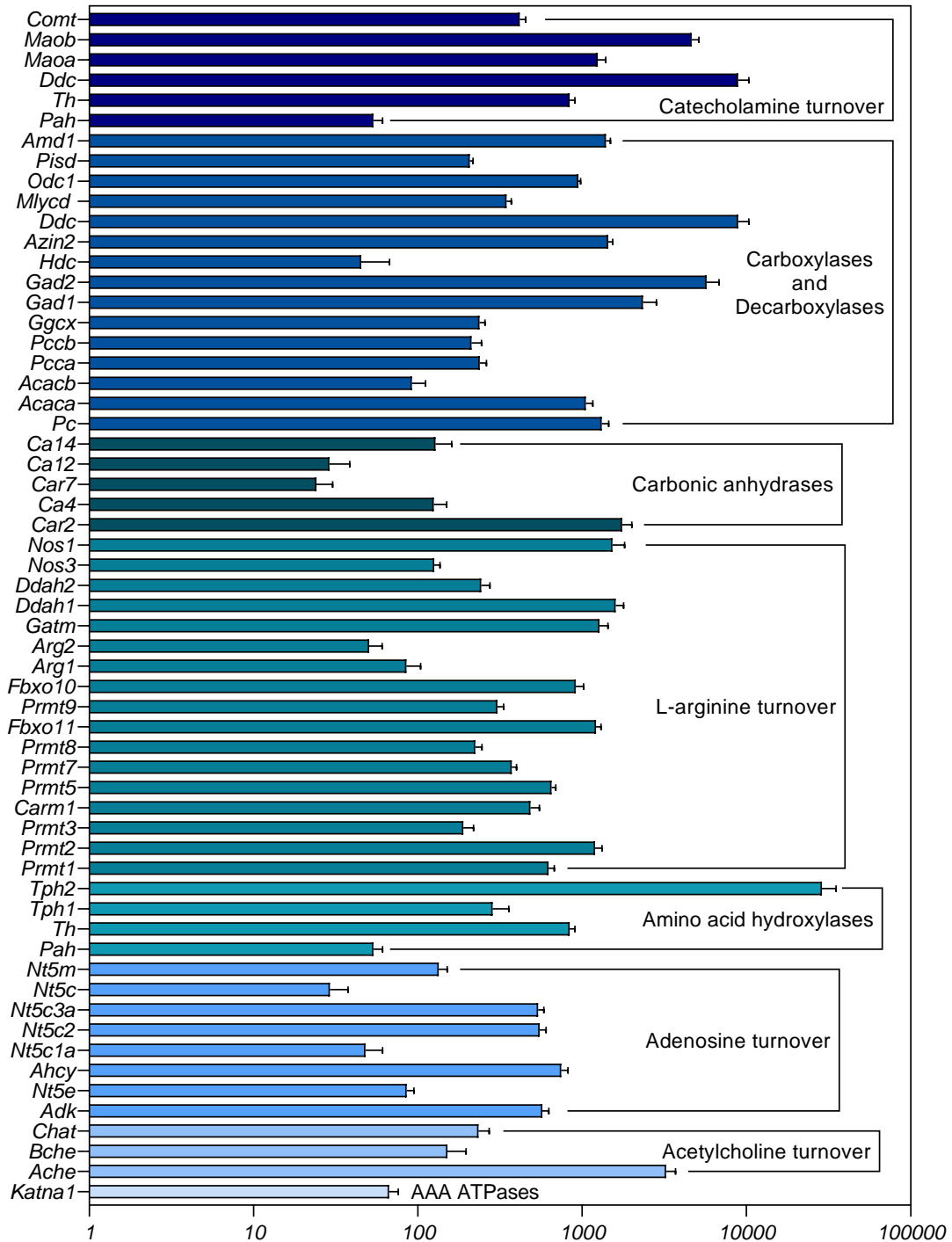


Figura 42. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

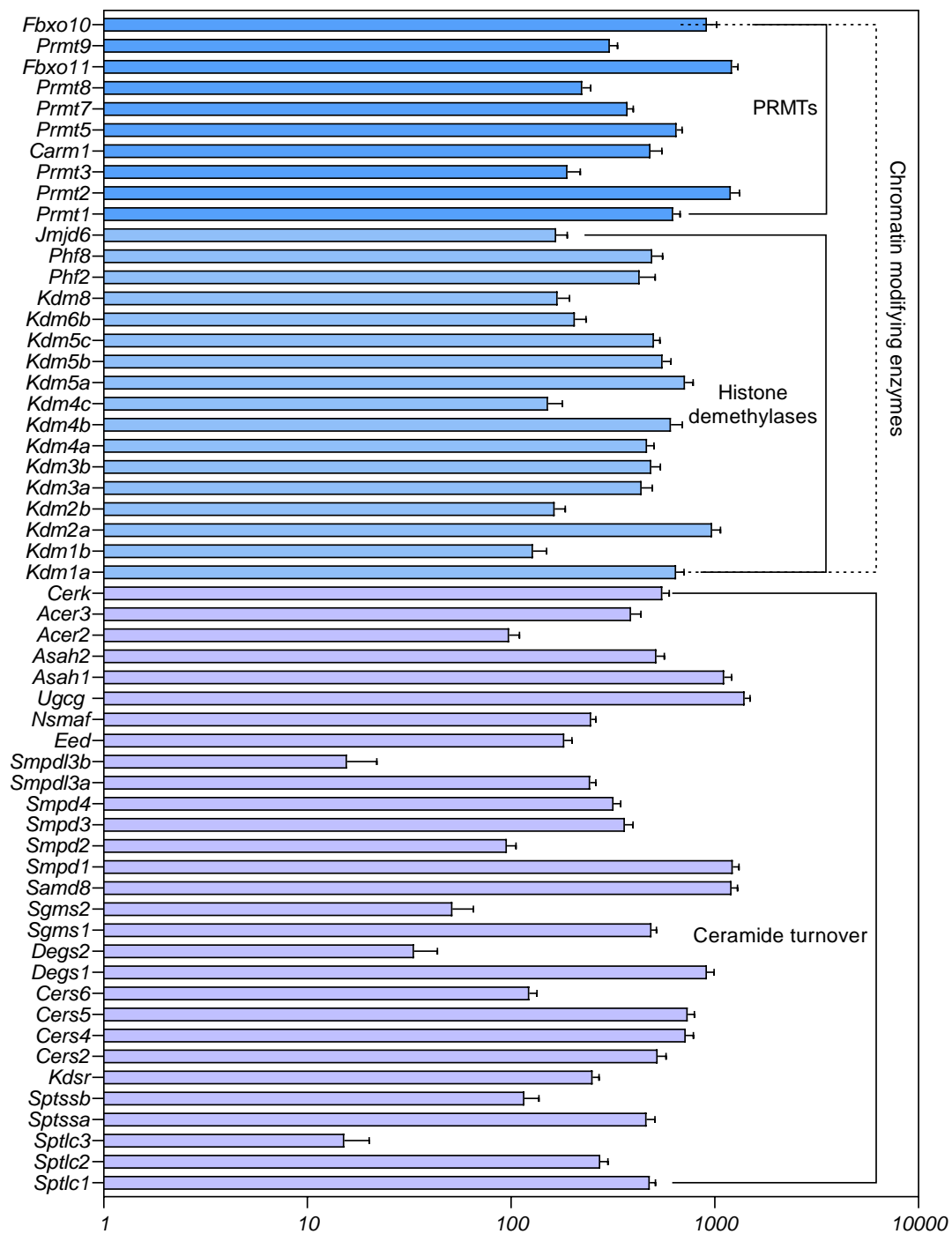


Figura 43. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

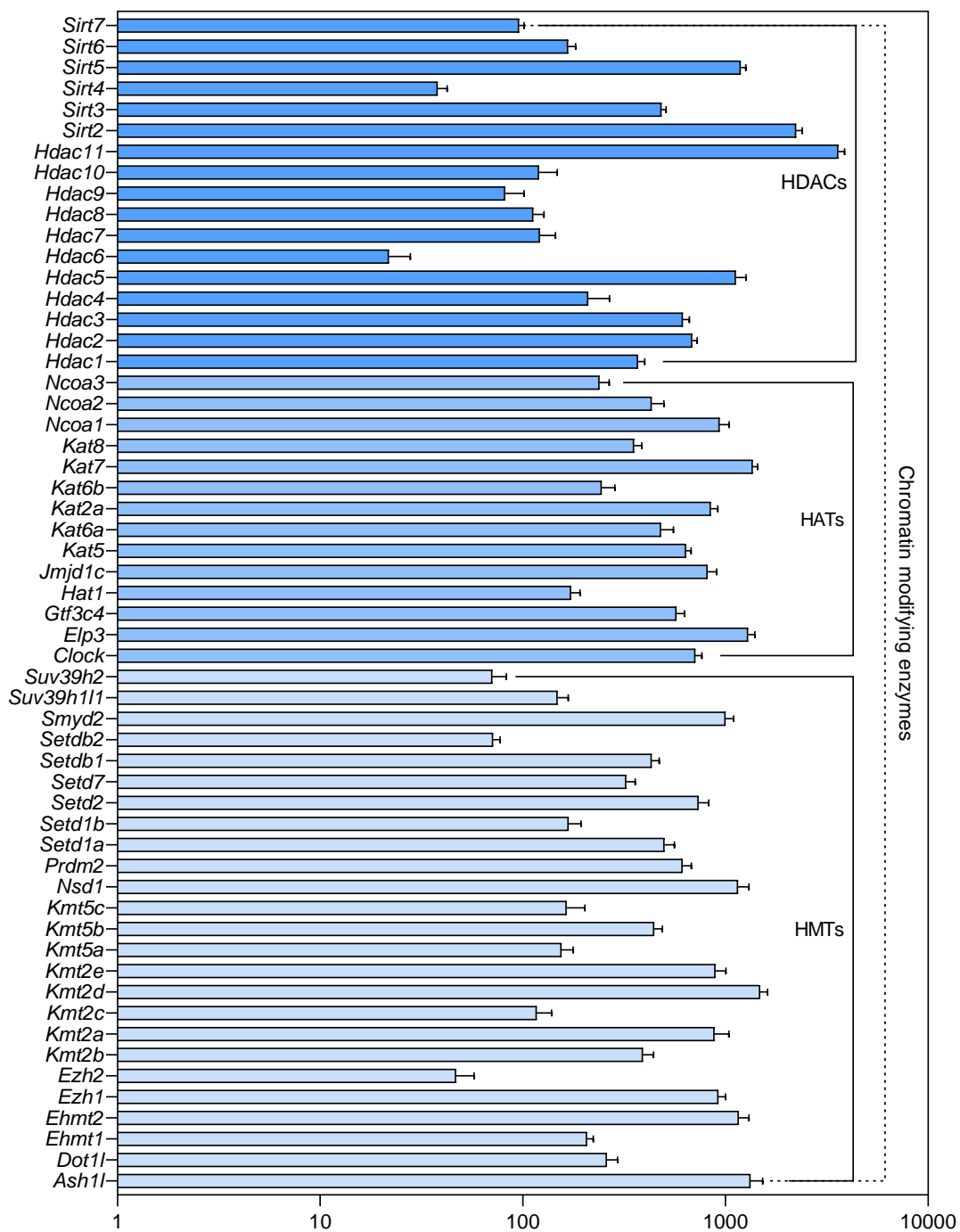


Figura 44. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

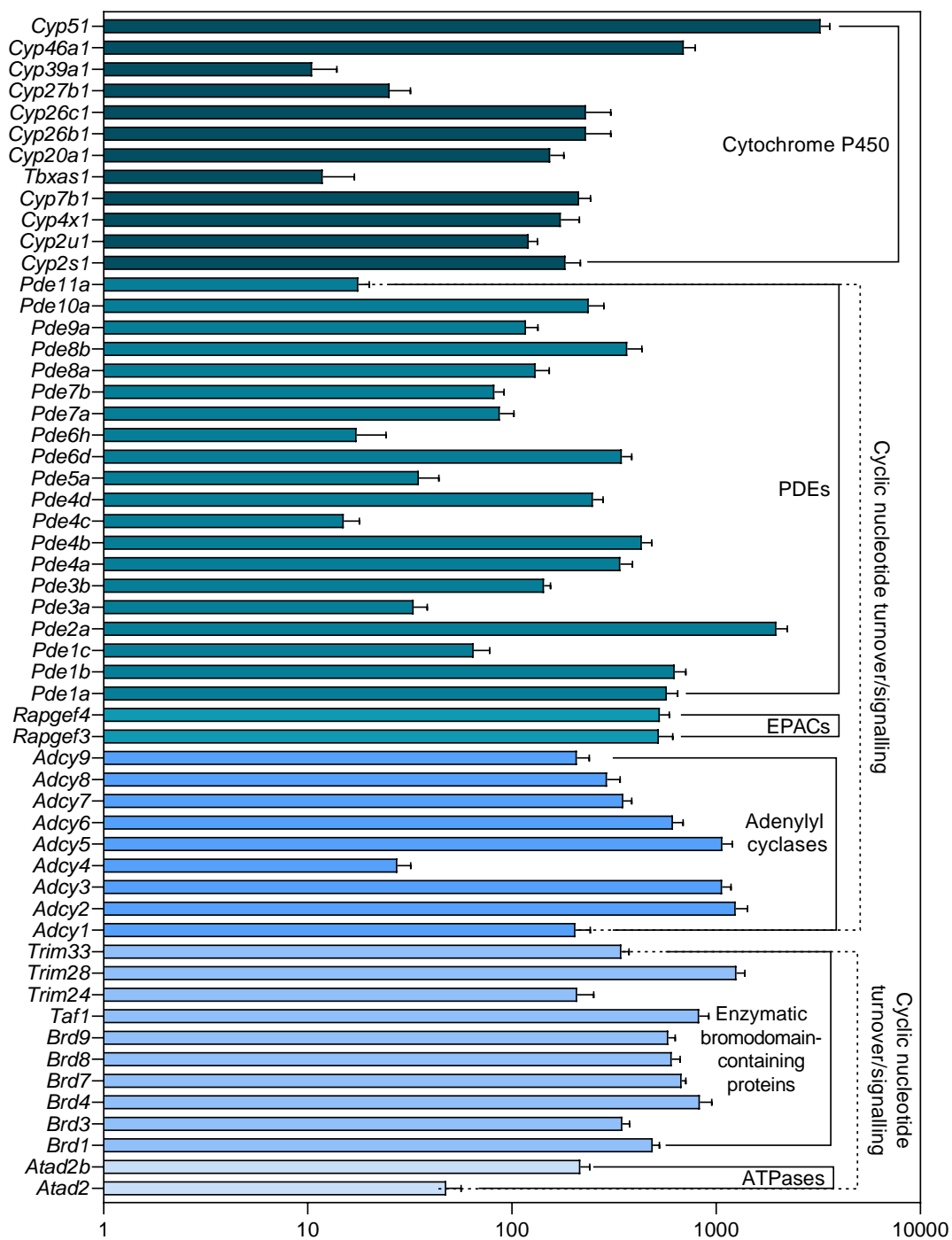


Figura 45. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

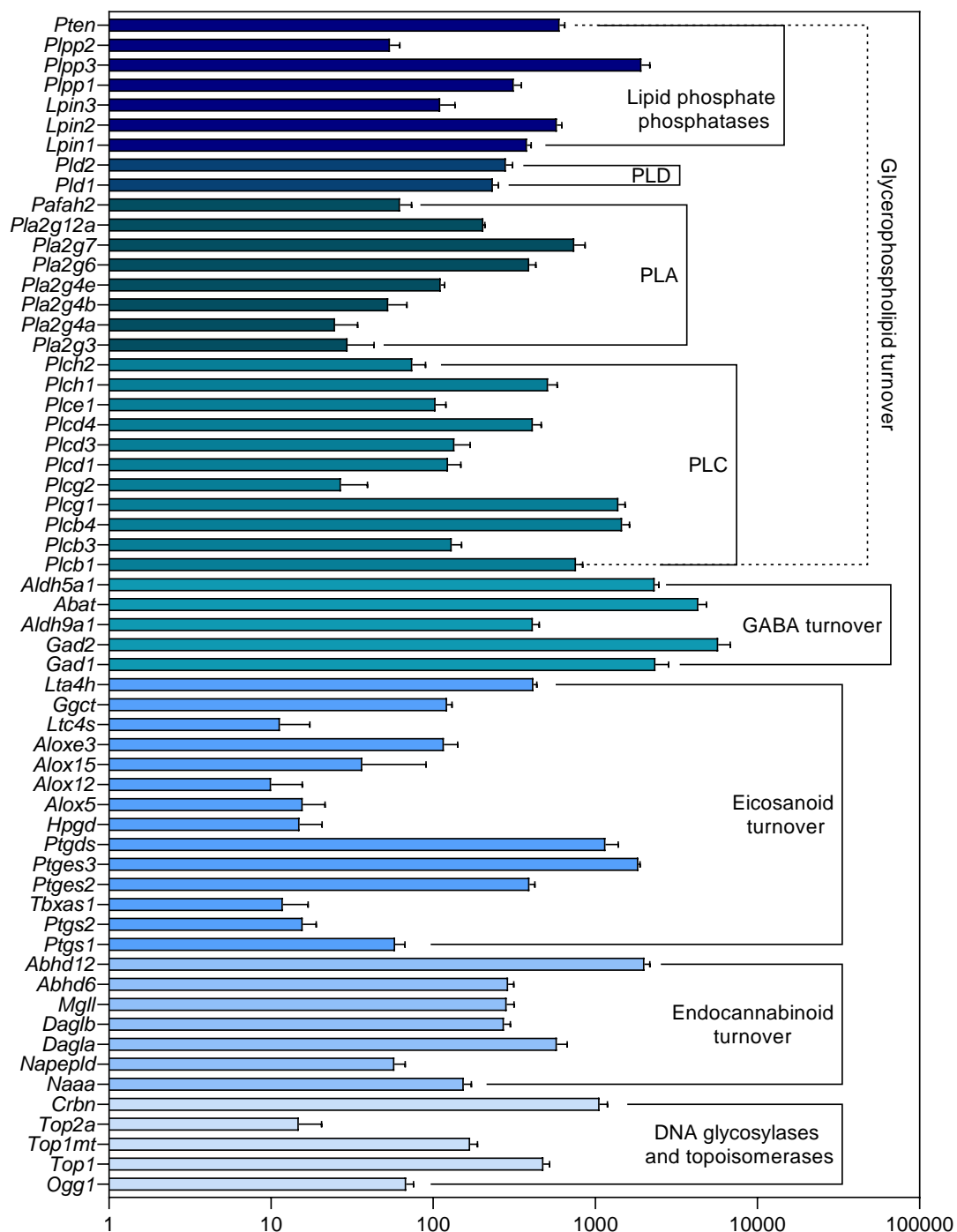


Figura 46. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

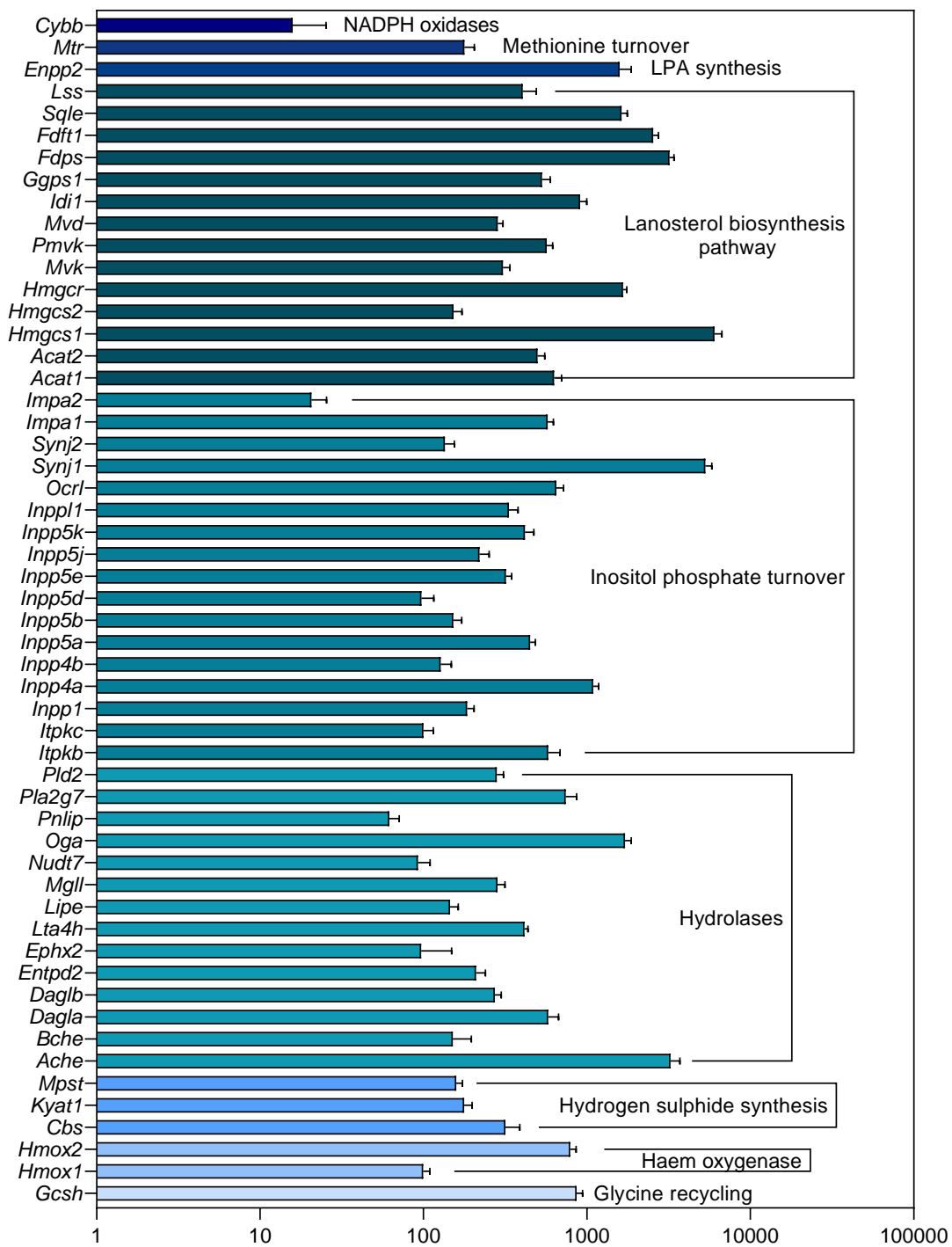


Figura 47. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

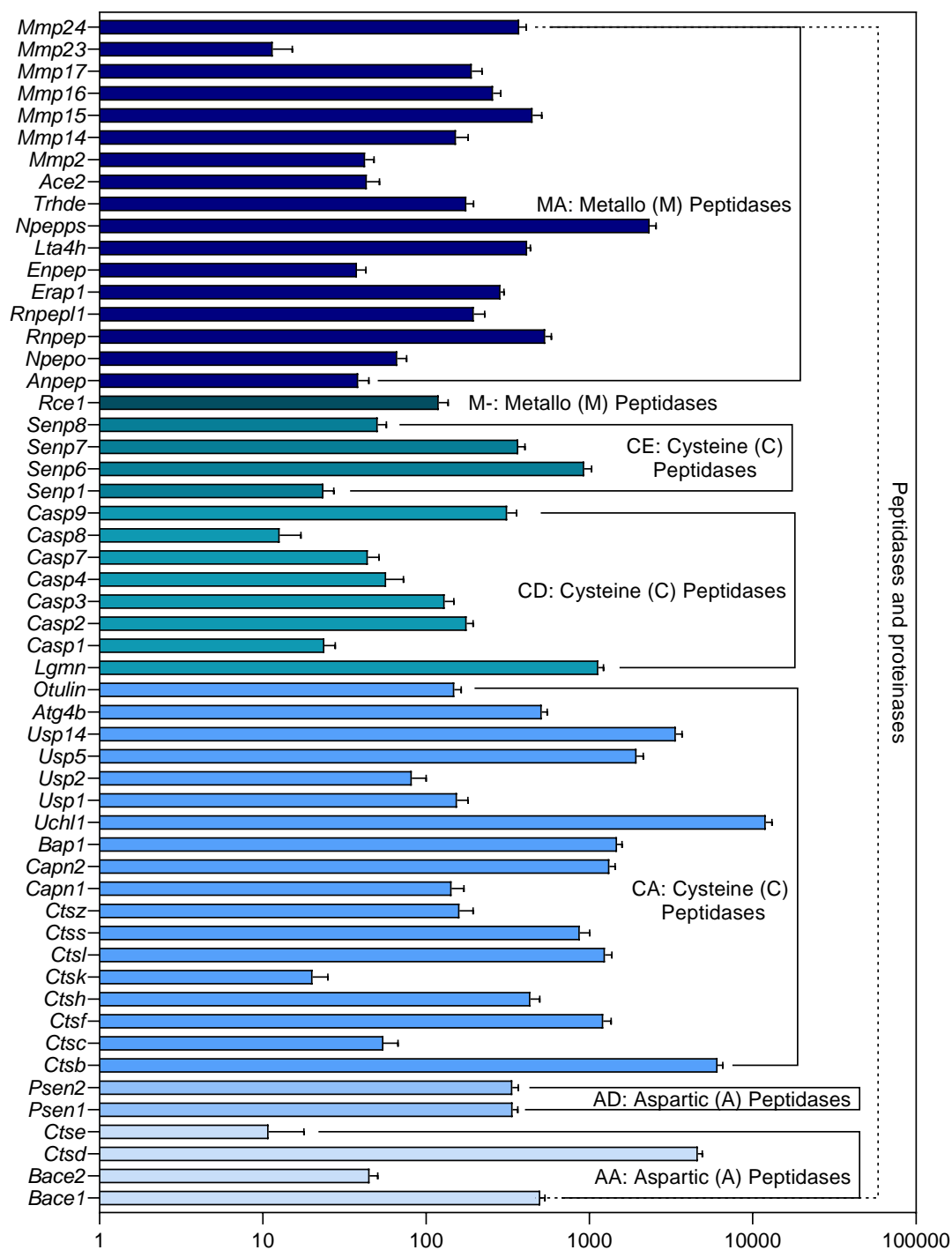


Figura 48. Expressão de mRNA de enzimas presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

Por fim, os gráficos abaixo trazem a relação dos peptídeos endógenos identificados no DRN de ratos Wistar controle com o auxílio do site da IUPHAR.

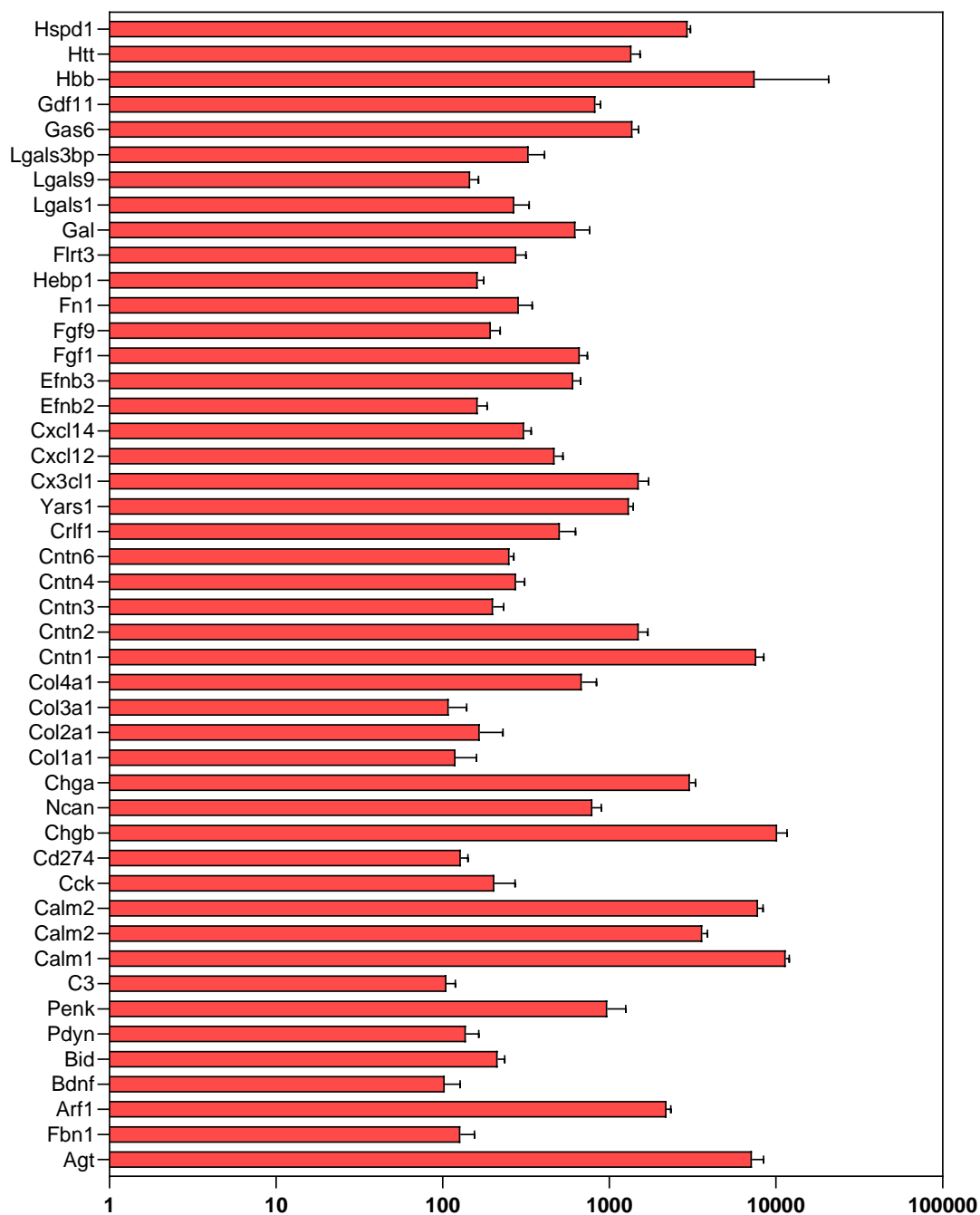


Figura 49. Expressão de mRNA de peptídeos endógenos presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

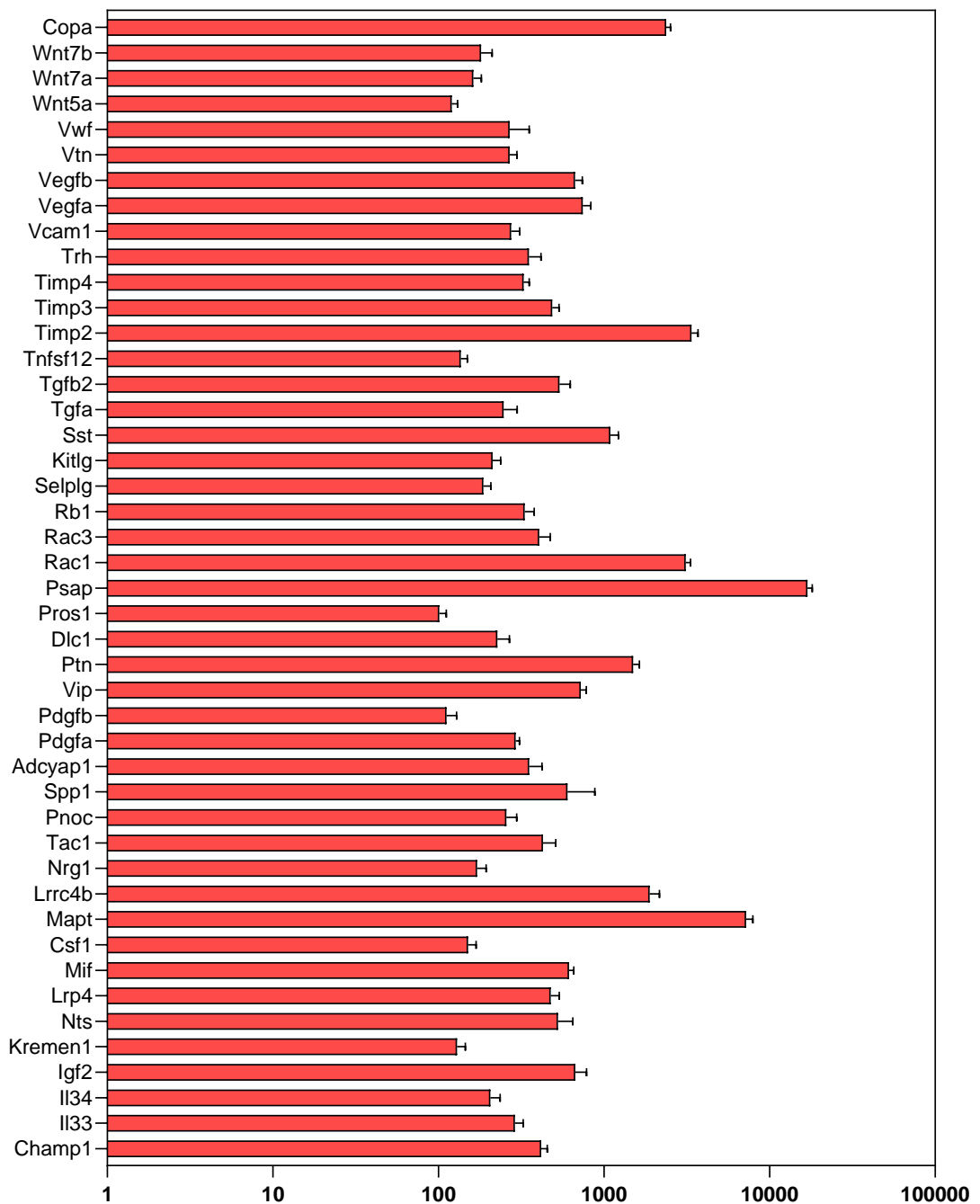


Figura 50. Expressão de mRNA de peptídeos endógenos presentes no DRN e categorizadas de acordo com a IUPHAR.

Tabela 4. Tabela. contendo os valores de leitura dos alvos diferencialmente expressos no grupo furosemida. ID Gene – símbolo do gene, ID Ensembl – código de identificação do banco de dados Ensembl, Média de bases – média de valores obtidos nos grupos controle e furosemida, Estimativa – grau da mudança de expressão estimada, DP – desvio padrão, P. adj. – valor de P ajustado.

ID Gene	ID Ensembl	Média bases	Estimativa	DP	P adj
<i>LOC100360940</i>	ENSRNOG00000008548	11.50517	3.330875	0.66089	0.004908
<i>Slc16a6</i>	ENSRNOG00000000245	50.43977	1.011112	0.195946	0.004908
<i>RGD1564698</i>	ENSRNOG00000030106	51.65035	-0.7712	0.167562	0.022005
<i>Rps10</i>	ENSRNOG00000000490	317.8188	0.50026	0.108232	0.022005
<i>Aurkb</i>	ENSRNOG00000005659	517.971	0.892768	0.199279	0.026306
<i>Ddit4</i>	ENSRNOG00000057078	414.3426	0.554852	0.123868	0.026306

Tabela 5. Descrição dos valores de leitura dos alvos diferencialmente expressos no grupo submetido à sobrecarga salina. ID Gene – símbolo do gene, ID Ensembl – código de identificação do banco de dados Ensembl, Média de bases – média de valores obtidos nos grupos controle e sobrecarga salina, Estimativa – grau da mudança de expressão estimada, DP – desvio padrão, P. adj. – valor de P ajustado.

ID Gene	ID Ensembl	Média bases	Estimativa	DP	P adj
<i>Ctgf</i>	ENSRNOG00000015036	79.1205	1.236241	0.260029	0.003738
<i>Sult1a1</i>	ENSRNOG00000019342	42.78395	1.07996	0.227235	0.003738
<i>Arc</i>	ENSRNOG00000043465	80.11076	0.903999	0.223009	0.035761
<i>Kcnip3</i>	ENSRNOG00000014152	307.2818	0.75046	0.139491	0.000277
<i>LOC501110</i>	ENSRNOG00000033402	140.4676	0.733737	0.179635	0.034049
<i>Atp13a5</i>	ENSRNOG00000024127	153.4561	0.638027	0.09824	6.20E-07
<i>Etnppl</i>	ENSRNOG00000045743	432.8283	0.567646	0.106312	0.000278
<i>Papss2</i>	ENSRNOG00000011068	218.0087	0.565631	0.130645	0.019349
<i>F3</i>	ENSRNOG00000011800	122.3841	0.445561	0.106211	0.028066
<i>Gjb6</i>	ENSRNOG00000022116	558.7558	0.436169	0.078737	0.000151
<i>Htr2a</i>	ENSRNOG00000010063	190.208	0.41977	0.100256	0.028066
<i>Heca</i>	ENSRNOG00000060972	496.8471	0.257861	0.058335	0.014678
<i>Slc39a10</i>	ENSRNOG00000011677	1754.693	0.234518	0.057463	0.034049
<i>Shisa4</i>	ENSRNOG00000007369	734.2952	-0.2886	0.062403	0.006208
<i>Cirbp</i>	ENSRNOG00000015999	426.7859	-0.3492	0.080829	0.019349
<i>Map6d1</i>	ENSRNOG00000001911	178.9255	-0.40944	0.103161	0.04887
<i>Il3ra</i>	ENSRNOG00000001325	173.7791	-0.46219	0.095137	0.002941
<i>RT1-T24-4</i>	ENSRNOG00000042905	96.49805	-0.53558	0.129913	0.032812
<i>Fam71e1</i>	ENSRNOG00000031739	47.90071	-0.7356	0.172561	0.023123
<i>Slc35d3</i>	ENSRNOG00000012311	61.95066	-0.76223	0.183362	0.030016
<i>C3</i>	ENSRNOG00000046834	78.17368	-1.20679	0.170145	1.96E-08
<i>AABR07063082.1</i>	ENSRNOG00000031342	13.94636	-2.00857	0.492724	0.034049

Tabela 6. Descrição dos valores de leitura dos alvos diferencialmente expressos no grupo submetido à privação alimentar por 48h. ID Gene – símbolo do gene, ID Ensembl – código de identificação do banco de dados Ensembl, Média de bases – média de valores obtidos nos grupos controle e privação alimentar, Estimativa – grau da mudança de expressão estimada, DP – desvio padrão, P. adj. – valor de P ajustado.

ID Gene	ID Ensembl	Média bases	Estimativa	DP	P adj
<i>Vip</i>	ENSRNOG00000018808	493.7549	-1.57808	0.12081	7.14E-35
<i>Scd</i>	ENSRNOG00000013552	433.9221	-0.99391	0.096799	6.52E-21
<i>Gfap</i>	ENSRNOG00000002919	4980.407	-1.12707	0.116311	1.47E-18
<i>Fads1</i>	ENSRNOG00000020480	1720.095	-0.55437	0.064029	1.59E-14
<i>Sult1a1</i>	ENSRNOG00000019342	71.91023	2.108318	0.278054	8.98E-11
<i>Aqp4</i>	ENSRNOG00000016043	8958.368	-0.46374	0.065021	2.18E-09
<i>Serpinh1</i>	ENSRNOG00000016831	491.1498	-0.56236	0.080828	6.55E-09
<i>Ednrb</i>	ENSRNOG00000010997	1171.059	-0.48949	0.076096	2.08E-07
<i>Igfbp5</i>	ENSRNOG00000017206	1099.432	-0.77518	0.121454	2.56E-07
<i>Slc25a18</i>	ENSRNOG00000042731	907.9939	-0.49266	0.078576	4.79E-07
<i>Ramp3</i>	ENSRNOG00000053766	260.6122	0.613635	0.101702	1.93E-06
<i>Scd2</i>	ENSRNOG00000046005	35388.27	-0.32918	0.055176	2.68E-06
<i>Glud1</i>	ENSRNOG00000057367	5132.301	-0.21824	0.037014	3.79E-06
<i>Acss1</i>	ENSRNOG00000007102	426.9357	0.621186	0.10574	4.01E-06
<i>Eng</i>	ENSRNOG00000050190	270.6412	-0.62299	0.10766	6.34E-06
<i>Acss2</i>	ENSRNOG00000018755	925.9872	-0.40983	0.074679	3.37E-05
<i>Crhbp</i>	ENSRNOG00000017890	88.88624	-0.88887	0.17174	0.000177
<i>Cyp51</i>	ENSRNOG00000007234	2905.39	-0.40913	0.079974	0.00023
<i>Fabp7</i>	ENSRNOG00000000814	534.0196	-0.57569	0.112818	0.000233
<i>Asrgl1</i>	ENSRNOG00000020202	1003.578	-0.28187	0.055434	0.000244
<i>Itgad</i>	ENSRNOG00000019728	57.87202	-0.98917	0.200673	0.000521
<i>Dhcr7</i>	ENSRNOG00000020776	372.2787	-0.41027	0.084234	0.00067
<i>Rpl3</i>	ENSRNOG00000016896	4897.877	0.26168	0.053837	0.000674
<i>Ampd3</i>	ENSRNOG00000018262	1000.224	-0.31526	0.065158	0.000723
<i>Slc14a1</i>	ENSRNOG00000016753	800.8019	-0.41386	0.088002	0.001359
<i>Ccnd1</i>	ENSRNOG00000020918	236.7302	-0.42944	0.093157	0.002052
<i>Fads2</i>	ENSRNOG00000020440	625.7309	-0.34177	0.0749	0.002474
<i>Hmgcs1</i>	ENSRNOG00000016552	5463.623	-0.36338	0.080104	0.002707
<i>Extl1</i>	ENSRNOG00000016776	415.521	-0.50551	0.111635	0.002716
<i>Slc38a5</i>	ENSRNOG00000027767	36.35616	-0.98862	0.219036	0.002815
<i>Etnppl</i>	ENSRNOG00000045743	406.9765	0.451666	0.100885	0.003233
<i>C3</i>	ENSRNOG00000046834	88.93964	-0.61216	0.13735	0.00344
<i>Ncan</i>	ENSRNOG00000048036	707.6249	-0.40208	0.090373	0.00346
<i>Eif4b</i>	ENSRNOG00000010103	2161.227	0.199055	0.045117	0.003896
<i>Slc5a11</i>	ENSRNOG00000013407	90.67425	-0.55662	0.126195	0.003896
<i>Hmgcs2</i>	ENSRNOG00000019120	209.9225	0.766706	0.17459	0.004142

<i>Hes5</i>	ENSRNOG00000013850	44.21712	-0.99293	0.228471	0.004962
<i>Msmo1</i>	ENSRNOG00000032297	1946.133	-0.29549	0.068176	0.005099
<i>Naprt</i>	ENSRNOG00000007939	119.1118	-0.46236	0.107072	0.005343
<i>Stat3</i>	ENSRNOG00000019742	824.5611	-0.27077	0.063018	0.005598
<i>Bst2</i>	ENSRNOG00000059900	39.31421	-0.78769	0.183159	0.005598
<i>Vsir</i>	ENSRNOG00000000569	322.3138	-0.32266	0.075393	0.005902
<i>Gpd1</i>	ENSRNOG00000056457	654.9046	1.112699	0.261581	0.006327
<i>Crh</i>	ENSRNOG00000012703	54.2194	-0.82081	0.192901	0.006327
<i>Slc19a3</i>	ENSRNOG00000057256	26.07949	1.064684	0.252042	0.007056
<i>Ufd11</i>	ENSRNOG00000047394	806.7016	0.27988	0.067224	0.008306
<i>Sat1</i>	ENSRNOG00000003809	605.461	0.270457	0.064852	0.008306
<i>Gjb6</i>	ENSRNOG00000022116	534.8073	0.361681	0.086832	0.008306
<i>Pnpla7</i>	ENSRNOG00000008190	162.1208	0.433301	0.104037	0.008306
<i>Clca1</i>	ENSRNOG00000060831	19.05155	-1.21251	0.290267	0.008306
<i>Myrip</i>	ENSRNOG00000018797	1466.785	0.342392	0.08294	0.009341
<i>Cdc42ep4</i>	ENSRNOG00000028946	643.4403	-0.30738	0.074473	0.009341
<i>Mmd2</i>	ENSRNOG00000001113	1552.623	-0.25429	0.061845	0.009813
<i>Urm1</i>	ENSRNOG00000026636	361.176	0.292347	0.071443	0.010486
<i>Tmod3</i>	ENSRNOG00000032436	335.05	-0.32244	0.078919	0.010579
<i>Mt2A</i>	ENSRNOG00000043098	108.9971	1.01284	0.248398	0.010766
<i>Bid</i>	ENSRNOG00000012439	243.7027	0.319963	0.079011	0.01192
<i>Atp1b2</i>	ENSRNOG00000011227	6915.011	-0.35408	0.088601	0.014441
<i>Gpatch4</i>	ENSRNOG00000018969	129.6562	0.537476	0.134435	0.014441
<i>Bbs4</i>	ENSRNOG00000026171	561.0931	0.241713	0.06105	0.016593
<i>Kdr</i>	ENSRNOG00000046829	148.7909	-0.76132	0.193387	0.017931
<i>Fhdc1</i>	ENSRNOG00000024594	131.7791	-0.42411	0.107869	0.018015
<i>Acat1</i>	ENSRNOG00000007862	711.1417	0.288143	0.074201	0.020839
<i>Timm22</i>	ENSRNOG00000007988	574.8178	0.20312	0.052332	0.020839
<i>Ptp4a3</i>	ENSRNOG00000007628	268.8036	0.409156	0.105174	0.020839
<i>Rsad2</i>	ENSRNOG00000007539	49.56684	-0.81633	0.210272	0.020839
<i>Rlbp1</i>	ENSRNOG00000016897	257.0566	-0.4607	0.119244	0.022094
<i>Atp1a2</i>	ENSRNOG00000007290	16035.82	-0.26802	0.069462	0.022216
<i>Sox9</i>	ENSRNOG00000002607	232.0358	-0.47993	0.124529	0.022304
<i>Mob1a</i>	ENSRNOG00000059474	254.9584	-0.3397	0.088621	0.023926
<i>Vezt</i>	ENSRNOG00000006514	686.2006	0.213763	0.056154	0.025897
<i>Fv1</i>	ENSRNOG00000019132	661.0257	0.303265	0.079625	0.025897
<i>Crlf1</i>	ENSRNOG00000020030	621.8233	0.524187	0.138491	0.027624
<i>Mertk</i>	ENSRNOG00000017319	232.2206	0.405429	0.107144	0.027624
<i>Slpr1</i>	ENSRNOG00000013683	847.4851	-0.21361	0.056558	0.02789
<i>Pex11a</i>	ENSRNOG00000015003	91.04469	0.694262	0.183914	0.02789
<i>Tmem179</i>	ENSRNOG00000013128	2436.531	0.182828	0.04888	0.031608
<i>Pld2</i>	ENSRNOG00000019604	259.718	-0.28752	0.077278	0.033311
<i>Rgcc</i>	ENSRNOG00000042960	149.3024	-0.3955	0.106298	0.033311
<i>Usp53</i>	ENSRNOG00000014660	334.0542	-0.2679	0.07232	0.035081

<i>Slc11a2</i>	ENSRNOG00000019550	589.2875	0.21107	0.057068	0.03526
<i>Spata13</i>	ENSRNOG00000013707	206.0292	-0.32043	0.086678	0.03526
<i>Rps27</i>	ENSRNOG00000016961	1005.091	0.306254	0.082948	0.035487
<i>Timp4</i>	ENSRNOG00000007955	368.4037	0.27973	0.075883	0.03587
<i>Slc12a4</i>	ENSRNOG00000019651	209.0708	-0.35352	0.096052	0.036264
<i>Afap111</i>	ENSRNOG00000019403	79.75432	-0.49591	0.135493	0.038833
<i>Chi311</i>	ENSRNOG000000053272	440.6044	-0.32278	0.088476	0.040188
<i>Prpf19</i>	ENSRNOG000000020897	3476.445	0.103063	0.028375	0.040929
<i>Nol3</i>	ENSRNOG00000015588	435.126	0.266768	0.07345	0.040929
<i>Clic1</i>	ENSRNOG000000029682	187.5891	-0.3489	0.095891	0.040929
<i>RT1-T24-4</i>	ENSRNOG000000042905	93.93539	-0.57841	0.159049	0.040929
<i>Rpl27a</i>	ENSRNOG00000014214	1529.625	0.210564	0.058063	0.041359
<i>Tdrp</i>	ENSRNOG000000027245	553.7054	0.230127	0.06351	0.041392
<i>Wnt7a</i>	ENSRNOG000000048782	146.1209	-0.38642	0.106953	0.042209
<i>Slc35d3</i>	ENSRNOG00000012311	64.21722	-0.58459	0.161806	0.042209
<i>Slc22a23</i>	ENSRNOG00000017210	1082.589	-0.19881	0.055097	0.042498
<i>Adgre5</i>	ENSRNOG000000004489	164.9498	-0.57293	0.159072	0.042925
<i>C4a</i>	ENSRNOG000000000443	31.36895	-0.81289	0.225773	0.042925
<i>LOC100911483</i>	ENSRNOG000000020602	854.9751	0.210031	0.058467	0.04384
<i>Insig1</i>	ENSRNOG000000006859	1517.706	-0.19717	0.054964	0.04426
<i>Sf3b5</i>	ENSRNOG00000014908	399.7273	0.251599	0.070405	0.046172
<i>Pgrmc1</i>	ENSRNOG00000012786	5681.24	0.153319	0.043006	0.047237
<i>Idi1</i>	ENSRNOG00000016690	831.3857	-0.32183	0.090838	0.049652
<i>Snx4</i>	ENSRNOG00000001786	654.3835	0.243031	0.068541	0.049652
<i>Trim9</i>	ENSRNOG000000007031	608.2029	-0.26499	0.074817	0.049652
<i>Rasa3</i>	ENSRNOG00000017671	483.7426	-0.24363	0.068778	0.049652
<i>Pebp1</i>	ENSRNOG00000001136	5770.817	0.155823	0.044079	0.049983
<i>Angptl4</i>	ENSRNOG000000007545	96.58274	0.615061	0.173975	0.049983

Tabela 7. Descrição dos valores obtidos na análise de enriquecimento de componentes celulares do grupo submetido à privação alimentar por 48h.

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)	Genes
<u>GO:0097450</u>	astrocyte end-foot	1.67E-5	3.21E-2	55.16 (15151,8,103,3)	Aqp4, Atp1b2, Gfap
<u>GO:0097449</u>	astrocyte projection	3.71E-4	3.58E-1	21.01 (15151,21,103,3)	Aqp4, Atp1b2, Gfap
<u>GO:0031968</u>	organelle outer membrane	5.34E-4	3.43E-1	5.92 (15151,149,103,6)	Bid, Pgrmc1, Pebp1, Dhcr7, Rsad2, Slc11a2
<u>GO:0019867</u>	outer membrane	5.34E-4	2.57E-1	5.92 (15151,149,103,6)	Bid, Pgrmc1, Pebp1, Dhcr7, Rsad2, Slc11a2