



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO ANTINATRIOREXIGÊNICO E ANSIOLÍTICO DA
ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DE CARVACROL EM
RATOS: INFLUÊNCIA DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS,
ADRENÉRGICAS E POSSÍVEIS ÁREAS CEREBRAIS
ENVOLVIDAS**

FILIP DE SOUZA POLLI

Salvador – Bahia – Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**EFEITO ANTINATRIOREXIGÊNICO E ANSIOLÍTICO DA
ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DE CARVACROL EM RATOS:
INFLUÊNCIA DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS, ADRENÉRGICAS E
POSSÍVEIS ÁREAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS**

FILIP DE SOUZA POLLI

Orientadora: Josmara Bartolomei Fregoneze

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Polli, Filip de Souza
P774e Efeito antinatriorexigênico e ansiolítico da administração intracerebral de
carvacrol em ratos: influência das vias serotoninérgicas, adrenérgicas e possíveis
áreas cerebrais envolvidas/Filip de Souza Polli. - 2014.
128 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profª. Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze, Laboratório de
Neurociências da UFBA.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da
Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. Ansiedade. 2. Sódio. 3. Efeito ansiolítico. 4. Orégano. I.Título.

CDU 616.89-008.441

EFEITO ANTINATRIOREXIGÊNICO E ANSIOLÍTICO DA
ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBRAL DE CARVACROL EM RATOS:
INFLUÊNCIA DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS, ADRENÉRGICAS E
POSSÍVEIS ÁREAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS

FILIP DE SOUZA POLLI

Folha de Aprovação

FONTES DE FINANCIAMENTO

A realização deste trabalho contou com o apoio financeiro do
Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Humberto e Magda** pelo apoio, orientação e incentivo incondicional em todos os momentos.

Aos familiares que sempre me apoiaram, em especial à **Graça, Matheus, Viviane, José Roberto e Ana** pelo suporte inestimável.

À **Josmara** pela confiança, orientação dedicada e exemplo de devoção científica.

A **Brandão** pela amizade e incentivo aos meus projetos, e por me apresentar à neurociência.

Aos professores do Laboratório de Neurociências **Hilda e Rejane** pelo auxílio e ensinamentos ao longo do desenvolvimento do projeto.

Aos integrantes do Laboratório de Neurociências, em especial à **Ana, Diana e Átila** pela disposição e ensinamentos.

A **Jefferson** por sua contribuição para a realização deste projeto.

A **José de Souza** por toda a disposição e apoio técnico.

Aos amigos **Caio Nogueira, Yuri Peixoto, Isaac Guedes, Lucas Maltez, Alan Monteiro, Nicolas Oliveira, Beto Mondini, David Schmid, Israel Ramos, Jorge Bispo, Samadhi Pimentel, Fabio Santos, Thiago Gondim, Ednan Galvão, Edílio Neto, Vinicius Ferreira, André Leal, Rafael Angélico e Wessley Castro** por todos os momentos de incentivo e descontração ao longo dos últimos anos.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de incentivo à pesquisa.

Meus mais sinceros
agradecimentos.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

POLLI, Filip de Souza. Efeito antinatriorexigênico e ansiolítico da administração intracerebral de carvacrol em ratos: influência das vias serotoninérgicas, adrenérgicas e possíveis áreas cerebrais envolvidas. 128 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2014.

RESUMO

O óleo essencial do orégano apresenta entre seus principais constituintes o carvacrol (70%). O extrato de orégano administrado intraperitonealmente em camundongos inibe a recaptação e a degradação de neurotransmissores monoaminérgicos (dopamina, serotonina e noradrenalina) de modo dose dependente, além de aumentar os níveis de serotonina em diversas áreas cerebrais, e esses efeitos foram atribuídos ao carvacrol. O carvacrol administrado por via oral em camundongos demonstrou significativo aumento em todos os parâmetros observados no teste de ansiedade na cruz elevada. O controle central da ingestão de água e do apetite por sódio é feito por uma complexa rede interativa de circuitos inibitórios e estimulatórios. Sabe-se que tanto a noradrenalina quanto a serotonina participam do controle do apetite por sódio e desconhecem-se os efeitos do carvacrol neste comportamento. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da administração intracerebroventricular de carvacrol no apetite por sódio, na sede, na ansiedade e na atividade locomotora em ratos, bem como detectar a presença de FOS em áreas cerebrais relacionadas com esses comportamentos através de FOS-IR. Ratos Wistar, machos, pesando entre 230-250g, foram anestesiados e submetidos à canulação estereotáxica do ventrículo lateral (VL). No dia anterior aos experimentos, os ratos receberam injeção de furosemida (20mg/kg; s.c.) e dieta hipossódica. Os animais receberam CVC nas concentrações de 25, 50, 75, 150, 300 µg/5µl ou veículo e o consumo de salina hipertônica e água destilada foram medidos durante 1h. Para testar o envolvimento de vias serotoninérgicas e adrenérgicas, animais receberam pCPA (200 µg/2µl) ou PRA (40, 80 ou 160 nmol) no VL antes das microinjeções de CVC. Para o teste de ingestão de água ratos com privação hídrica de 12 horas antes dos experimentos receberam CVC 25, 50, 75, 150, 300 µg/5µl ou veículo. Um segundo grupo de animais foi submetido ao teste da cruz elevada aos 5 e 30 min após injeção de CVC (150, 300 e 600 µg/5 µl) em sala iluminada com lâmpada vermelha de baixa intensidade luminosa (3,2 lux). O teste durou 5 minutos e foi registrado em vídeo os seguintes parâmetros foram avaliados: número de entradas e tempo de permanência nos braços do aparato. Para detectar a presença de FOS, um terceiro grupo de ratos recebeu CVC 300 µg/5µl ou veículo e foram anestesiados 5 ou 30 min após e submetidos à perfusão transcardíaca de salina fosfato (0,01M) e paraformaldeído (4%). Os cérebros foram removidos, e processados para identificação da expressão de FOS o número de núcleos FOS-IR foi contado através do *software* “Image-Pro Discovery”. Os dados foram submetidos a um modelo misto de ANOVA *two way* ou ao Teste t de Student. Carvacrol inibiu o apetite por sódio de modo dose dependente e o bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos atenuou a inibição do apetite por sódio induzido pelo CVC.

A depleção serotoninérgica central também atenuou o efeito antinatriorexigênico do CVC. A injeção de CVC no VL não modificou a ingestão hídrica em ratos privados de água por 15h. A administração de CVC nas concentrações de 300 e 600 µg resultaram em efeito ansiolítico. Além disso, o CVC promove aumento da expressão de FOS nas seguintes áreas: núcleo supra-óptico, núcleo supra-quiasmático, hipotálamo ventromedial, hipotálamo dorsomedial, hipotálamo lateral anterior, substância cinzenta periaquedutal nas regiões ventrolateral, dorsal e lateral, núcleos da amígdala medial, central e basolateral, núcleo paraventricular talâmico e núcleo acumbens. Os resultados desse estudo indicam que a administração i.c.v. de CVC resulta em efeito ansiolítico e antinatriorexigênico, este último mediado por vias noradrenérgicas e serotoninérgicas. Demonstraram, ainda, que esses efeitos ocorrem através da ativação neuronal de diversas regiões, principalmente hipotalâmicas, que estão envolvidas com os comportamentos estudados.

Palavras-chave: Carvacrol, apetite por sódio, ansiedade, FOS.

POLLI, Filip de Souza. Antinatriorexigenic and Anxiolytic Effect Of The Intracerebral Administration of Carvacrol In Rats: Influence Of Serotonergic And Adrenergic Pathways And Possible Brain Areas Involved. 128 f. il. Dissertation (Master's Degree) – Oswaldo Cruz Foundation. Federal University of Bahia, Health Science Institute, Salvador, 2014.

ABSTRACT

The essential oil of oregano has among its main constituents carvacrol (70%). The oregano extract administered intraperitoneally in mice inhibits the reuptake of monoamine neurotransmitters degradation (dopamine, serotonin and norepinephrine) in a dose-dependent manner, and increases serotonin levels in several brain areas. The carvacrol administered orally in mice showed a significant increase in all parameters observed in the anxiety test in elevated plus maze. The control of water intake and sodium appetite is done by a complex interactive network of stimulatory and inhibitory circuits. It is known that norepinephrine, as well as serotonin, is involved in the control of sodium appetite and it is unknown the effects of carvacrol in these behaviors. The present study aimed to investigate the effect of intracerebroventricular administration of carvacrol on sodium appetite, in the anxiety and locomotor activity in rats, as well as the FOS expression in brain areas related to these behaviors. Male Wistar rats, weighing between 230-250g were anesthetized and underwent stereotactic cannulation of the lateral ventricle (LV). The day before the experiments, rats received injections of furosemide (20mg/kg, sc) and low sodium diet. The animals received CVC at concentrations of 25, 50, 75, 150, 300 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ or vehicle and the hypertonic saline and distilled water intake were measured for 1h. To test the involvement of serotonergic and adrenergic pathways, the animals received pCPA (200 $\mu\text{g}/2\mu\text{l}$) or PRA (40, 80 or 160 nmol) in VL before microinjections of CVC. To test the water intake of rats deprived of water for 12 hours CVC was injected at 25, 50, 75, 150, 300 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ or vehicle. A second group of animals was subjected to the elevated plus maze test at 5 and 30 min after injection of CVC (150, 300 and 600 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) in room illuminated with red light with low light intensity (3.2 lux). The test lasted 5 minutes and was recorded on video. The following parameters were evaluated: number of entries and time spent in the arms of the apparatus. To detect the presence of FOS, a third group of rats received vehicle or CVC 300 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ and were anesthetized after 5 or 30 min and subjected to transcardiac perfusion of saline (0.01 M) and paraformaldehyde (4%). The brains were removed and processed for identification of the FOS expression of the number of FOS-IR nuclei were counted by "Image-Pro Discovery" software. The data were submitted to a mixed model two-way ANOVA or Student's t test. Carvacrol inhibited sodium appetite in a dose-dependent way and the blockade of alpha-adrenergic receptors attenuated the inhibition of sodium appetite induced by CVC. The central serotonin depletion also impairs the effect antinatriorexigenic of CVC. Regarding water intake, the injection of CVC in VL did not change the water intake in rats deprived of water for 12 hours. The administration of CVC 300 and 600 μg resulted in anxiolytic

effect. Furthermore CVC promotes increased FOS expression in the following brain areas: supraoptic nucleus, nucleus supra-chiasmatic, ventromedial hypothalamus, dorsomedial hypothalamus, anterior lateral hypothalamus, the periaqueductal gray in the lateral, dorsal and ventrolateral regions, dorsal and medial nuclei of the amygdala, central and basolateral, paraventricular thalamic nucleus and nucleus accumbens. The results of this study indicate that the central administration CVC results in anxiolytic and antinatriorexigenic effect, the latter mediated by noradrenergic and serotonergic pathways. They also showed that these effects occur through neuronal activation in various regions, mainly hypothalamic who are involved with the behaviors studied.

Keywords: Carvacrol, sodium appetite, anxiety, FOS.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Efeito de microinjeções de diferentes concentrações de CVC sobre a ingestão de água destilada e salina 1,5% em ratos depletados de sódio.	59
Tabela 1	Efeito de microinjeções de CVC no VL sobre a ingestão de água destilada e de salina 1,5% em animais depletados de sódio .	60
Figura 2	Efeito de microinjeções de CVC (300 µg) sobre a ingestão de água destilada em ratos submetidos à privação hídrica <i>overnight</i> .	61
Figura 3	Efeito de microinjeções de PCPA (200µg) 72h antes da administração de CVC (300 µg) no VL sobre a ingestão de água destilada e salina hipertônica em ratos depletados de sódio.	62
Tabela 2	Efeito de microinjeções de PCPA (200µg/2µL) 72h antes da administração de CVC (300µg/5µL) no VL sobre a ingestão de salina 1,5% e água destilada em animais depletados de sódio.	63
Figura 4	Efeito de microinjeções de PRA (40, 80 e 160 nmol) 30 min. antes da administração de CVC (300 µg) no VL sobre a ingestão de salina hipertônica e água destilada em animais depletados de sódio.	65
Tabela 3	Efeito de microinjeções de PRA (40, 80 e 160 nmol) 72h antes da administração de CVC (300µg/5µL) no VL sobre a ingestão de salina 1,5% e água destilada em animais depletados de sódio.	66
Tabela 4	Sumário dos resultados da ANOVA modelo misto para medidas repetidas para a ingestão de salina 1,5% e água destilada, demonstrando correlação entre Interação, Tempo e Droga.	67
Figura 5	Valores de intensidade luminosa registrados a partir de luxímetro posicionado em 5 diferentes pontos do labirinto em cruz elevada.	70
Figura 6	Representação gráfica do registro dos espectros de onda registrados através do uso de espectrômetro no centro do labirinto em cruz elevada.	70
Figura 7	Efeito de microinjeções i.c.v. de CVC no teste da cruz elevada, 5 e 30 minutos de ação da droga.	71
Tabela 5	Sumário dos resultados da ANOVA <i>one way</i> para os parâmetros do teste da cruz elevada, 5 e 30 minutos de ação da droga.	72
Figura 8	Efeito de microinjeções de CVC 5 e 30 minutos antes do posicionamento dos ratos no centro do campo aberto.	73
Figura 9	Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos pré-óptico medial, mediano e órgão vascular da lâmina terminal.	76
Figura 10	Representação gráfica do efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos pré-óptico medial, mediano e órgão vascular da lâmina terminal.	77
Figura 11	Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos supra-óptico, supraquiasmático e paraventricular hipotalâmico.	78
Figura 12	Representação gráfica do efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos supra-óptico, supraquiasmático e paraventricular hipotalâmico.	79

Figura 13	Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos ventromedial, dorsomedial e hipotálamo lateral anterior.	80
Figura 14	Representação gráfica do efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos ventromedial, dorsomedial e hipotálamo lateral anterior.	81
Figura 15	Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS na matéria cinzenta periaquedutal, regiões dorsal, lateral e ventrolateral.	82
Figura 16	Representação gráfica do efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS na matéria cinzenta periaquedutal, regiões dorsal, lateral e ventrolateral.	83
Figura 17	Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS na amígdala, regiões medial, central e basolateral.	84
Figura 18	Representação gráfica do efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS na amígdala, regiões medial, central e basolateral, e na região ventral do núcleo da estria terminal.	85
Figura 19	Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos acúmbens e paraventricular talâmico.	86
Figura 20	Representação gráfica do efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos acúmbens e paraventricular talâmico.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Córtex cingulado anterior
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio antidiurético
ANGII	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ALDO	Aldosterona
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP	Área póstrema
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
A3V3	Região ânteroventral do terceiro ventrículo
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo da estria terminal
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CCE	Caixa claro escuro
CeA	Amígdala central
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CVC	Carvacrol
DMH	Núcleo hipotalâmico dorsomedial
DRN	Núcleo da rafe dorsal
DZP	Diazepam
ECF	Líquido extracelular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPA	Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal
i.c.v.	Intracerebroventricular
ICF	Líquido intracelular
INS	Córtex insular
ISRS	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina
LA	Núcleo hipotalâmico lateral anterior
LC	Loco cerúleo
LCE	Labirinto em cruz elevada
LPBN	Porção lateral do núcleo parabraquial
MeA	Amígdala medial
MNCs	Células magnocelulares
MnPO	Área pré-óptica mediana
MPO	Área pré-óptica medial
MRI	Ressonância magnética de interferência
MRN	Núcleo medial da rafe
NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo accumbens
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NTEB	Número total de entradas nos braços
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão vasculoso da lâmina terminal

PAG	Matéria cinzenta periaquedutal
PBN	Núcleo parabraquial
PCPA	Para-clorofenilalalina
PET	Tumografia por emissão de pósitrons
PRA	Prazosina
PVA-THAL	Núcleo paraventricular talâmico
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
5-HT	Serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
Sch	Núcleo supraquiasmático
SFO	Órgão subfornical
SON	Núcleo supraóptico
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TRP	Canais de potencial transitório
VL	Ventrículo lateral
VLE	Ventrículo lateral esquerdo
VLM	Medula ventrolateral
VMH	Hipotálamo ventromedial
VP	Vasopressina
%EBA	Porcentagem de entrada nos braços abertos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	PLANTAS E PRODUTOS NATURAIS	19
2.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO CARVACROL	21
2.3	ATIVIDADES DO CARVACROL NO SISTEMA NERVOSO	22
2.4	MECANISMOS CENTRAIS DO CONTROLE DO BALANÇO DOS LÍQUIDOS CORPORAIS	25
2.5	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DO APETITE POR SÓDIO	34
2.6	ANSIEDADE	36
2.7	O LABIRINTO DA CRUZ ELEVADA COMO MODELO PARA O ESTUDO DA ANSIEDADE	46
3	OBJETIVOS E HIPÓTESES	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3.3	HIPÓTESES	
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	ANIMAIS	50
4.2	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	50
4.3	DROGAS E MICROINJEÇÕES	51
4.4	DEPLEÇÃO DE SÓDIO	51
4.5	EFEITO DO CARVACROL NO TESTE DE APETITE POR SÓDIO	52
4.6	EFEITO DO CARVACROL NA INGESTÃO DE ÁGUA EM MODELO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA	52
4.7	PAPEL DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO	53
4.8	PAPEL DAS VIAS A1-ADRENÉRGICAS NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO	53
4.9	EFEITO DO CARVACROL NA ANSIEDADE: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA	54
4.10	EFEITO DO CARVACROL NA ATIVIDADE LOCOMOTORA	55
4.11	EFEITO DO CARVACROL NA ATIVAÇÃO NEURONAL ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FOS (FOS-IR)	56
4.12	HISTOLOGIA PARA CONFIRMAÇÃO DE ACERTO NA CANULAÇÃO	57
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
5	RESULTADOS	58
5.1	EFEITO DO CARVACROL NO TESTE DE APETITE POR SÓDIO	58
5.2	EFEITO DO CARVACROL NA INGESTÃO DE ÁGUA EM MODELO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA	61
5.3	PAPEL DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO	62
5.4	PAPEL DAS VIAS A1-ADRENÉRGICAS NA RESPOSTA DO	65

	CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO	
5.5	EFEITO DO CARVACROL NA ANSIEDADE: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA	69
5.6	EFEITO DO CARVACROL NA ATIVIDADE LOCOMOTORA	73
5.7	EFEITO DO CARVACROL NA ATIVAÇÃO NEURONAL ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FOS (FOS-IR)	74
6	DISCUSSÃO	88
7	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm demonstrado que uma variedade de produtos naturais possui substâncias que podem ser aplicadas para os mais diversos fins terapêuticos. Muitas destas substâncias são produzidas como parte do metabolismo secundário de plantas, que, dentre outras funções, está envolvido com adaptações ao estresse biótico (NASCIMENTO et al., 2010; PEÑUELAS e MUNNÉ-BOSCH, 2005; ZHAO et al., 2005). Tem sido descrito na literatura que muitos desses metabólitos de origem vegetal, notadamente os terpenos, possuem propriedades antifúngicas, antibacteriana e antiprotozoário. Os terpenos são moléculas com 5 átomos de carbono em suas cadeias e são sintetizados a partir do ácido mevalônico resultante da associação entre moléculas de acetil-coenzima A (CoA).

As Lamiaceae são uma família de plantas altamente desenvolvidas, com larga distribuição geográfica e cerca de 4000 espécies. A propriedade aromática de suas espécies é resultado da presença de grande quantidade de terpenos, fenóis e flavonóides. O gênero *Origanum* é membro desta família, e tem sido relatado que o óleo essencial de representantes deste gênero possui uma variedade de propriedades medicinais, e que essas propriedades são conferidas, em grande parte, pelo carvacrol, um monoterpene que pode representar até 80% do óleo essencial de algumas espécies (WAGNER et al., 1986; AYDIN et al., 1996; ZEYTINOGLU et al., 1998; KOPARAL et al., 2003; SON et al., 2005; KARKABOUNAS et al., 2006; AYDIN et al., 2007).

Muitos estudos têm demonstrado que o carvacrol pode atuar no sistema nervoso central e modular a atividade de diferentes neurotransmissores. Demonstrou-se em camundongos tratados periféricamente com carvacrol atividade ansiolítica e antidepressiva, e que esta ação pode ser mediada por vias GABAérgicas e dopaminérgicas, respectivamente (MELO et al., 2009; 2010). Outros estudos demonstraram que o carvacrol pode atuar através da inibição de receptores de potencial transitórios (TRP) (PARNAS et al., 2009; PETERS et al., 2012), o que contribuiria com efeito neuroprotetor após lesão traumática em camundongos (PETERS et al., 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que o extrato de orégano administrado oralmente em camundongos é capaz de inibir a reabsorção e a degradação de neurotransmissores monoaminérgicos como dopamina, serotonina e noradrenalina, dados também observados em estudos *in vitro* (MECHAN et al., 2010).

O apetite específico por sódio é um comportamento motivado, conservado em muitas espécies, resultante da perda orgânica deste íon, e que tem por finalidade reestabelecer o equilíbrio hidrossalino corporal. O controle central da ingestão de água e do apetite por sódio é feito por uma complexa rede interativa de circuitos inibitórios e estimulatórios, e sabe-se que tanto a noradrenalina quanto a serotonina participam do controle destes comportamentos. Deste modo, qualquer composto químico que possua a propriedade de alterar a disponibilidade de serotonina e/ou noradrenalina possui o potencial de promover a alteração deste ou de qualquer outro estado emocional dos quais estão envolvidos estes neurotransmissores. Como o carvacrol modifica a disponibilidade de 5-HT e NA cerebral, é possível que este composto altere a ingestão de água e o apetite por sódio. Entretanto, até o momento, nenhum estudo da literatura investigou se o carvacrol possui efeito neste comportamento.

A ansiedade é uma emoção resultante da antecipação de algum tipo de ameaça real ou imaginária. Assim como as demais formas de emoção, ela é gerada a partir de uma complexa rede neural que envolve vias excitatórias (como o glutamato, dopamina, noradrenalina, etc.) e vias inibitórias (serotonina, GABA, etc.). Estudos têm demonstrado que o carvacrol altera a disponibilidade monoaminérgica na fenda sináptica em diversas regiões corticais e mesencefálicas mesmo após administração periférica (TRABACE et al., 2011; MECHAN et al., 2011), podendo interferir em processos emocionais como ansiedade e depressão (MELO et al., 2010; 2011). Contudo, este trabalho foi realizado em camundongos e a administração de CVC foi por via oral e os mecanismos de ação do carvacrol ainda não estão bem compreendidos, não existindo nenhum estudo verificando se a microinjeção intracerebroventricular de CVC também resulta em atividade ansiolítica.

A detecção de núcleos neuronais imunorreativos a FOS (FOS-IR) é um método amplamente empregado para investigar a ativação neuronal resultante de diferentes tratamentos em modelos experimentais. Estudos com FOS-IR têm revelado ativação de várias estruturas límbicas em resposta a estímulos dipsogênicos (GIOVANNELLI et al., 1992; FITZSIMONS, 1998; PASTUSKOVAS et al., 2002; HOLLIS et al., 2008), bem como na modulação do apetite por sódio (DARVEN e MCKINLEY, 2010) e também em respostas relacionadas com a ansiedade (MORGAN e CURRAN, 1991; SILVEIRA et al., 1993; CANTEIRA e GOTO, 1999; SINGLEWALD e SHARP, 2000;

DIELENBERG et al., 2001). O carvacrol pode levar a ativação de diferentes áreas cerebrais e com isso modificar os comportamentos de ingestão de água, do apetite por sódio e da ansiedade. O emprego da metodologia de detecção FOS-IR em animais tratados com carvacrol pode trazer importante contribuição para o conhecimento dos mecanismos de ação do CVC.

Tendo em vista o largo uso medicinal de plantas e de óleos essenciais, o crescente número de estudos apontando efeito anti-hipertensivo e cardioprotetor de produtos derivados de plantas, e ainda a escassez de trabalhos sobre a ação destes no sistema nervoso central, decidimos no presente estudo investigar os efeitos da administração intracerebral do carvacrol no controle da ingestão de água, do apetite por sódio, na ansiedade e na atividade locomotora em ratos, bem como estudar os efeitos do CVC no envolvimento de vias serotoninérgicas e adrenérgicas e investigar possíveis áreas cerebrais envolvidas nesses efeitos através da detecção de FOS-IR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS E PRODUTOS NATURAIS

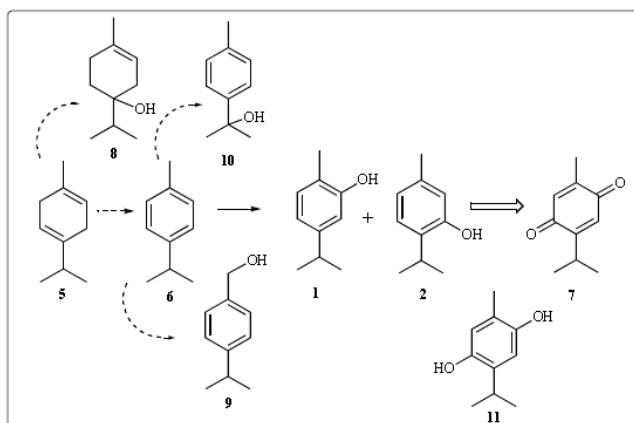
Diversas plantas são utilizadas na fabricação de drogas, empregadas na medicina convencional, bem como fitoterápicos, na forma de extrato de plantas, óleos essenciais e infusões. O uso indiscriminado de fitoterápicos pode trazer sérios riscos para os pacientes com ocorrência de efeitos adversos e possível interação medicamentosa. (HOSTETTMANN, 1997; SOEJARTO, 1996).

O metabolismo primário das plantas é importante para seu crescimento e desenvolvimento, enquanto o metabolismo secundário está envolvido na função adaptativa ao estresse biótico e abiótico (NASCIMENTO et al., 2010; PEÑUELAS e MUNNÉ-BOSCH, 2005; ZHAO et al., 2005). Os detalhes das vias biossintéticas do metabolismo secundário das plantas são pouco conhecidos, mas tem sido objeto de intensa pesquisa. Entre os metabólitos secundários de origem vegetal estão os terpenos ou terpenóides, derivados do 2-metil-butadieno (isopreno), molécula com 5 átomos de carbono. Estes compostos encontram-se em sementes, flores, folhas, raízes e madeira de plantas superiores e são sintetizados a partir do ácido mevalônico resultante da associação de três unidades de acetil-coenzima A (A-CoA). De acordo com o número de unidades de isopreno presentes os terpenos são classificados em: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (15), diterpenos (20), triterpenos (30), tetraterpenos ou carotenoides (C40) e politerpenos (unidades maiores) (PEÑUELAS e MUNNÉ-BOSCH, 2005; GOTO et al., 2010).

Técnicas de biologia molecular têm sido empregadas na construção de uma árvore filogenética de plantas superiores e inferiores com a caracterização dos perfis de produção de metabólitos secundários (WINK, 2003). A filogenia molecular de três grandes famílias de plantas (*Fabaceae*, *Solanaceae* e *Lamiaceae*) tem sido as mais estudadas e avaliadas quanto a ocorrência de alguns de seus metabólitos secundários. Entre estas famílias, a *Lamiaceae* apresenta larga distribuição geográfica, e devido a suas características aromáticas, apresentam tanto uso culinário quanto medicinal e cosmético. Os metabólitos secundários típicos das *Lamiaceae* incluem vários terpenóides, especialmente mono-, sesqui- di- e tri-terpenos e também vários compostos fenólicos e flavonóides (WINK, 2003). As *Lamiaceae* constituem uma

família de plantas altamente desenvolvidas e com muita variabilidade estrutural, o que dificulta sua classificação, sendo atualmente conhecidas cerca de 4000 espécies. Essa família pode ser dividida em dois grupos de acordo com a produção de metabólitos secundários: o primeiro grupo representado pela subfamília *Nepetoideae*, constituída principalmente por plantas aromáticas com a presença de ácido rosmarínico; e o segundo grupo representado pelas subfamílias *Caryopteridoideae*, *Ajugoideae*, *Chloanthoideae*, *Wenchengioideae*, *Scutellarioideae* e *Lamioideae*, caracterizados por muito baixa quantidade de óleo essencial, ausência de ácido rosmarínico e presença de glicosídeos iridóides (WINK, 2003). A subfamília *Nepetoideae* é subdividida em 34 tribos e 298 gêneros, entre as tribos inclui-se a *Mentheae* onde está presente o gênero *Origanum* que por sua vez se subdivide em 249 espécies (http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/Origanum_Genus.asp).

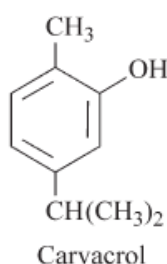
Os óleos essenciais, segundo a *International Standard Organization*, podem ser definidos como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). O óleo essencial do orégano é produzido por destilação e entre seus principais constituintes estão o carvacrol (70%) e o timol (30%), monoterpênos sintetizados a partir de γ -terpineno até p-cimeno (17%) que também estão presentes no óleo essencial (BASER, 2008).



Biossíntese do carvacrol e monoterpênos relacionados. (5) γ -terpineno; (6) p-cimeno; (1) carvacrol; (2) timol, (8) terpineno-4-ol; (9) álcool cumino e (10) p-cymen-8-ol. (BASER 2008).

2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO CARVACROL

O carvacrol (também conhecido como isopropil-o-cresol, p-cimeno-2-ol, 5-isopropil-2-timol ou iso-timol) é um monoterpreno de fórmula química $C_{10}H_{14}O$ e peso molecular de 150,21 (DE VINCENZI, 2004). Sua estrutura química está representada abaixo:



O carvacrol é componente de diversos óleos essenciais de plantas aromáticas incluindo o orégano (*Origanum vulgares*, *O. dictamnus* e *O. majorana*). Este composto isolado do óleo de orégano apresenta atividade colerética, anti-espasmódica, antibacteriana e antifúngica (DORMAN e DEANS 2000; LAMBERT et al., 2001; MANOHAR et al., 2001; PREUSS et al., 2005; BOTELHO et al., 2007; BASER, 2008), bem como potente efeito antiprotozoário (*Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzii*, *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum*) (TASDEMIR et al., 2006). A atividade antimicrobiana do carvacrol está relacionada com sua ação biológica nas membranas bacterianas. Sua ação é exercida por rapidamente depletar os níveis de ATP intracelular ao reduzir sua síntese (GILL, 2006) e aumentar sua hidrólise (KNOBLOCH et al., 1986). A redução do potencial elétrico transmembrana (que é a principal condutora da síntese de ATP) aumenta a permeabilidade de prótons, reduzindo o pH intracelular bacteriano por efeito do gradiente de concentração iônicos. A perda de K^+ é uma evidência de que o carvacrol pode promover alterações em membranas microbianas (ULTEE, 1999).

Além dos efeitos antimicrobianos o carvacrol apresenta outros efeitos biológicos como: inibição da agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (SON et al., 2005), efeito anticarcinogênico (KARKABOUNAS et al., 2006, KOPARAL et al., 2003), efeitos analgésico, anti-inflamatório (WAGNER et al., 1986 e AYDIN et al., 1996) e antioxidante através do bloqueio da formação de produtos tóxicos a partir da ação de espécies reativas de nitrogênio (PRIETO et al., 2007, GUIMARÃES et al., 2010).

Ao nível vascular, dados também sugerem que o carvacrol pode atuar como agente anti-hipertensivo, desde que se observou efeito hipotensivo e bradicárdico em ratos normotensos anestesiados (AYDIN et al., 2007) e ação vasorelaxante em aorta de rato isolada (PEIXOTO-NEVES et al., 2009). O carvacrol também demonstrou efeito anti-plaquetário de forma mais potente que aspirina (SON et al., 2005).

Por todos os efeitos já descritos, bem como por sua baixa toxicidade e efeitos no SNC, o carvacrol possui um potencial emprego terapêutico (DE VINCENZI et al., 2004).

2.3 ATIVIDADES DO CARVACROL NO SISTEMA NERVOSO

Diversos estudos têm demonstrado a complexa interação exercida pelo carvacrol no sistema nervoso central. O carvacrol administrado por via oral, em camundongos machos, nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/kg demonstrou significativo aumento em todos os parâmetros observados no teste da cruz elevada (número de cruzamentos e percentagem de entrada, bem como tempo de permanência nos braços abertos), sem promover nenhum efeito na atividade locomotora no teste do campo aberto, demonstrando atividade ansiolítica similar ao diazepam (MELO et al., 2010). Este trabalho também sugeriu o envolvimento da via GABAérgica, uma vez que o flumazenil, clássico antagonista benzodiazepínico, reverteu o efeito do carvacrol e do diazepam neste mesmo modelo experimental (MELO et al., 2010). Foi demonstrado pelo mesmo grupo que a administração oral do CVC, nas mesmas concentrações do estudo anterior, diminui o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste do nado forçado e no teste de suspensão da cauda, e que este efeito não foi revertido através da depleção serotoninérgica com PCPA e pela prazosina e ioimbina. Contudo, o pré tratamento com SCH23390 (antagonista dopaminérgico D1) ou sulpirídeo (antagonista dopaminérgico D2) reverteu os efeitos observados, levando os autores a sugerirem que o CVC possui atividade antidepressiva através do envolvimento de vias dopaminérgicas (MELO et al., 2011).

Em outro trabalho sobre ansiedade utilizou-se um derivado do carvacrol, o acetato de carvacril, onde os autores demonstraram ação ansiolítica deste composto em camundongos submetidos ao labirinto da cruz elevada (LCE), ao teste da caixa claro/escuro e ao teste do enterrar esferas. Por este efeito ser revertido pelo uso do

antagonista flumazenil, os autores sugerem que sua ação se deu através do envolvimento de vias GABAérgicas (PIRES et al., 2013).

Canais TRPM7 são pertencentes à subfamília TRPM (família dos canais iônicos transitórios que não possuem resíduo de anquirina na porção N-terminal), e estão envolvidos na detecção de mudanças ambientais em resposta a uma variedade de estímulos, tais como temperatura, presença de compostos químicos e estímulos mecânicos. A atividade de canais TRPM7 foi previamente demonstrada através do aumento da liberação de transmissores colinérgicos em neurônios simpáticos (KRAPIVINSKY et al., 2006). Um estudo *in vitro* publicado no NIH (National Institute of Health) demonstrou que o carvacrol inibe os canais TRPM7 de células humanas embrionárias renais. Demonstrou-se também que o CVC é capaz de inibir a expressão epitélica de canais TRPM7 expressos em terminais sinápticos de neurônios hipocâmpais nas regiões CA1 e CA3 (PARNAS et al., 2009). Outro estudo mostrou que a recuperação neurológica (medida através de testes de reflexo, alerta, coordenação e habilidades motoras) após lesão traumática do cérebro em camundongos foi significativamente aumentada após administração periférica (i.p.) de CVC em dose única de 10mL/kg. Parece que sua ação se deu através da inibição de canais TRP, o que diminuiu os riscos de morte do SNC (PETERS et al., 2012). Este trabalho demonstrou, ainda, uma ação sinérgica entre o CVC e a eliminação de canais TRPC1 através do uso de camundongos *knockout* neste efeito neuroprotetor.

Outros estudos demonstraram efeito neuroprotetor do CVC em camundongos. Para se estudar este efeito em lesão de isquemia/reperfusão cerebral, pesquisadores administraram CVC (5, 25 e 50 mg/kg) em camundongos submetidos à oclusão da artéria cerebral mediana. Foi observada uma redução significativa do volume do infarto e uma melhora nos déficits neurológicos, 75 minutos após a isquemia, e 24 horas após a reperfusão nos animais tratados com CVC. Este trabalho demonstrou também uma redução dos níveis de caspase-3, um marcador de apoptose, sugerindo atividade anti-apoptótica do CVC (YU et al., 2012).

A neurotransmissão de monoaminas tem sido relacionada com a modulação de uma variedade de comportamentos como humor, ansiedade, cognição, regulação do sono e do apetite. Foi demonstrado recentemente que o extrato de orégano administrado intraperitonealmente nas concentrações de 3, 10 e 30 mg/kg inibiu a reabsorção e a

degradação de neurotransmissores monoaminérgicos de modo dose-dependente em ratos, e experimentos com microdiálise confirmaram um aumento dos níveis extracelulares de serotonina no cérebro (MECHAN et al., 2011). Este trabalho verificou atividade ansiolítica do extrato de orégano em camundongos através do aumento do tempo de permanência no espaço claro no teste da caixa claro-escuro (CCE) e da redução do enterramento de esferas no teste de esferas (TEE). Observou-se, ainda, significativa redução da imobilidade no teste do nado forçado (MECHAN et al., 2011). Os autores observaram que esses efeitos são exercidos pelo CVC, confirmando dados de estudos anteriores quanto ao potencial efeito ansiolítico e antidepressivo do carvacrol.

Ainda no campo cognitivo, foi observado que o CVC tem o potencial de atenuar déficits cognitivos associados à diabetes. Ratos diabéticos receberam tratamento com CVC durante 7 semanas (25, 50 e 100 mg/kg), e os resultados demonstram prevenção de modo dose-dependente de alterações moleculares ($IL1-\beta$, $TNF-\alpha$, $NF-\kappa B$), bioquímicas (caspase-3) e comportamentais (memória) associadas à diabetes. Esses achados sugerem que a ação do CVC é mediada pela regulação do estresse oxidativo, da inflamação e da cascata de apoptose no desenvolvimento de dano cognitivo causado pela diabetes (DENG et al., 2013).

Em um trabalho conduzido em ratos Wistar fêmeas observou-se que alta dose de CVC (450mg/kg) administrado por via oral reduz os níveis de 5-HT no córtex pré-frontal e no núcleo acúmbens durante o ciclo menstrual, levando ao efeito depressivo observado no teste do nado forçado durante a fase proestrogênica (TRABACE et al., 2011). Observou-se também significativa redução dos níveis plasmáticos de estradiol durante a fase proestrogênica, demonstrando modulação hormonal do CVC.

Um estudo recente mostra que a administração de CVC por 7 dias consecutivos (12,5 mg/kg) aumenta os níveis de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal e no hipocampo. Curiosamente, a administração de dose única (150 e 450 mg/kg) também promove aumento da concentração de dopamina no córtex pré-frontal, mas reduz os níveis dessa monoamina no hipocampo quando o animal é tratado com a dose mais alta. Redução dos níveis de serotonina também é observada no tratamento agudo em dose alta, e nenhuma alteração foi observada no teste do nado forçado em animais que receberam dose única (ZOTTI et al., 2013). Esses resultados indicam que a atividade

cerebral do carvacrol pode ocorrer de forma diferente de acordo com o tipo de tratamento utilizado.

2.4 MECANISMOS CENTRAIS DO CONTROLE DO BALANÇO DE LÍQUIDOS CORPORAIS

Alterações na osmolalidade do fluido extracelular (ECF) resultam em fluxo de água através das membranas celulares para restabelecer o equilíbrio osmótico entre o citoplasma e o ECF (STRANGE, 2004). Os mamíferos destacam-se por manterem um equilíbrio osmótico comum no ECF de aproximadamente $300 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (BOURQUE, 2008). Grandes alterações na osmolalidade do ECF podem resultar em sintomas neurológicos graves, devido aos efeitos da alteração das concentrações de eletrólitos na excitabilidade neuronal (SALY e ANDREW, 1993; PASANTES-MORALES e TUZ, 2006).

Muitos trabalhos têm correlacionado a patofisiologia das perturbações osmóticas de mamíferos com diversas manifestações clínicas. Aumentos de cerca de $10 \text{ mosmol kg}^{-1}$ na osmolalidade do plasma (hipernatremia) estão associados com aumento de dores de cabeça, nível de alerta reduzido e dificuldades de concentração (SHIRREFFS et al., 2004). Alterações maiores podem resultar em letargia, fraqueza, irritabilidade, confusão, coma e convulsões (SMELLIE et al., 2007; LIAMIS et al., 2008), e aumentos de até $80 \text{ mosmol kg}^{-1}$ podem culminar em convulsões e morte (WEBB et al., 1979; OFRAN et al., 2004; TURK et al., 2005). Os sintomas clínicos neurológicos da hiposmolalidade incluem dores de cabeça, náuse, vômitos, confusão mental, convulsões e morte (UPADHYAY et al., 2006).

O rim regula a reabsorção de sódio em mamíferos através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) estimulado por hiponatremia, hipovolemia e hipotensão. Ao contrário, durante hipernatremia, hipervolemia e hipertensão ocorre a redução da atividade de RAAS, com aumento concomitante de peptídeo natriurético atrial (ANP) e da ocitocina (OT), culminando no aumento da excreção renal de sódio (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). O hormônio natriurético atrial, produzido pelos cardiomiócitos, é liberado após distensão mecânica na parede interna do átrio direito provocado por expansão do volume sanguíneo (ANTUNES-RODRIGUES et al.,

2004). Tem sido sugerido que neurônios hipotalâmicos sensíveis ao ANP ativa neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON, que por sua vez liberam ocitocina na neurohipófise, o que estimularia a liberação de ANP pela neurohipófise (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004).

Os mecanismos de controle da ingestão de água e do apetite por sódio são importantes para a reposição das perdas urinárias e, por conseguinte, para o controle do balanço hidrossalino. A ingestão de água por indivíduos em situação de hiperosmolalidade do ECF leva a saciedade em minutos, mesmo antes da absorção de água corrigir os níveis de osmolalidade do ECF (EGAN et al., 2003). Esses efeitos são mediados em parte por osmorreceptores periféricos presentes na veia porta, mas também por receptores orofaríngeos e sensores de distensão gastrointestinais (STRICKER e HOFFMANN, 2007), monitorando de forma conjunta o impacto pré-sistêmico dos líquidos ingeridos. As informações dos receptores periféricos são transmitidas através do nervo vago para a área postrema (AP) e o núcleo do trato solitário (NTS) no tronco cerebral (NORGREN e SMITH, 1988). Ratos desidratados submetidos à remoção da AP por aspiração demonstram aumento do consumo de água após administração sistêmica de solução salina hipertônica quando comparados com animais com a AP intacta (CURTIS et al., 1996). Neste estudo, os animais agiram como se não tivessem “processado a mensagem” de que haviam consumido água. Outras evidências apontam para importante papel da AP/NTS na osmorregulação. Ratos com lesão nessas áreas não apenas consomem mais água quando desidratados, mas também apresentam menor secreção de VP e menores taxas de diurese e natriurese em resposta à infusão de salina hipertônica (ARIMA et al., 1998; CURTIS et al., 1999; HUANG et al., 2000). Adicionalmente, esses ratos continuam a ingerir salina hipertônica em altas doses, como se não recebessem os sinais iniciais da solução desidratante dos receptores hepáticos (STRICKER et al., 1997). Pelo fato de a AP ser um local desprovido de barreira hemato-encefálica, essa região detecta mudanças na composição dos líquidos corporais diretamente, além de receber informações dos receptores hepáticos e da orofaringe que estimulam o NTS e retransmitem informação para a AP (STRICKER e SVED, 2000).

Estudos com imagem funcional em humanos demonstram ativação do OVLT em indivíduos que foram submetidos à perfusão intravenosa de salina hipertônica (EGAN

et al., 2003), indicando que os osmorreceptores dessa região permanecem monitorando a osmolalidade do ECF sob tais condições. No mesmo trabalho, os autores identificaram a ativação de estruturas corticais após o início da percepção da sede, tal como o giro do cíngulo, sugerindo que esta área pode estar envolvida na percepção consciente e a saciedade da sede. Para alguns autores, a sede é estimulada quando projeções do OVLT ativam neurônios na área pré-óptica mediana (MnPO) (JOHNSON et al., 1996). Outros estudos de imagem em humanos mostram modificações da atividade em certas regiões do córtex cingulado anterior (ACC) e do córtex insular (INS) correlacionada com a progressiva intensificação da sede bem como da saciedade (MCKINLEY et al., 2006; FARREL et al., 2008). Tem sido proposto que a ativação de partes do INS pode estar envolvida na gênese de sensações de distúrbios homeostáticos específicas, como dor, fome e sede, enquanto que a ativação de partes específicas do ACC pode contribuir com a geração de respostas comportamentais motivadas orientadas de acordo com as alterações homeostáticas em questão (CRAIG, 2002; 2003a; 2003b). De acordo com essa proposta, a estimulação elétrica em partes do ACC resulta na busca por água em macacos, segundos após o estímulo (ROBINSON e MISHKIN, 1968). Adicionalmente, estudos em ratos demonstraram que o INS e o ACC recebem informação de diversos sistemas sensoriais, como sabor (HANAMORI et al., 1998), e estudos comportamentais implicam o INS na aversão ao sabor ao sódio (CUBERO et al., 1999). A marcação imunohistoquímica para FOS revelou ativação do INS em condições que estimulam a sede (PASTUSKOVAS et al., 2002; HOLLIS et al., 2008).

Núcleos hipotalâmicos estão envolvidos na manifestação da sede em ratos. A estimulação elétrica do hipotálamo lateral induz a sede em ratos (MOGENSON e STEVENSON, 1967), da mesma forma que a estimulação elétrica ou química do SFO (SMITH et al., 1995; XU e XINGHONG, 1999). Estudos com FOS têm demonstrado a ativação de várias estruturas hipotalâmicas em resposta a estímulos dipsogênicos, como o MPO, SON e PVN (GIOVANNELLI et al., 1992). Outro estudo demonstrou a ativação dessas mesmas estruturas em ratos submetidos à privação hídrica (PATRONAS et al., 1998). Adicionalmente, estruturas circunventriculares como SFO e OVLT também são ativadas frente a estímulos dipsogênicos (XU e HERBERT, 1994; PATRONAS et al., 1998).

Embora boa parte da rede neural envolvida no controle do comportamento da ingestão de sódio e água esteja em estruturas hipotalâmicas e algumas áreas do tronco encefálico, estruturas corticais também parecem estar envolvidas na consciência desses estados motivacionais. Em um estudo recente usando PET, pesquisadores encontraram diversas áreas corticais ativadas em indivíduos relatando sede após administração intravenosa de salina hipertônica (DENTON et al., 1999). Entre as regiões identificadas pelos autores estão áreas posteriores e anteriores do córtex cingulado, zonas associadas com processos afetivos e motivacionais (JOHNSON, 2007).

As informações advindas de osmorreceptores periféricos e centrais são transmitidas para diferentes partes do cérebro, onde são integradas com outras informações sensoriais como volemia, pressão sanguínea e temperatura corporal, e respostas osmorregulatórias são desencadeadas de modo a corrigir a homeostasia geral (JOHNSON, 2007). Pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais os sinais são integrados, entretanto, alguns estudos demonstram que pelo menos seis áreas estão envolvidas neste processo: NTS, MnPO, tálamo, núcleo parabraquial lateral (PBN), PVN e medula ventro-lateral (VLM). Informações que são acumuladas e processadas nessas áreas são transmitidas para locais efetores que geram as respostas osmorregulatórias apropriadas (BOURQUE, 2008).

Os osmorreceptores cerebrais que modulam a sede e a liberação de VP estão localizados em áreas do encéfalo desprovidas da barreira hemato-encefálica (MCKINLEY et al., 1978; THRASHER et al., 1980), como os órgãos circumventriculares (MCKINLEY et al., 2003). Microinjeções de solução hipertônica na região ântero-ventral do terceiro ventrículo provoca sede e liberação de VP (BUGGY et al., 1979), e lesões nessa região suprimem essas respostas fisiológicas durante hiperosmolalidade do ECF. Essa região abrange o órgão vasculoso da estria terminal (OVLT), o qual tem sido atribuído papel relevante na detecção de variações da osmolalidade do ECF (THRASHER et al., 1982). Estudos com MRI funcional têm demonstrado que esta região torna-se ativada durante o início da hipertonidade do ECF em animais (MORITA et al., 2004) e em humanos (EGAN et al., 2003; MCKINLEY et al., 2006). Estudos eletrofisiológicos confirmaram que há variações da descarga de potenciais de ação de neurônios do OVLT de acordo com alterações da osmolalidade (SAYER et al., 1984; CIURA e BOURQUE, 2006), efeito este revertido a

partir do bloqueio da transmissão sináptica (VIVAS et al., 1990). Todos esses achados sugerem que neurônios do OVLT parecem funcionar como osmorreceptores primários no encéfalo.

Os nervos cranianos VII, IX e X carregam informações gustativas e viscerais para o cérebro, realizando sinapses primárias com o NTS, que, por sua vez, retransmite suas projeções para outros núcleos neuronais. Similarmente, sinais detectados pelos órgãos circumventriculares também são conduzidos para outras estruturas no encéfalo. Muitas dessas regiões carreadoras e processadoras de sinais de quimio- e mecanorreceptores e dos órgãos circumventriculares têm sido definidas e caracterizadas através de técnicas anatômicas, neuroquímicas e funcionais. O resultado tem sido a identificação de uma rede neural que carrega e integra informação crítica para a regulação do balanço de fluidos (JOHNSON, 2007).

Tomando em conjunto todas essas informações, é importante ressaltar que o balanço dos líquidos corporais é determinado pela interação dos sistemas efetores comportamentais e fisiológicos. Mecanismos comportamentais estão envolvidos na ingestão de água e sódio, através da geração dos comportamentos motivados, enquanto que mediadores autonômicos e hormonais regulam a taxa de perda desses elementos no organismo (JOHNSON, 2007).

Apesar de ser um potente agente dipsogênico, a ANGII aumenta o apetite por sódio em diversas situações de distúrbio do balanço eletrolítico. Receptores AT1 localizados no prosencéfalo, especialmente nos órgãos circumventriculares, têm sido implicados na mediação deste comportamento de ingestão de água e sal. Adicionalmente, ANGII estimula a expressão de cFOS no OVLT e no SFO (FITZSIMONS, 1998), e a liberação de aldosterona age sinergicamente, aumentando a expressão de receptores de ANGII no SFO (FITZSIMONS 1998, DANIELS e FLUHARTY, 2004). O órgão subfornical (SFO) tem sido relacionado com a ingestão de água e sódio, assim como com a liberação da vasopressina induzidos por ANGII circulante (JOHNSON e THUNHORST, 1997; 2007). O sistema renina-angiotensina periférico e central podem atuar de maneira sinérgica no controle do balanço hidrossalino. A ANGII circulante atua em receptores dos órgãos circumventriculares, ativando as vias neurais que controlam a ingestão de água e sal. Interneurônios cerebrais liberam a angiotensina em seus terminais axônicos, que passa a atuar como um

neurotransmissor tradicional (JOHNSON, 1985; MORIMOTO, 1990, JOHNSON et al., 1999). Tem sido demonstrado que a administração periférica de aldosterona, juntamente com microinjeções cerebrais de ANGII, produz significativa ingestão de salina (WOLF, 1964). Essa interação facilitatória tem sido referida como “hipótese sinérgica para o apetite por sódio” (EPSTEIN, 1982).

A mediação central do apetite por sódio depende da integridade de estruturas como a parede ântero ventral do terceiro ventrículo (AV3V), SFO, OVLT, MnPO e estruturas hipotalâmicas (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; MCKINLEY e JOHNSON et al., 2004; WEISINGER et al., 2004). Para a integração central dos sinais excitatórios e inibitórios na determinação do apetite por sódio, circuitos neurais da lâmina terminal interagem com a amígdala, área septal dentre outras estruturas do tronco cerebral (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Receptores do tipo angiotensinérgico AT1 foram identificados nessas estruturas, e microinjeções i.c.v. de losartam (antagonista AT1) em ratos tem demonstrado diminuição na ingestão de sódio e água (MCKINLEY et al., 2003; SAAVEDRA, 2005). Evidência funcional da conversão de ANGI – ANGII no SFO foi obtida após injeção de captopril no ventrículo cerebral ou diretamente no SFO, abolindo o efeito dipsogênico de baixas doses dessa droga administrada periféricamente (THUNHORST et al., 1989). Desta forma, foi sugerido que o SFO contém um RAAS intrínseco, constituindo uma via de conexão entre o RAAS periférico e central na mediação do balanço hidroeletrólítico através da regulação do apetite por sódio (WEISINGER et al., 2004). Evidências experimentais demonstram que o SFO constitui o centro da regulação do apetite por sódio, onde sua concentração é monitorada por sensores de canais de Na⁺ (HIYAMA et al., 2004). Suas eferências dirigem-se principalmente para o MnPO e OVLT, além de realizar sinapses com neurônios magnocelulares do SON e PVN no hipotálamo (REIS, 2007).

Há projeções recíprocas entre as estruturas prosencefálicas envolvidas no controle hidroeletrólítico e os núcleos da rafe que produzem serotonina (TANAKA et al., 2001; CELADA et al. 2002). Neurônios sensíveis à ANGII no SFO projetam axônios para neurônios serotoninérgicos do DRN, o que sugere que esses neurônios do SFO monitoram os níveis de ANGII circulante e transmitem essa informação para o DRN (TANAKA et al., 1998). Verifica-se também que a hemorragia aumenta a atividade de neurônios 5-HT que projetam para o SFO (TANAKA et al., 2001), e que

microinjeções de ANGII diretamente no SFO reduz os níveis extracelulares de 5-HT e seus metabólitos (TANAKA et al., 2004). Outras áreas envolvidas no controle hidrossalino como MnPO, PVN, OVLT e SON também recebem projeções serotoninérgicas do DRN (AMITIZ, 2001; HOYER et al., 2002). Esses estudos reforçam a idéia de que estruturas mesencefálicas e prosencefálicas apresentam conexões recíprocas e coordenam as informações durante desafios homeostáticos para uma osmorregulação apropriada.

Estudos têm demonstrado que depleção dos níveis cerebrais de 5-HT através da administração sistêmica de pCPA (inibidor da síntese de 5-HT) bem como lesões do DRN aumenta a ingestão de salina hipertônica em animais normonatremicos e em animais depletados de sódio (OLIVARES et al., 2003; CAVALCANTI-LIMA et al., 2005). Administração aguda periférica de agonistas dos receptores 5-HT_{2C} (MK212 e mCPP) e de um inibidor de recaptação da serotonina (fluoxetina) reduziu seletivamente o consumo de salina hipertônica em ratos desidratados (NEILL e COOPER, 1989), enquanto que a administração de antagonista 5-HT_{2C} (metergolina) aumentou a ingestão de salina hipertônica em ratos previamente depletados de sódio ou não (ROUAHROSILIO et al., 1994). De modo similar, pequenas doses de agonistas 5-HT_{1A} 8-OH-DAP e gepirona aumentaram a ingestão de salina hipertônica em ratos reidratados, sem alterar a ingestão de água nesses animais (COOPER et al., 1988). Adicionalmente, tem sido evidenciado que a administração sistêmica do liberador de 5-HT fenfluramina, do inibidor seletivo de recaptação da serotonina fluoxetina, e de agonistas 5-HT_{2C} reduz a ingestão de salina hipertônica em ratos privados de alimento e água, bem como em ratos depletados de sódio (BADAUÊ-PASSOS et al., 2003). Além disso, a administração intracerebroventricular de agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT₃ inibem a ingestão de salina hipertônica em ratos depletados de sódio (CASTRO et al., 2003).

O complexo amigdalóide tem um papel fundamental na modulação do apetite por sódio e apresenta vários subtipos de receptores serotoninérgicos. As diferentes subdivisões do complexo amigdalóide podem ter papéis funcionais específicos no controle do apetite por sódio. Com base nestas informações, nosso laboratório realizou alguns estudos avaliando o papel dos receptores serotoninérgicos da amígdala medial (MeA) e da amígdala central (CeA), utilizando injeções nestas áreas específicas no controle do apetite por sódio. Verificou-se que a ativação dos receptores 5HT₃

(mCPBG) localizados na MeA e na CeA inibe a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon, revelando um sinergismo entre estas sub-regiões da amígdala na modulação do apetite por sódio. Por outro lado a administração de agonista dos receptores 5HT_{2B/2C} na MeA, bem como na CeA é incapaz de modificar a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon. Entretanto, o bloqueio destes receptores na MeA, por um antagonista específico o SDZ SER 082, reduz significativamente a ingestão de sal em animais nas mesmas condições, enquanto a administração deste antagonista na CeA não foi capaz de modificar a ingestão de sal em ratos sódio-depletados. Estes resultados nos levaram a concluir que a serotonina pode modular o apetite por sódio gerando uma resposta inibitória ao atuar em receptores 5HT₃, tanto na MeA, quanto na CeA. Ao contrário, a integridade dos receptores 5HT_{2B/2C} presentes na MeA é importante para a regulação do apetite por sódio (LUZ et al., 2006; 2007).

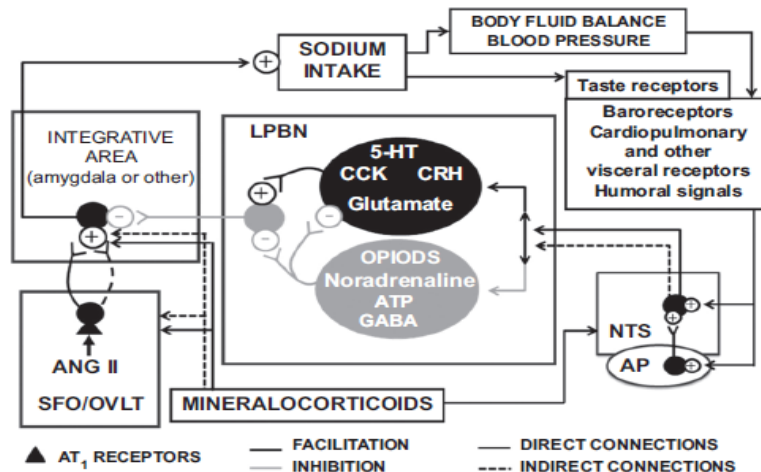
Alguns estudos têm demonstrado que a noradrenalina também está envolvida na regulação do apetite por sódio e na sede. Microinjeções i.c.v. ou no terceiro ventrículo de noradrenalina e agonistas dos receptores α 2-adrenérgicos (clonidina, UK14,304, guanabenzil e monoxidina) inibem o apetite por sódio em diversos modelos experimentais, como depleção de sódio, privação hídrica, administração de ANGII e mineralocorticóides (YADA et al., 1997; DE PAULA et al.; 1996, SATO et al., 1996; DE LUCA et al., 1997; SUGAWARA et al., 1999). Por outro lado, um estudo demonstrou que a noradrenalina interage com a angiotensina II para promover a ingestão de salina hipertônica (CHIARAVIGLIO, 1976). Um trabalho demonstrou que a sede estimulada por microinjeção de ANGII é inibida após administração de prazosina e ioimbina (antagonistas de receptores α 1- e α 2-adrenérgicos, respectivamente), efeito que é potencializado através do uso de clonidina (FERRARI et al., 1991). Em conjunto esses dados têm corroborado com a teoria de que a noradrenalina deve participar em dois circuitos que atuam de modo antagônico, um que inibe e outro que ativa esses comportamentos (DE LUCA et al., 1994).

Alguns circuitos cerebrais possuem papel inibitório na ingestão de sal, envolvendo regiões como a área postrema (AP), região medial do núcleo do trato solitário (mNTS) e a porção lateral do núcleo parabraquial (LPBN) (JOHNSON e THUNHORST, 1997; 2007). Ablação cirúrgica da AP/mNTS aumenta significativamente a ingestão de salina hipertônica em testes experimentais crônicos e

agudos (CONTRERAS e STETSON, 1981; EDWARDS et al., 1993). Um componente neural importante que se projeta a partir dessas áreas e tem como alvo o PBN contem serotonina (LANÇA e VAN DER KOOY, 1985). Microinjeções bilaterais de antagonistas serotoninérgicos no PBN aumentam a sede e o apetite por sódio em ratos (MENANI e JOHNSON, 1995; MENANI et al., 1996; 1998), demonstrando que esta via atua com um papel protetor à expansão do ECF. Em um trabalho de revisão recente, Menani sugeriu que a serotonina atua no LPBN inibindo o apetite por sódio induzido por ANGII (MENANI et al., 2014). Trabalhos anteriores demonstraram que a ativação dos receptores α 2-adrenérgicos no LPBN aumenta a ingestão de salina hipertônica em ratos (ANDRADE et al., 2004). Essas informações demonstram o papel funcional do LPBN, onde estão localizados mecanismos serotoninérgicos que inibem e adrenérgicos que promovem o apetite por sódio.

O LPBN envia projeções para diferentes regiões prosencefálicas que podem estar envolvidas na modulação do apetite por sódio. Os autores identificaram o aumento da expressão de FOS (AP, CeA, OVLT, BSTN, MnPO, NTS, SON, PVN e SFO) após a combinação de administração sistêmica de isoproterenol, agonista β -adrenérgico, e central de metilsergida, antagonista não seletivo de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ (DARVEN e MCKINLEY, 2010). Estes dados demonstraram que as vias adrenérgicas que estimulam a ingestão de sódio podem operar em diferentes regiões quando as vias serotoninérgicas do LPBN são bloqueadas.

Outros neurotransmissores presentes no LPBN como GABA, hormônio de liberação de corticotrofina (CRF), opióides, glutamato e norepinefrina no PBN podem participar do controle da ingestão de sódio e água (JOHNSON, 2007). Além de receber sinais aferentes de barorreceptores que passam pela via AP/NTS como anteriormente descrito, o LPBN recebe outros sinais viscerais importantes para o controle hidroeletrólítico na ingestão de fluidos, como sinais de receptores gustatórios e osmorreceptores periféricos (KOBASHI et al., 1993; NORGREN, 1995). Menani propôs um modelo esquemático mostrando a modulação dos mecanismos inibitórios do LPBN através de diferentes neurotransmissores, bem como a interação desta região com mecanismos facilitatórios envolvidos no controle da ingestão de sódio (MENANI et al., 2014):



Representação esquemática do papel do LPBN no apetite por sódio. Extraído de Menani et al., 2014.

2.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DO APETITE POR SÓDIO

Estudos clássicos sobre a deficiência de sódio em humanos foram conduzidos por McCance, que se tornou voluntário de suas próprias pesquisas juntamente com mais três indivíduos (McCANCE, 1936). A deficiência severa de sódio foi obtida através de dieta hipossódica e indução de suor intenso. Durante os 11 dias em estado depleto, os participantes reportaram fadiga excessiva, letargia, sensação generalizada de exaustão e perda de palatabilidade a alimentos. Os primeiros estudos experimentais referentes ao apetite por sódio demonstraram que adrenalectomia em ratos resulta em ingestão de volumes significativos de solução salina (RICHTER, 1936). A ausência do hormônio retentor de sódio (aldosterona) ocasiona ingestão compensatória deste íon para repor as perdas.

Em um estudo pioneiro, os pesquisadores demonstraram que animais deficientes de sódio consomem altas quantidades de solução salina, mesmo quando não possuem acesso prévio a esta solução (EPSTEIN e STELLAR, 1955), revelando que os comportamentos apetitivos associados com a aquisição de sódio são inatos. Contudo, outros experimentos destacaram que esse comportamento também é manifestado em animais depletados que tiveram experiência prévia com solução NaCl (FALK, 1966; SAKAI et al., 1987), e um desses trabalhos também demonstrou que o aumento da

ingestão desta solução também pode ocorrer através da administração de angiotensina (ANGII) e aldosterona (SAKAI et al., 1987).

Em um estudo recente, ratos adrenalectomizados aumentaram a ingestão de solução salina 0,3M após estes animais serem submetidos à privação de salina hipertônica por 12 horas (BYKOWSKI et al., 2007). Outro método comumente utilizado para a geração deste apetite específico é a injeção de ANGI. Diversos trabalhos mostram que injeção i.c.v de ANGI estimula a ingestão de água e sal. (MCKINLEY et al., 2003).

ANGII e mineralocorticóides podem agir simultaneamente na indução do apetite por sódio. Estudos têm mostrado que o tratamento com aldosterona promove um aumento do número de receptores AT1 (GEERLING e LOEWY, 2008), outros mostram que injeções periféricas do mineralocorticóide sintético acetato de deoxicorticosterona (DOCA) aumenta a ingestão de salina hipertônica induzida por ANGI (THORNTON et al., 2007). Animais tratados com baixas doses de mineralocorticóides e de ANGI promovem aumento do apetite por sódio (DANIELS e FLUHARTY, 2004 MORRIS et al., 2008). Como já descrito anteriormente, estes dados corroboram com a hipótese de que ANGI e mineralocorticóides podem agir sinergicamente. Segundo a hipótese da sinergia a ação conjunta destes hormônios potencializa a ingestão de solução salina hipertônica (GEERLING e LOEWY, 2008).

Os diuréticos de alça atuam predominantemente no segmento expesso da alça de Henle, onde um percentual considerável do sódio filtrado é reabsorvido neste local, o que leva a redução da reabsorção de água e sódio nos túbulos proximais. A furosemida é um potente diurético de alça, da classe dos sulfonamídicos. Embora a furosemida cause uma leve inibição da anidrase carbônica no túbulo proximal, o efeito diurético desta droga deve-se basicamente à inibição do transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ localizado na membrana celular luminal da porção expessa do ramo ascendente da alça de Henle. Os mecanismos pelo qual os diuréticos de alça bloqueiam este transportador ainda não foram esclarecidos, mas evidências sugerem que essas drogas se acoplam no local de ligação do cloro na molécula do transportador. A inibição deste transportador diminui o gradiente elétrico que favorece o transporte de Ca^{+2} ao nível da alça de Henle. Isso também explica o emprego dessa classe de drogas no tratamento da hipercalcemia. Fisiologicamente, a administração de furosemida resulta em diurese e natriurese,

reduzindo o volume líquido corporal e as taxas de sódio, estimulando o RAAS. A furosemida diminui a resistência vascular renal, e, conseqüentemente, aumenta o fluxo plasmático renal, efeitos que favorecem o aumento da filtração glomerular. Os diuréticos de alça aumentam de forma dose-dependente, a excreção de água, sódio, potássio, cloro, cálcio e magnésio, mas somente a furosemida aumenta a excreção urinária de fosfato e bicarbonato (SILVA, 2009).

A perda de sódio pela urina induzida pelo tratamento com furosemida leva ao aumento da produção e liberação de ANGII e a aldosterona, que são os principais indutores do apetite por sódio. Este modelo de depleção também aumenta a imunorreatividade a FOS no SFO, OVLT, MnPO, SON e PVN (THUNHORST et al., 1998), e estudos demonstraram aumento da expressão do RNAm para o receptor AT1 (CHARRON et al., 2002). Para potencializar este apetite, os animais são mantidos sob dieta hipossódica durante 24 horas após a aplicação de furosemida, mas com acesso à água destilada para recuperar a volemia, o que perpetua o estado de hiponatremia. Esta metodologia foi empregada no presente estudo para induzir o apetite por sódio, por ser notoriamente conhecida pela eficiência em induzir este comportamento e não comprometer o bem estar do animal. A dose de furosemida utilizada foi a mesma empregada em diversos estudos, bem como em estudos anteriores realizado no laboratório de Neurociências, onde a dose utilizada foi eficiente em promover a depleção de sódio e hiponatremia (CASTRO et al., 2003). Para garantir que o volume sanguíneo retorne aos níveis basais, o animal tem livre acesso à água destilada.

2.6 ANSIEDADE

A ansiedade e o medo geram emoções semelhantes, no entanto o medo constitui-se em emoção frente à ameaça definida por uma fonte de perigo potencial, enquanto a ansiedade é a antecipação a uma ameaça real ou imaginária. A ansiedade pode manifestar-se em diferentes níveis. Do ponto de vista clínico, a sensação mais característica é de “estrangulamento” ou “constricção”. Essa sensação se traduz como motivação negativa, inibindo sistemas motivacionais, como apetite, libido e dor. No plano da cognição, a ansiedade manifesta-se através da antecipação de acontecimentos potencialmente perigosos, interferindo na capacidade de concentração, nos níveis de

vigilância e no desempenho de tarefas intelectuais. Entre as manifestações fisiológicas ao medo e à ansiedade está a ativação do sistema nervoso simpático, produzindo aumento da frequência cardíaca, tremores, sudorese, hiperventilação e mobilização de glicose. A divisão parasimpática também pode estar ativada, determinando hipersecreção gástrica, aumento da motilidade intestinal e urgência para defecação e micção (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012).

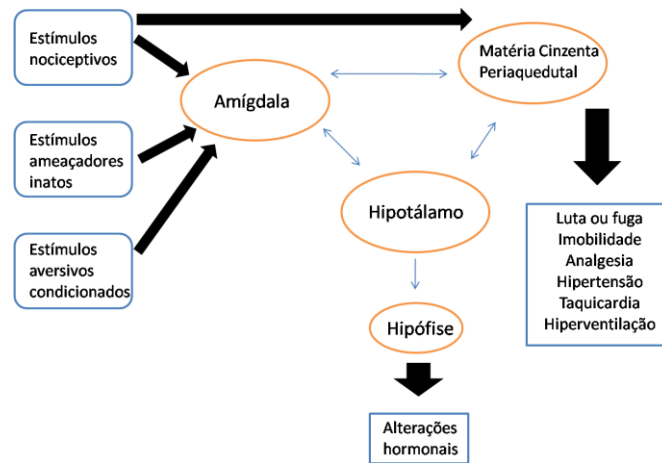
Assim como o medo, a ansiedade possui forte valor adaptativo, pois permite que o indivíduo antecipe um dano físico ou psicológico, e tem sido sugerido que a ansiedade pode contribuir para uma maior eficiência no desempenho de tarefas intelectuais, mas que em níveis altos seria prejudicial. Em um trabalho clássico da neurofisiologia, Yerkes & Dodson (1908) estudando condicionamento em camundongos desenvolveram o conceito de estado de vigilância do animal, que pode explicar a relação entre os níveis de ansiedade e a atividade intelectual (YERKES e DODSON, 1908). Os autores observaram que com o aumento da ansiedade, o desempenho intelectual atinge um pico e depois regride. Em outras palavras, a representação gráfica da relação entre desempenho e ansiedade seria um “u” invertido (PRICE, 2003). É a partir do ponto de regressão do desempenho que a ansiedade pode atingir níveis patológicos, gerando transtornos psiquiátricos que se tornam objeto de tratamentos psicológicos e farmacológicos (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012).

O desenvolvimento de métodos clássicos na neurofisiologia (ablação de áreas cerebrais, estimulação elétrica, estimulação química), do desenvolvimento de novas ferramentas moleculares (imunoreatividade à proteína FOS) e de outros métodos menos invasivos como tomografia de emissão de pósitrons, tomografia de emissão de fótons singulares e ressonância magnética nuclear funcional permitiu uma melhor contribuição sobre os substratos neurais da ansiedade (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012). Do ponto de vista evolutivo, pode-se supor que as emoções decorrentes do medo/ansiedade se manifestem como expressões e comportamentos característicos para determinadas situações, podendo estar associados a estratégias de defesa dos animais a perigos que encontram em seu nicho ecológico. A observação dos comportamentos adotados por ratos quando confrontados com predadores levou a caracterização de diferentes estratégias defensivas. Verificou-se que ratos expostos a essa situação adotam comportamentos que visam obter informação sobre o perigo, que remetem a uma

avaliação de risco antes de retornarem ao espaço ocupado por predadores (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012). Assim, ambientes novos gera um conflito entre a motivação de explorar o ambiente e o receio de perigo eminente. Um trabalho muito citado conduzido no Laboratório de Neurologia da Universidade do Havaí pelo grupo de pesquisa de Blanchard (1990) estudou estratégias defensivas adotadas por ratos em situações de conflito com predador. Os autores observaram que ratos exibem comportamento de congelamento à aproximação de um predador, caso este esteja dentro de uma distância crítica; se a aproximação do predador aumenta, o rato realiza fuga na direção oposta, refugiando-se em abrigos quando disponíveis ou nos cantos da gaiola (tigmotaxia). A aproximação ou mesmo o contato com o predador pode também culminar em comportamentos extremos como ameaça e ataque. Os autores concluíram que cada estratégia de defesa corresponde a um tipo específico de emoção: ansiedade, medo e pânico, cujo substrato neural é específico para cada caso (BLANCHARD et al., 1990a).

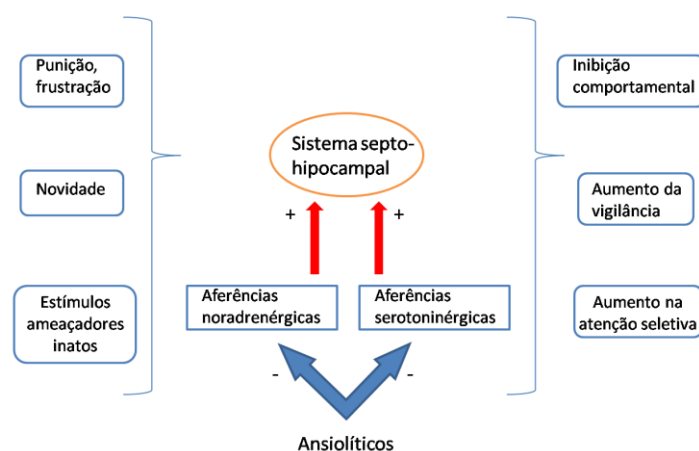
Uma investigação demonstrou ser possível promover comportamentos de fuga ou de agressão defensiva através da estimulação de sítios específicos no hipotálamo medial (SHEARD e FLYNN, 1967), o que poderia representar uma relação entre esses comportamentos com a ansiedade. Contudo, alguns autores refutam a idéia de que comportamentos de luta/fuga seria consequência de um estado emocional equivalente à ansiedade (GRAY, 2000), desde que comportamentos de luta/fuga precisam ser distinguidos de outros comportamentos defensivos, uma vez que não são alterados por drogas ansiolíticas (BLANCHARD, 1997).

A ansiedade, por se tratar de um tipo de emoção, possui o envolvimento de diversas estruturas que fazem parte do sistema límbico. O circuito cerebral envolvido no “sistema de defesa” foi baseado nos trabalhos de Walter R. Hess, iniciados na década de 50 na Suíça (HESS et al., 1951). Seus estudos mostraram que a estimulação elétrica do hipotálamo do gato faz com que o animal assumira uma reação defensiva comparável com a reação de confronto com predador. O uso da estimulação elétrica, bem como de microinjeções em diferentes áreas tem delimitado as regiões cerebrais que provocam as reações de defesa. O diagrama abaixo sintetiza tal sistema.



Representação esquemática do sistema cerebral de defesa (SCD). Adaptado de Graeff e Guimarães, Fundamentos da Psicofarmacologia, Ed. Atheneu, 2012.

O “sistema de inibição comportamental” foi desenvolvido por Gray (1976) a partir do estudo sobre o efeito de ansiolíticos no comportamento em modelos experimentais (GRAY, 1976). Este modelo se refere a padrões comportamentais que envolvem o ato de evitar e fugir ou ao medo associado àquilo que não é familiar ao indivíduo. Estudando o efeito de lesões do septo/hipocampo em ratos, observou-se alterações comportamentais em testes de aprendizagem, similares ao observado com a administração de ansiolíticos benzodiazepínicos, o que o levou a concluir que o sistema septo-hipocampal pode ser o componente principal do sistema de inibição comportamental. De acordo com esse sistema, aferências noradrenérgicas e serotoninérgicas provenientes do mesencéfalo facilitam o seu funcionamento, e drogas ansiolíticas reduzem a ação facilitatória das vias monoaminérgicas (GRAY, 1976; 2000), como diagramado a seguir.



Representação esquemática do sistema de inibição comportamental. Adaptação de Graeff e Guimarães, Fundamentos da Psicofarmacologia, Ed. Atheneu, 2012.

Análises neurais mais detalhadas culminaram no desenvolvimento de um sistema cerebral hierárquico de defesa. De acordo com esse sistema, o nível mais basal, a matéria cinzenta periaquedutal, coordena a fuga não direcionada; o hipotálamo medial coordena o escape direcionado; a amígdala está envolvida com o comportamento de evitar o perigo; e o giro do cíngulo anterior coordena atividades mais complexas de evitar riscos (GRAEFF, 1994). Em uma publicação recente, Gray aponta múltiplas áreas que podem estar envolvidas em comportamentos defensivos e em seus desdobramentos emocionais, entre elas estão: a matéria cinzenta periaquedutal, o hipotálamo, a amígdala, o sistema septo-hipocampal e o córtice cingulado e frontal. Uma vez que o encéfalo é um sistema integrado, é possível que as regiões apontadas devam interagir para o controle do comportamento defensivo e, possivelmente, com a ansiedade em particular (GRAY, 2000).

Estudos farmacológicos em animais experimentais têm relatado que o sistema serotoninérgico está fortemente implicado na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade, medo condicionado e respostas ao estresse (GRAEFF et al., 1996; GRAEFF 2002; LOWRY et al., 2005).

Os transtornos de ansiedade podem ser classificados em vários grupos de acordo com suas manifestações clínicas. Ataques de pânico, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático e ansiedade generalizada estão entre as mais comuns manifestações (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012). Uma série de evidências clínicas e de experimentação animal tem sugerido um papel crucial de vias serotoninérgicas na neurobiologia de transtornos de ansiedade. A serotonina é um importante modulador dos circuitos relacionados com a ansiedade, mas sua ação em respostas fisiológicas e comportamentais ainda não está totalmente esclarecida (LOWRY et al., 2005). Duas hipóteses complementares têm sido formuladas para descrever o papel da serotonina na geração de comportamentos ansiogênicos: a primeira pressupõe que há excesso ou hipersensibilidade à serotonina e a segunda pressupõe que ocorre déficit ou hipoatividade serotoninérgica (DEAKIN e GRAEFF, 1991; BELL e NUTT, 1998).

A base neurofisiológica que tem sido implicada nos ataques de pânico é a da sensibilidade anormal de mecanismos cerebrais nas respostas relacionadas ao medo e ao estado de alerta, que envolve múltiplas vias neurais incluindo 5-HT, norepinefrina,

GABA dentre outras (GORMAN et al., 2000). Esse estudo demonstrou que os ataques se originam a partir da disfunção de estruturas relacionadas com o circuito do medo. Para além de aferências de estruturas do sistema límbico, o hipocampo dorsal (DH) e a área septal recebem projeções principalmente do núcleo da rafe medial (MRN), enquanto que tálamo (THA), matéria cinzenta periaquedutal (PAG), amígdala (AMY), e hipocampo ventromedial (VMH) recebem suas projeções do núcleo da rafe dorsal (DRN). Os córtices parietal e temporal recebem aferências serotoninérgicas do DRN, enquanto os córtex cingulado e entorrinal possuem aferências advindas do MRN (GRAEFF, 1997).

Uma rede cerebral envolvendo o córtex pré frontal, o núcleo estriado, o tálamo e a amígdala, todos recebendo densa projeção serotoninérgica, tem sido implicada na neurobiologia de fobias sociais (VAN DER WEE et al., 2008). Estudos com neuroimagem demonstraram hipoatividade do córtex orbitofrontal em pacientes com fobia social durante discursos públicos, demonstrando envolvimento de áreas corticais (TILLFORS et al., 2001; LORBERBAUM et al., 2004). Também tem sido proposto que o circuito amígdala-estriado tem papel de filtragem de informação relevante para avaliação social. A redução dos níveis de 5-HT disponíveis neste circuito deve ter um papel central para o desenvolvimento de fobias sociais (LI et al., 2001).

O estímulo da região dorsal da matéria periaquedutal tem sido implicado na expressão de comportamentos defensivos e na elaboração de estados emocionais como medo e ansiedade (GRAEFF et al., 1993). Como consequência a PAG possui um papel chave nos circuitos que envolvem a coordenação de respostas defensivas e aversivas ao estresse (MILLAN, 2003), e alguns estudos têm demonstrado que o aumento dos níveis de serotonina na PAG resultam em comportamento anti-aversivo (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2002; LOVICK et al., 2000). Através do uso de antagonistas e agonistas específicos, sugeriu-se que a via glutamatérgica do hipotálamo-PAG dorsal estaria sob a influência da atividade serotoninérgica dos neurônios dos núcleos da rafe que se projetam para a PAG dorsal (MORAES et al., 2008).

O papel do núcleo da rafe medial (MRN) na ansiedade tem sido extensivamente estudado. As suas projeções para o hipocampo dorsal (DH) originadas do MRN parecem ter papel importante para a ansiedade. A inativação do MRN por lesões químicas e elétricas ou o uso de agonistas 5-HT_{1A} diminui os níveis de ansiedade em

ratos submetidos a diferentes testes de ansiedade, como no labirinto em cruz elevada, caixa claro-escuro, teste de interação social e de condicionamento contextual. Ao contrário, foi constatado ainda que a estimulação do MRN aumentam os níveis de ansiedade (ANDRADE et al., 2013). Essas observações são de grande importância, uma vez que a via MRN-DH é central na hipótese de que o “sistema de inibição comportamental” representado pelo eixo septo-hipocampo é um substrato neural chave para a ansiedade (GRAY, 2000).

Estudos com condicionamento ao medo demonstram que a BLA integra informações processadas do ambiente codificando pistas relevantes (LEDOUX, 2000). Tem sido observado que a BLA possui neurônios que respondem seletivamente a pistas que predizem ou não situações de perigo (AMANO et al., 2011; SENN et al., 2014). A ativação optogenética de toda a BLA aumenta a ansiedade em ratos, enquanto que a ativação seletiva de neurônios que se projetam da BLA para a CeA reduz a ansiedade (TYE et al., 2011). A ativação seletiva de receptores 5-HT_{2C} na BLA aumenta comportamentos relacionados ao medo (CAMPBELL e MERCHANT, 2003; GREENWOOD et al., 2012). Esses dados sugerem que a classificação de uma subregião da amígdala como ansiogênica ou ansiolítica é uma generalização imprecisa, uma vez que diferentes células de uma mesma região podem possuir diferentes funções de acordo com os alvos pós sinápticos (TYE et al., 2011).

A CeA também está envolvida com a ansiedade. Um estudo com condicionamento ao medo demonstrou que a inativação desta região reduz o comportamento de congelamento em ratos em situação que prediz choque, sugerindo que esta região possui papel crucial na mediação de comportamentos após estímulos ameaçadores (CIOCCHI et al., 2010). Adicionalmente, estudos revelaram que a lesão ou inativação farmacológica da CeA resulta na redução da aversão a espaços abertos (MOLLER et al., 1997; MOREIRA et al., 2007). Tem sido proposto que esses efeitos podem ser mediados por projeções que se originam na região centromedial da CeA e atingem núcleos hipotalâmicos que modulam aspectos relacionados a estados de ansiedade (ADHIKARI, 2014).

Tem sido demonstrado que a via serotoninérgica age através de diferentes tipos de receptores na CeA para modular a ansiedade. A ativação de receptores serotoninérgicos tem sido relacionada com o aumento da ansiedade e de

comportamentos relacionados ao medo, uma vez que o aumento de serotonina na CeA aumenta comportamento de congelamento em ratos (FOSTER et al., 2006). Adicionalmente, outro trabalho sugere que a ansiogênese estaria relacionada com a ativação de receptores 5-HT_{2C} na CeA, enquanto que a ativação de receptores 5-HT_{1A} neste mesmo núcleo está associada com a redução de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos (LI et al., 2012). Alguns pesquisadores sugerem que os neurônios serotoninérgicos da CeA são modulados pela via CRF através de receptores CRF₁ e CRF₂ (FOX e LOWRY, 2013).

Embora o papel da BLA em mecanismos envolvendo o medo e a ansiedade tenha sido amplamente demonstrada, alguns autores sugerem que outras estruturas da amígdala estendida, como o núcleo da estria terminal (BNST), também possuem importante papel na regulação destes mecanismos (GRILLON 2008, HAMMACK et al., 2009; DAVIS et al., 2010). Os pesquisadores têm atribuído ao BNST o papel de central de retransmissão de informações entre áreas límbicas superiores e o núcleo paraventricular (PVN) no hipotálamo, assumindo função moduladora das respostas ao estresse e dos comportamentos relacionados à ansiedade (HERMAN et al., 2005; CHOI et al., 2007). As pesquisas experimentais têm sugerido resultados conflitantes sobre o papel do BNST na ansiedade. Em um estudo foi demonstrado que lesões no BNST não alteram a aversão de ratos aos braços abertos no teste do LCE (TREIT et al., 1998). Entretanto, também já foi observado que lesões neste núcleo promovem efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevada (DUVARCI et al., 2009). Adicionalmente, estudos sugerem que estimulação elétrica do BNST não altera o comportamento dos ratos no LCE (VAN DIJK et al., 2013), mas o uso de antagonistas glutamatérgicos tem resultado em efeito ansiolítico no paradigma de sobressalto potenciado (WALKER e DAVIS, 1997). Estudos têm sugerido que os receptores serotoninérgicos no BNST exercem papel importante em comportamentos emocionais, uma vez que a ativação do receptor 5-HT₁ está relacionada com redução da ansiedade, enquanto que a ativação dos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₇ promovem ansiogênese (LEVITA et al., 2004; GUO et al., 2009; HAMMACK et al., 2009).

Pesquisadores também têm buscado bases genéticas que possam correlacionar vias serotoninérgicas com ansiedade. Em 1996, um estudo reportou um grande número de polimorfismo na região de controle da transcrição do gene SLC6A4 (5-HTT)

(LESCH et al., 1996), e um estudo demonstrou que indivíduos que possuem a versão curta deste alelo possuem risco elevado para distúrbios de ansiedade e depressão (HOLMES, 2008). Também está documentado que portadores do alelo curto deste gene possuem maior atividade neuronal da amígdala a estímulos relacionados ao medo (HARIRI et al., 2002).

Tem sido proposto que o sistema serotoninérgico interage com a via CRF de forma organizada, e que de acordo com o tipo de receptor e as estruturas límbicas envolvidas, esta interação poderia modular comportamentos emocionais (FOX e LOWRY, 2013). A maior fonte de neurônios secretores de CRF no cérebro está no PVN (SAKANAKA et al., 1987), sendo células primárias no controle do eixo HPA. Contudo, diversas estruturas límbicas e corticais envolvidas no controle de comportamentos emocionais, tais como a CeA e BNST também possuem neurônios CRF que se projetam para outras áreas também envolvidas neste controle (GRAY, 1993; WANG et al., 2011), tais como a PAG e o DRN (VAN PETT et al., 2000). Experimentos demonstraram que estímulos ansiogênicos aumentam a ativação de neurônios serotoninérgicos no DRN (BOUKNECHT et al., 2007; HALE et al., 2008), o que levou pesquisadores a sugerirem que a via BNST-DRN pode modular comportamentos de ansiedade através de receptores do tipo CRF₂ (FOX e LOWRY, 2013). Também foi documentado que pessoas com lesões bilaterais na amígdala são incapazes de evitarem ataques de pânico induzidos por inalação de CO₂ (GOETZ et al., 2001), levando pesquisadores a sugerirem que a ativação da CeA possui papel inibitório em ataques de pânico através do controle exercido por neurônios CRF sob neurônios serotoninérgicos da via DRVL/VLPAG (FOX e LOWRY, 2013).

O núcleo paraventricular talâmico (PVATHAL) possui diversas conexões com estruturas envolvidas no processamento e na modulação de comportamentos emocionais, tais como a CeA, BLA, BNST, NAc, DMH, SCH e PAG (SHIN et al., 2008; VERTES e HUVES, 2008; LI e KIROUAC, 2012). Este amplo número de conexões estabelece o PVATHAL como um núcleo submetido à modulação de grande número de neurotransmissores, como dopamina, noradrenalina, CRH, orexinas e opióides endógenos (OTAKE e NAKAMURA, 1995, UROZ et al., 2004, KIROUAC et al., 2005; VERTES et al., 2010). Por estas razões, pesquisadores têm sugerido que o

PVATHAL deve ter papel relevante em vias neurais de transtornos emocionais, como ansiedade, depressão e estresse (HSU et al., 2014).

O sistema noradrenergico tem papel relevante na atenção, sono/vigília, aprendizagem, memória, reprodução e estresse (BERRIDGE e WATERHOUSE, 2003; SARA, 2009). Esse sistema também tem sido implicado em transtornos afetivos (CHARNEY, 2003), o que tem sido evidenciado a partir do conhecimento da ação farmacológica de drogas psicoterapêuticas, como antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de noradrenalina (BALDESSARINI, 2006). Estudos em modelos experimentais têm demonstrado que as vias noradrenérgicas centrais através de suas projeções do *loco ceruleo* e da área tegmental lateral para o córtex e sistema límbico estão envolvidas na resposta ao estresse e em modelos de transtornos de ansiedade (BREMNER et al., 1996), sobretudo em ataques de pânico ou estresse pós traumático, uma vez que a clonidina, agonista α_2 -adrenérgico, melhora os sintomas de pacientes, enquanto que o uso do antagonista deste receptor, ioimbina, aumentam os níveis de ansiedade (CHARNEY, 2003). É importante frisar que os receptores α_2 -adrenérgicos são autoreceptores distribuídos na membrana pré-sináptica, e sua ativação reduz os níveis intracelulares de cAMP e Ca^{+2} , inibindo a liberação do neurotransmissor, conseqüentemente reduzindo sua disponibilidade na fenda sináptica (CARVALHO e BOCKSTAELE, 2012).

O *loco ceruleo* (LC) é o principal núcleo noradrenérgico no SNC, e alguns estudos têm sido conduzidos para elucidar o papel deste núcleo no contexto do medo e da ansiedade, mas ainda não está claro se possui um papel indispensável no circuito emocional (ITOI e SUGIMOTO, 2010). Resultados obtidos através da ablação do LC têm demonstrado aumento na neofobia (HARRO et al., 1995), o que é um fator de grande relevância em testes de conflito como o da cruz elevada. Outro estudo demonstrou que a ablação parcial do LC resulta em efeito ansiolítico no teste LCE em ratos previamente agrupados, mas o mesmo fenômeno não foi observado em ratos que permaneceram isolados antes do teste, o que levou os autores a concluir que aspectos ambientais podem ter influenciado o efeito da depleção noradrenérgica (LAPIZ et al., 2001).

2.7 O LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA COMO MODELO PARA O ESTUDO DA ANSIEDADE

Uma grande variedade de modelos experimentais tem sido empregado no esforço de se avaliar comportamentos ansiogênicos ou ansiolíticos em roedores. Entre os testes mais comuns estão a caixa claro-escuro, o enterramento de esferas, o labirinto em cruz elevada, o labirinto elevado em “T” e a observação de alguns parâmetros do campo aberto. Alguns destes procedimentos são baseados na aversão inata de roedores a espaços abertos e iluminados e no comportamento exploratório natural em resposta a novos ambientes (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). Estes testes geram uma situação de conflito nos roedores entre o comportamento exploratório e a tendência inicial de se evitar um ambiente não familiar (neofobia) (BOURIN e HASCOUET, 2003), e são classificados como testes de conflito não-condicionados, uma vez que aferem dados a partir do comportamento natural dos animais, sem exigir treinamento, privação alimentar ou dor antes da execução do teste (GRAEFF e GUMARÃES, 2012).

As bases biológicas desses testes foram primeiramente investigadas por Montgomery através de experimentos que reproduziram a situação de conflito entre aproximação/afastamento de um estímulo novo (MONTGOMERY, 1955). O labirinto em cruz elevada foi desenvolvido a partir de modificações desses experimentos pioneiros (HANDLEY e MITHANI, 1984), e validado posteriormente (PELLOW, 1985). Desde então, o teste EPM tem se tornado o modelo experimental mais popular no estudo da ansiedade, bem como para se avaliar a ação farmacológica de drogas que modulam esse estado emocional (HANDLEY e MITHANI, 1984; ROGÓZ, 2004; FEDOTOVA et al., 2004; MOGHADDAM et al., 2013). De fato, drogas clássicas usadas comercialmente para reduzir os sintomas de ansiedade, como o diazepam, são largamente empregadas como controles positivos em testes experimentais que buscam novos compostos com propriedades ansiolíticas.

O aparato consiste em um labirinto elevado do chão (40-75 cm), em formato de cruz, com dois braços abertos e dois braços fechados de modo alternada, conectados por uma área central que permite o acesso aos quatro braços de forma igual. Os braços abertos possuem bordas elevadas que podem variar entre 0,5 e 2 cm, prevenindo a queda dos animais, e os braços fechados são cercados por paredes de 40 cm de altura e sem teto. Durante o procedimento, os animais são posicionados no centro do labirinto,

com o focinho voltado para um dos braços fechados, e analisados por um observador ou gravados em câmera de vídeo por 5 minutos. O aumento do número de entradas nos braços abertos, da percentagem de entrada nos braços abertos (número de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas) e do tempo gasto nos braços abertos é tomado como indicador de comportamento ansiolítico (HANDLEY e MITHANI, 1984).

Apesar da aparente simplicidade do teste LCE, tem sido reportado um grande número de estudos demonstrando que uma quantidade significativa de fatores, antes e durante os experimentos, pode influenciar o comportamento dos ratos, alterando a aversão natural aos braços abertos (MARTÍNEZ, 2002). Johnston reportou diferença no tempo de permanência nos braços abertos entre machos e fêmeas (JOHNSTON e FILE, 1990), resultado confirmado posteriormente em outro estudo que demonstrou diferenças significativas de acordo com o sexo e a idade dos ratos (IMHOF et al., 1993). Outros achados ilustram a variedade de fatores que influenciam os resultados obtidos no teste LCE, como o número de exposições ao teste (FILE, 1992; TREIT, 1993; GRIEBEL, 1993), período do dia em que os animais são testados (GRIEBEL, 1993), tipo de transporte dos animais à sala teste (MORATO e BRANDAO, 1996), a altura da borda dos braços abertos (TREIT, 1993; FERNANDEZ e FILE, 1996; MARTINEZ, 2002), a presença ou ausência de interação social antes do teste (MAIOSONNETTE et al., 1993; CUENYA, 2012), o tipo de material usado para a confecção do aparato (MORATO e CASTRECHINI, 1989) e os níveis de iluminação durante o teste (MORATO e CASTRECHINI, 1989; GRIEBEL et al., 1993; BECKER e GRECKSCH, 1996; CARDENAS et al., 2001; GARCIA et al., 2005).

Existem divergências quanto à aferição de fatores etológicos para a validação de drogas e seus efeitos ansiolíticos e ansiogênicos. Blanchard & Blanchard conduziram uma série de experimentos sobre o repertório de comportamentos de avaliação de risco em roedores (BLANCHARD et al., 1989; 1990a; 1990b). Apesar da relação entre medo e ansiedade, uma variedade de comportamentos associados ao medo ou à análise de risco, como o ato de esticar-se do animal (*stretching*), a limpeza das vibrisas (*grooming*), erguer-se sobre as patas traseiras (*rearing*), a projeção da cabeça para o lado de fora dos braços abertos (*head dipping*), o retorno para o braço fechado (*closed arm return*), o ato de farejar (*sniffing*) dentre outros, têm sido utilizados (pelo menos

uma das variáveis) em apenas um a cada quatro trabalhos publicados em estudos de ansiedade através do teste LCE (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). A adição de vários comportamentos durante a análise experimental tem revelado resultados ambíguos (WALL e MESSIER, 2001), demonstrando que ainda existem poucas evidências que suportem a inclusão dessas variáveis comportamentais nas análises em adição à aferição espaço-temporal que analisa o deslocamento e o tempo de permanência do animal nos diferentes braços do LCE.

A ligação entre o teste LCE e respostas defensivas têm sido relatado através do uso de abordagens imunohistoquímicas. Marcadores de atividade neuronal (cFOS, MORGAN e CURRAN, 1991) tem permitido a associação dos comportamentos defensivos com seus substratos neurais. Áreas como a amígdala, a formação hipocampal, área hipotalâmica medial e a matéria cinzenta periaquedutal estão todas relacionadas com comportamentos defensivos, e demonstram aumento da expressão da proteína FOS após exposição ao teste LCE (SILVEIRA et al., 1993), a um predador (CANTERAS e GOTO, 1999), ao odor de um predador (DIELENBERG et al., 2001), a sons ultrassônicos aversivos (BECKETT et al., 1997) e após a administração sistêmica de drogas ansiogênicas (SINGLEWALD e SHARP, 2000).

Apesar de terem sido realizados estudos experimentais de ansiedade com carvacrol, nenhum desses trabalhos foi realizado em ratos ou através de microinjeções do composto no ventrículo cerebral. No presente estudo, verificamos o efeito de microinjeções de CVC no VLE de ratos Wistar no teste do labirinto em cruz elevada (LCE).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de microinjeções de carvacrol (CVC) no ventrículo lateral esquerdo (VLE) no apetite por sódio, na sede, na ansiedade e na atividade locomotora de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da administração i.c.v. de CVC nas concentrações de 25, 50, 75, 150 e 300 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ no apetite por sódio em ratos depletados deste íon;
- Investigar o efeito da administração i.c.v. de CVC na concentração de 300 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ na ingestão de água em ratos submetidos à privação hídrica;
- Investigar envolvimento das vias serotoninérgicas no efeito do CVC no apetite por sódio através da administração i.c.v. de PCPA na concentração de 200 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$;
- Investigar envolvimento da via adrenérgica $\alpha 1$ no efeito do CVC no apetite por sódio através da administração i.c.v. de prazosim nas concentrações de 40, 80 e 160 $\text{nmol}/2\mu\text{L}$;
- Investigar o efeito imediato (5 minutos após microinjeção) e tardio (30 minutos após microinjeção) da administração i.c.v. de CVC nas concentrações de 150, 300 e 600 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ na ansiedade através do teste LCE;
- Investigar o efeito da administração i.c.v. de CVC nas concentrações de 150, 300 e 600 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ na atividade locomotora de ratos através do teste CA;
- Mapear a expressão cerebral imediata (5 minutos após microinjeção) e tardia (30 minutos após microinjeção) da proteína FOS após administração i.c.v. de CVC.

3.3 HIPÓTESES

- **Hipótese nula (H_0):** O CVC administrado i.c.v. **não altera** a regulação central do apetite por sódio, da sede, da ansiedade e da atividade locomotora de ratos.
- **Hipótese teste (H_1):** O CVC administrado i.c.v. **altera** a regulação central do apetite por sódio, da sede, da ansiedade ou da atividade locomotora de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

No presente estudo, foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 230 a 270 gramas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de 22 ± 2 °C e luz controlada com período de claro/escuro de 12 horas (luz das 07h às 19h) com ração (Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba, Brasil), água destilada *ad libitum*. Para os testes de apetite por sódio, os animais também receberam salina hipertônica (1,5%) *ad libitum*. O número de animais utilizados nos experimentos foi previamente calculado e os protocolos experimentais estão de acordo com as recomendações e foram executados de acordo o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996, <http://www.nap.edu>; <http://grants.nih.gov>) em consonância com a legislação brasileira pertinente (lei número 11.794 de 9 de outubro de 2008) bem como estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICS-UFBA, e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICS-UFBA) (ANEXO 1).

4.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (80mg/kg) via intraperitoneal e submetidos à canulação estereotáxica do ventrículo lateral esquerdo (VLE), utilizando as seguintes coordenadas: 0,9-1,2 mm posterior ao bregma, 1,2-1,5 mm lateral e 3,6-4,0 mm vertical abaixo da calota craniana (PAXINOS, 1998), de acordo com o peso no momento da cirurgia. Foram usadas cânulas confeccionadas com agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com diâmetro de 0.7mm e comprimento padronizado em 12mm. Para prevenir obstrução, as cânulas foram ocluídas com mandris removíveis, feitos a partir de fios de aço inoxidável. Após a cirurgia estereotáxica de implante das cânulas guias, foram administrados 0,2mL i.m. de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte e 0,1 mL de analgésico/antiinflamatório (Banamine®). Os animais foram acomodados em caixas plásticas individuais e mantidos em salas com as condições descritas acima. No período

pós-operatório da cirurgia estereotáxica, os animais foram manipulados diariamente simulando as condições experimentais às quais foram submetidos. Os mandris foram trocados diariamente evitando a obstrução das cânulas, e os bebedouros preenchidos. Os experimentos de ingestão foram realizados 5 dias após a cirurgia, e os de ansiedade 3 dias após a cirurgia.

4.3 DROGAS E MICROINJEÇÕES

Carvacrol (SIGMA/Aldrich, MO, USA) foi usado nas concentrações de 25, 50, 75, 150, 300 e 600 µg/rato. Foi usado óleo de milho como veículo. A administração foi central (VLE), numa dose de 5 µL, através do uso de uma seringa de 10 µl (Hamilton, Co. Inc. Whittier, C.A.) conectada a uma agulha odontológica nº 30G com 13 mm de comprimento através de um tubo de polietileno (PE10).

Furosemida (Lasix) foi aplicada na concentração de 20mg/rato, via subcutânea, em solução fisiológica isotônica (NaCl 0,9%) como veículo.

Prazosina, antagonista seletivo α 1-adrenérgico, foi administrado nas concentrações de 40, 80 e 160 nmol. A administração foi central (VLE), com volume de 5µL, e de acordo com trabalho anterior (COLOMBARI et al., 1990).

Para-clorofenilalanina (pCPA – SIGMA/Aldrich, MO, USA), um agente neurotóxico serotoninérgico seletivo, foi diluído em solução salina isotônica, e administrado centralmente (VLE) na concentração de 200 µg/rato, na dose de 2µL, de acordo com estudos anteriores (REIS et al., 1994; HRITCU et al., 2007).

4.4 DEPLEÇÃO DE SÓDIO

Três dias após a cirurgia os animais foram submetidos à depleção de sódio. Para isto, foram retirados os bebedouros e ração, e administrado injeção subcutânea (s.c) de furosemida (20 mg/Kg). Foram utilizadas caixas individuais forradas com papel absorvente, trocadas constantemente durante 3 horas. A diurese foi monitorada por observação, e constatada pela perda de peso (aproximadamente 10%) durante a depleção. Ao final da diurese promovida pela furosemida, os animais foram transferidos para uma caixa com maravalha e mantidos com alimento hipossódico (0,001% Na⁺ e 0,33% K⁺) e água destilada por 24 horas.

4.5 EFEITO DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO

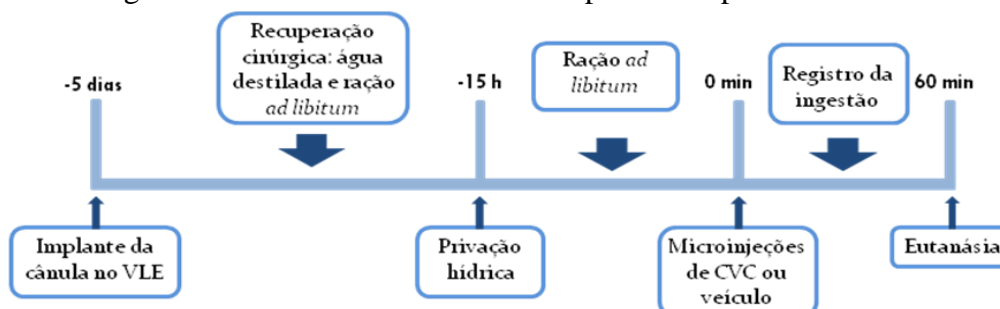
No dia seguinte à depleção, os animais receberam microinjeções de CVC ou veículo no VLE nas concentrações já descritas anteriormente. Imediatamente após a injeção, foram oferecidos aos animais os bebedouros graduados com água destilada e com solução salina hipertônica (1,5%). O monitoramento da ingestão de água destilada e de solução salina teve início 5 minutos após a oferta dos bebedouros e continuou por uma hora, até o final das sessões experimentais. O monitoramento da ingestão ocorreu nos tempos determinados no protocolo experimental (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 min.). Todos os experimentos foram realizados entre 7h e 11h e os animais não tiveram acesso a ração durante este período.



Protocolo Experimental 01 – Efeito de microinjeções de CVC (25, 50, 75, 150, 300 µg/rato) no VLE sobre a ingestão de solução salina hipertônica (1,5%) e de água destilada em ratos depletados de sódio.

4.6 EFEITO DO CARVACROL NA INGESTÃO DE ÁGUA EM MODELO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA

Para testar o efeito do CVC na sede em modelo de desidratação, os animais receberam apenas ração e água destilada *ad libitum* durante 4 dias de recuperação cirúrgica. Doze horas antes da sessão experimental, os animais foram privados de água destilada. No dia seguinte, os ratos foram privados de ração e receberam CVC (300 µg) ou veículo. Imediatamente após, foram oferecidos bebedouros com água destilada, e a ingestão foi registrada a cada 5 minutos durante o período experimental de 1 hora.



Protocolo Experimental 02 – Efeito de microinjeções de CVC (300µg/rato) no VLE sobre a ingestão de água destilada em modelo de privação hídrica.

4.7 PAPEL DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO

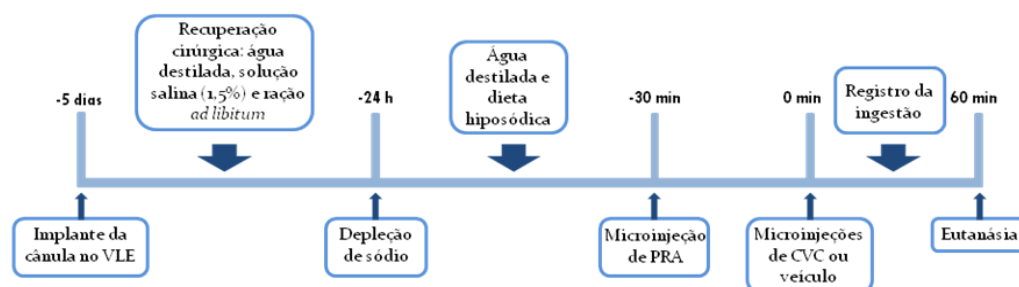
Para testar o papel da via serotoninérgica na resposta do carvacrol à ingestão de sódio, os animais receberam microinjeção no VLE de p-clorofenilalanina (pCPA) em dose única (200µg/2µL), 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Os animais foram depletados de Na⁺ e submetidos ao teste do apetite no dia seguinte. Durante os experimentos, foi administrado CVC na concentração de 300 µg por rato (5 µL) ou veículo. Os bebedouros foram oferecidos imediatamente após as microinjeções, e a ingestão registrada a cada 5 minutos durante 1 hora.



Protocolo Experimental 03 – Papel da Serotonina no efeito de microinjeções de CVC (300 µg/rato) no VLE sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) e água destilada em animais depletados de sódio.

4.8 PAPEL DA VIA α 1-ADRENÉRGICA NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO

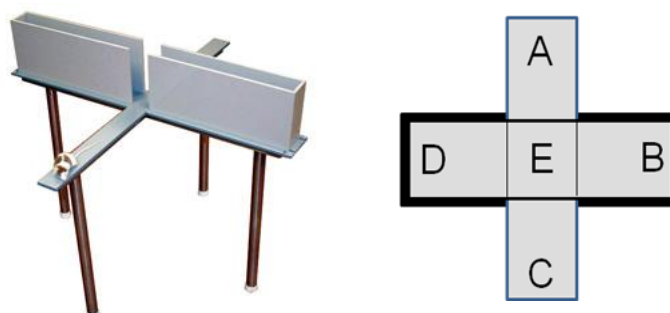
Para testar o papel da via α 1-adrenérgica, os animais foram depletados de sódio e, no dia do experimento, receberam microinjeções de prazosin (PRA) (40, 80 ou 160 nmol) no VLE na mesma concentração descrita acima. Após 30 minutos, receberam injeção intracerebroventricular de veículo ou CVC (300 µg). Os bebedouros foram oferecidos imediatamente após administração do CVC, e a ingestão registrada a cada 5 minutos durante 1 hora.



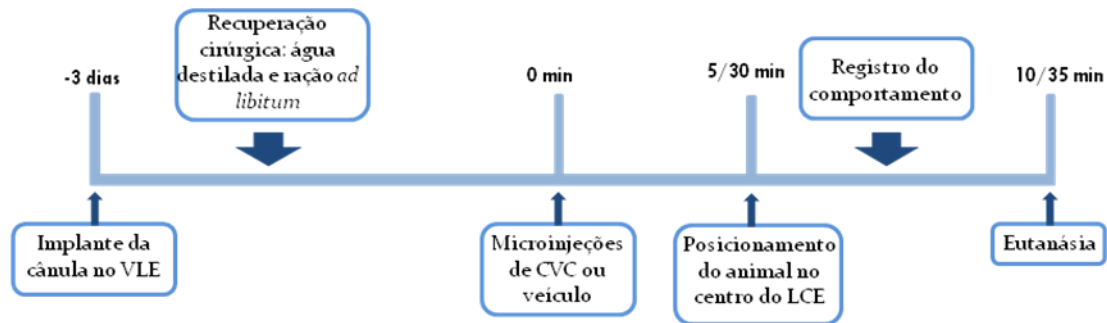
Protocolo Experimental 04 - Papel do bloqueio dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos no efeito de microinjeções de CVC (300 $\mu\text{g}/\text{rato}$) no VLE sobre a ingestão de salina hipertônica (1,5%) e água destilada em animais depletados de sódio.

4.9 EFEITO DO CARVACROL NA ANSIEDADE: TESTE EM CRUZ ELEVADA

O teste consiste em um labirinto de madeira em forma de cruz, elevado a 50 centímetros do chão, com dois braços fechados (cercados por 40 centímetros de superfície vertical, sem teto) e dois braços abertos (cercados por 2 cm de borda para prevenir quedas), dispostos de forma alternada e conectados por uma plataforma central que permite o acesso aos quatro braços de forma igual. Foram utilizados um luxímetro e um espectrômetro para o registro, respectivamente, da intensidade luminosa (em 5 pontos do labirinto, A-E, fig.3) e do espectro luminoso no centro da cruz elevada. O labirinto foi pintado de preto e coberto com acrílico. Os braços possuem 10 cm de largura, e os testes foram realizados sob luz vermelha (40W). A lâmpada foi fixada 120 centímetros acima do centro do labirinto (3,3 lux no centro do labirinto). Os animais receberam veículo ou CVC em diferentes concentrações de acordo com o grupo experimental (150, 300 e 600 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$). Como controle positivo, no tempo de 30 minutos um grupo de ratos recebeu diazepam (2,5mg/kg) i.p., e um grupo controle recebeu salina i.p. Cinco ou trinta minutos após a administração do CVC, os animais foram posicionados no centro da cruz elevada, voltados de frente para um dos braços fechados. O teste teve duração de 5 minutos para cada rato, e a cada troca, o labirinto foi limpo com álcool (10%). O número de entradas (com as quatro patas), a porcentagem de entradas ($= \text{NEBA} \times 100 / \text{NEBT}$) e o tempo gasto nos braços abertos, bem como o número total de entradas em um dos quatro braços, foram registrados. Todos os experimentos foram realizados entre 7:30 e 11:30, registrados por uma câmera digital (SAMSUNG) e analisados posteriormente por 2 observadores independentes.



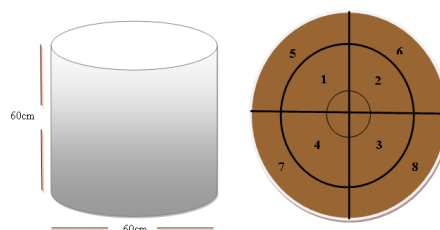
Desenho esquemático do labirinto em cruz elevada.



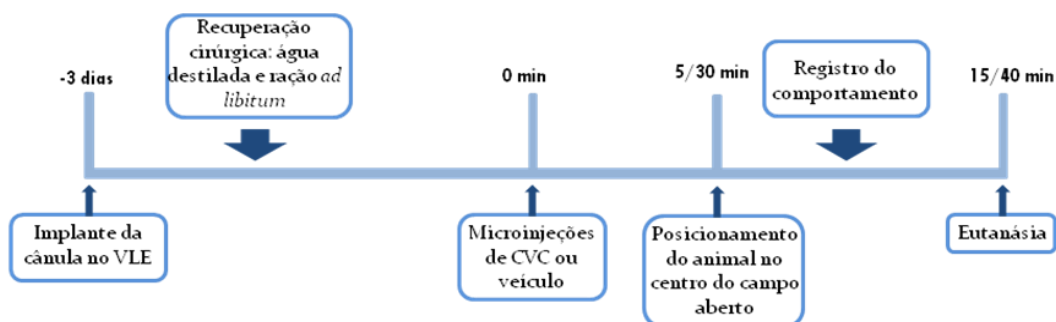
Protocolo Experimental 05 – Efeito de microinjeções de CVC (150, 300, 600 $\mu\text{g}/\text{rato}$) no VLE sobre a ansiedade no teste da cruz elevada.

4.10 EFEITO DO CARVACROL NA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para observar o efeito de microinjeções de CVC sobre a atividade locomotora dos animais, realizou-se o teste do campo aberto. Para este teste foi utilizada uma caixa circular (madeira) com fundo de acrílico, de 60 cm de diâmetro e 60 cm de altura, com uma abertura superior, e base dividida em oito áreas iguais (42,43 cm^2). Os animais receberam CVC nas doses mais altas utilizadas no presente estudo (150, 300 e 600 $\mu\text{g}/\text{rato}$) ou veículo. Imediatamente após as microinjeções, os ratos foram gentilmente posicionados no centro da caixa e tiveram o deslocamento quantificado em número de secções cruzadas à medida que colocavam as quatro patas dentro dos limites de cada área. O teste teve duração de 10 minutos, e foi registrado com câmera de vídeo digital (SAMSUNG) para posteriores análises.



Desenho esquemático da caixa utilizada para o teste do campo aberto; áreas percorridas pelos ratos numeradas de 1 a 8.



Protocolo Experimental 06 - Efeito de microinjeções de CVC (150, 300, 600 μ g/rato) no VLE sobre a atividade locomotora no teste do campo aberto.

4.11 EFEITO DO CARVACROL NA ATIVAÇÃO NEURONAL ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FOS (FOS-IR)

Para investigar as possíveis áreas cerebrais ativadas pelo carvacrol, bem como investigar o tempo de ativação dessas áreas, pequenos grupos experimentais (4 a 5 ratos por grupo) receberam veículo ou CVC intracerebroventricular na concentração de 300 μ g/rato. A eutanásia foi realizada em diferentes tempos para cada grupo: 5 e 30 minutos após administração do veículo ou CVC. Os animais receberam injeção intraperitoneal de tiopentato de sódio (40 mg/kg, i.p.) antes da perfusão intracardíaca via aorta ascendente com solução salina fosfatada (PBS 0,1M) seguida de solução paraformaldeído (10%). Em seguida, os cérebros foram removidos e mergulhados em solução salina (0,9%) e refrigerados, sendo transferidos após 24 horas para solução de formol glicosilado a 30%, permanecendo estocados por até 15 dias. Os cérebros foram cortados em criostato (-25 °C), em espessura aproximada de 40 μ m. Posteriormente foram lavados em solução PB 0,1M, incubados em água oxigenada (bloqueio da peroxidase endógena), soro de leite, sendo finalmente incubados *over-night* em anticorpo primário anti-fos de coelho (1:4000). No dia seguinte, os cortes foram lavados novamente em PBS e incubados com o anticorpo secundário biotilado de cavalo (1:400) por 1 hora. Após esse procedimento, foram novamente lavados e incubados em solução complexo A/B por 1 hora, e revelados por solução DAB/níquel por cerca de 5 minutos no escuro. Os cortes foram montados em lâminas histológicas e cobertos com lamínulas para análises posteriores. As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus U-SPT, acoplado a uma câmera Roper Scientific. Para a captura de imagens e a contagem de células, foi utilizado o programa Image-Pro Discovery. As células foram

contadas de modo semi-quantitativo através do método cego, e a média do número de células foi calculada para inserção nas análises estatísticas.

4.12 HISTOLOGIA PARA CONFIRMAÇÃO DE ACERTO NA CANULAÇÃO

Após as sessões experimentais os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia por perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida por formol 10%. Após o procedimento, os cérebros foram removidos, mergulhados em solução salina 0,9% e refrigerados; 24 horas depois, transferidos para solução de formol glicosado a 30%, onde ficaram estocados e refrigerados por 48 horas. Após este período os cérebros foram cortados por técnica de congelamento no criostato, organizados em lâminas com gel e então conduzidos para secagem na estufa. Após secagem, as lâminas foram coradas com cresil violeta. Apenas os dados referentes aos ratos cuja cânula estava no VLE foram utilizados.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de todos os dados obtidos foi realizada através do programa Graph Pad versão 6.0. Para analisar o efeito de microinjeções de CVC no apetite por sódio em ratos depletados deste íon e na sede utilizou-se um modelo misto de ANOVA para medidas repetidas, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Esses resultados são sumarizados na tabela 4. Para a análise dos dados referentes aos testes de ansiedade e atividade locomotora, utilizou-se ANOVA *one way* seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para análise dos dados da expressão de FOS em áreas cerebrais utilizou-se Teste t de Student. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$; os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO

A administração central de CVC em diferentes concentrações reduziu de forma dose dependente a ingestão de salina hipertônica em ratos depletados de sódio. Nos tempos de 5 e 10 minutos após a microinjeção de CVC, não houve diferença estatística entre os grupos. Após 15 minutos da microinjeção, apenas na concentração de 150 μ g/2 μ L a ingestão de sódio foi significativamente menor do que o controle (CVC150: 0,8 \pm 0,4 mL; VEI: 5,4 \pm 1,3 mL). No tempo de 20 minutos após as microinjeções, houve diferença significativa entre os grupos que receberam CVC na concentração de 50, 75, 150 e 300 μ g quando comparados ao grupo controle (CVC50: 3,5 \pm 1,0 mL; CVC75: 2,1 \pm 1,1 mL; CVC150: 1,2 \pm 0,7 mL; CVC300: 1,6 \pm 0,8 mL; VEI: 7,2 \pm 1,3 mL). No tempo de 30 minutos após o início do experimento, todos os grupos que receberam CVC diferiram do veículo, e os grupos que receberam 75, 150 e 300 μ g diferiram dos grupos que receberam 25 e 50 μ g de CVC (CVC25: 6,8 \pm 1,4 mL; CVC50: 5,8 \pm 1,4 mL; CVC75: 3,0 \pm 1,1 mL; CVC150: 2,0 \pm 1,2 mL; CVC300: 1,8 \pm 0,8 mL; VEI: 9,9 \pm 1,1 mL). No último tempo, 60 minutos após a administração da droga, os grupos que receberam CVC nas diferentes concentrações ingeriram significativamente menor volume de salina hipertônica do que o controle. Além disso, houve diferença significativa entre os grupos experimentais que receberam CVC nas concentrações de 25 e 50 μ g e nas concentrações de 75, 150 e 300 μ g (CVC25: 9,0 \pm 1,4 mL; CVC50: 7,8 \pm 1,6 mL; CVC75: 3,8 \pm 1,3 mL; CVC150: 3,0 \pm 1,2 mL; CVC300: 2,2 \pm 0,9 mL; VEI: 12,5 \pm 0,8 mL). A ingestão de água destilada não foi modificada pelo tratamento com CVC em qualquer das concentrações. Os valores da média e desvio-padrão da média (média \pm SEM) da ingestão de água e salina hipertônica após microinjeções de CVC encontram-se condensadas na tabela 1, e a ingestão de salina hipertônica e água destilada está representada na figura 1.

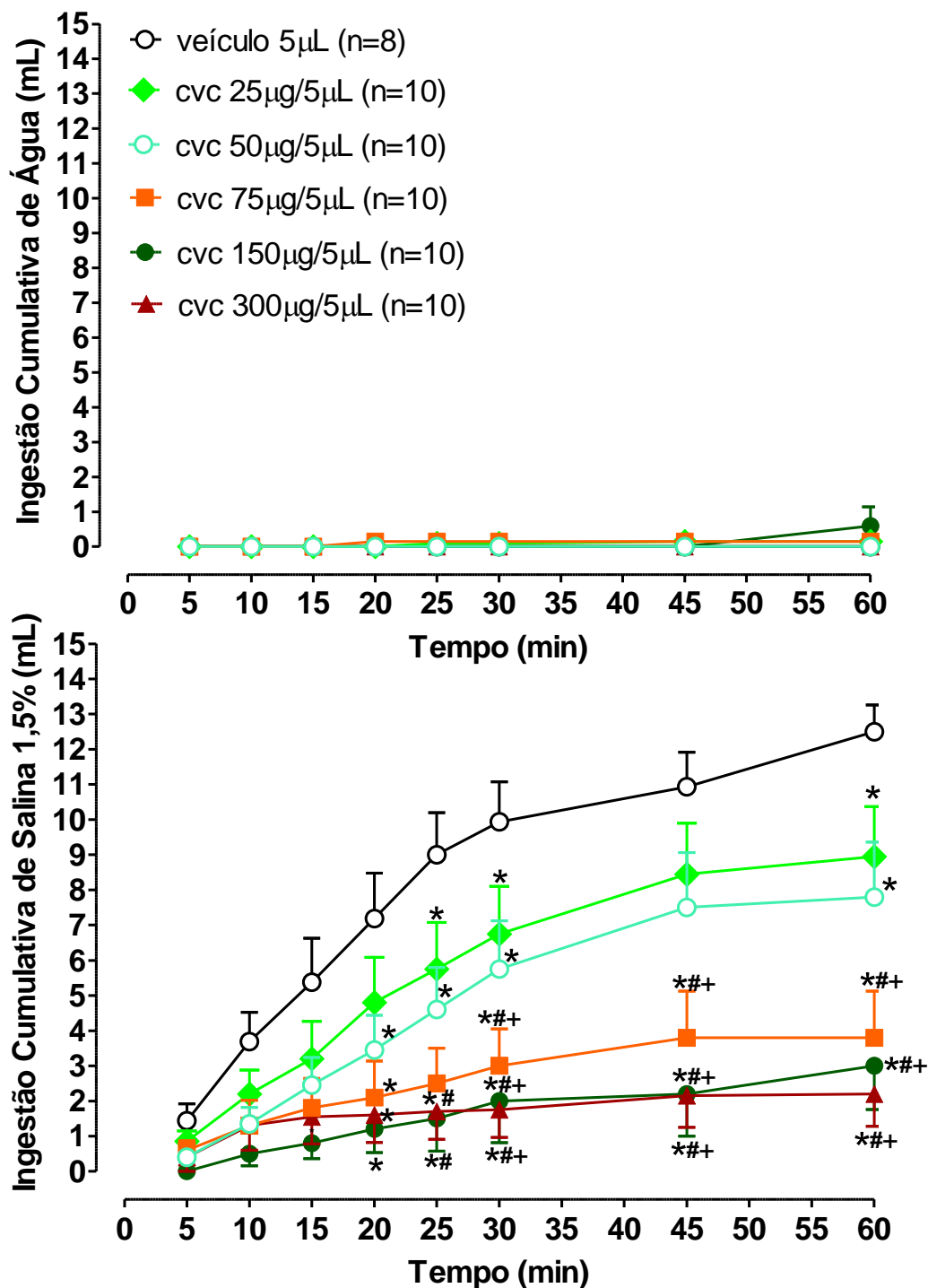


Figura 1. Efeito de microinjeções i.c.v. de CVC nas concentrações de 25, 50, 75, 150 e 300 μ g sobre a ingestão de salina 1,5% de ratos depletados de sódio. (*) indica diferença em relação ao controle (óleo de milho). (#) indica diferença em relação à concentração de 25 μ g de CVC. (+) indica diferença em relação à concentração de 50 μ g de CVC. Os dados foram tratados com modelo misto de ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls; diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 1. Efeito de microinjeções de CVC no VL sobre a ingestão de água destilada e de salina 1,5% (mL) em animais depletados de sódio.

Tratamento	Depleção de sódio											
	Veículo (8)		CVC 25µg (10)		CVC 50µg (10)		CVC 75µg (10)		CVC 150µg (10)		CVC 300µg (10)	
Tempo	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina
5	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4
10	0,0 ± 0,0	3,7 ± 0,8	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,7
15	0,0 ± 0,0	5,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0	3,2 ± 1,1	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,8	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4*	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8
20	0,0 ± 0,0	7,2 ± 1,3	0,0 ± 0,0	4,8 ± 1,3	0,0 ± 0,0	3,5 ± 1,0*	0,2 ± 0,2	2,1 ± 1,0*	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,7*	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8*
25	0,0 ± 0,0	9,0 ± 1,2	0,0 ± 0,0	5,8 ± 1,3*	0,0 ± 0,0	4,6 ± 1,2*	0,2 ± 0,2	2,5 ± 1,0*	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,9*#	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,8*#
30	0,0 ± 0,0	9,9 ± 1,1	0,0 ± 0,0	6,8 ± 1,4*	0,0 ± 0,0	5,8 ± 1,4*	0,2 ± 0,2	3,0 ± 1,1*##+	0,0 ± 0,0	2,0 ± 1,2*##+	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,8*##+
45	0,0 ± 0,0	10,9 ± 1,0	0,0 ± 0,0	8,5 ± 1,5	0,0 ± 0,0	7,5 ± 1,6	0,2 ± 0,2	3,8 ± 1,3*##+	0,0 ± 0,0	2,2 ± 1,2*#	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,9*##+
60	0,0 ± 0,0	12,5 ± 0,8	0,2 ± 0,2	9,0 ± 1,4*	0,0 ± 0,0	7,8 ± 1,6*	0,2 ± 0,2	3,8 ± 1,3*##+	0,6 ± 0,6	3,0 ± 1,2*#	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,9*##+

O número de animais utilizados nos experimentos está indicado entre parênteses. Os dados foram analisados com modelo misto de ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), e estão representados como média e desvio-padrão (média \pm SEM). (*) Diferença relativa ao grupo controle; (#) Diferença relativa ao grupo CVC25; (+) Diferença relativa ao grupo CVC50.

5.2 EFEITO DO CARVACROL NA INGESTÃO DE ÁGUA EM MODELO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA

A administração central de CVC na concentração de $300\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ não modificou a ingestão de água destilada em relação ao controle em animais submetidos à privação hídrica. A análise estatística demonstrou diferença no tempo, mas não no tratamento empregado (Tempo: $F(7,63) = 77,84$, $p < 0,0001$). O volume médio ingerido aos 5 minutos em ratos que receberam CVC na concentração de $300\mu\text{g}$ foi de $3,2\text{ mL}$, enquanto o grupo controle ingeriu em média $2,4\text{ mL}$ (CVC300: $3,2 \pm 0,6\text{ mL}$ e VEI: $2,4 \pm 1,1\text{ mL}$). Aos 30 minutos, a ingestão média do grupo experimental foi igual à do grupo controle (CVC300: $13,2 \pm 1,6\text{ mL}$ e VEI: $13,2 \pm 1,4\text{ mL}$). Aos 60 minutos a ingestão de água foi de $17,5\text{ mL}$ e $16,6\text{ mL}$ nos animais que receberam carvacrol e veículo, respectivamente (CVC300: $17,5 \pm 1,3\text{ mL}$ e VEI: $16,6 \pm 0,4\text{ mL}$). Os dados estão representados na figura 2.

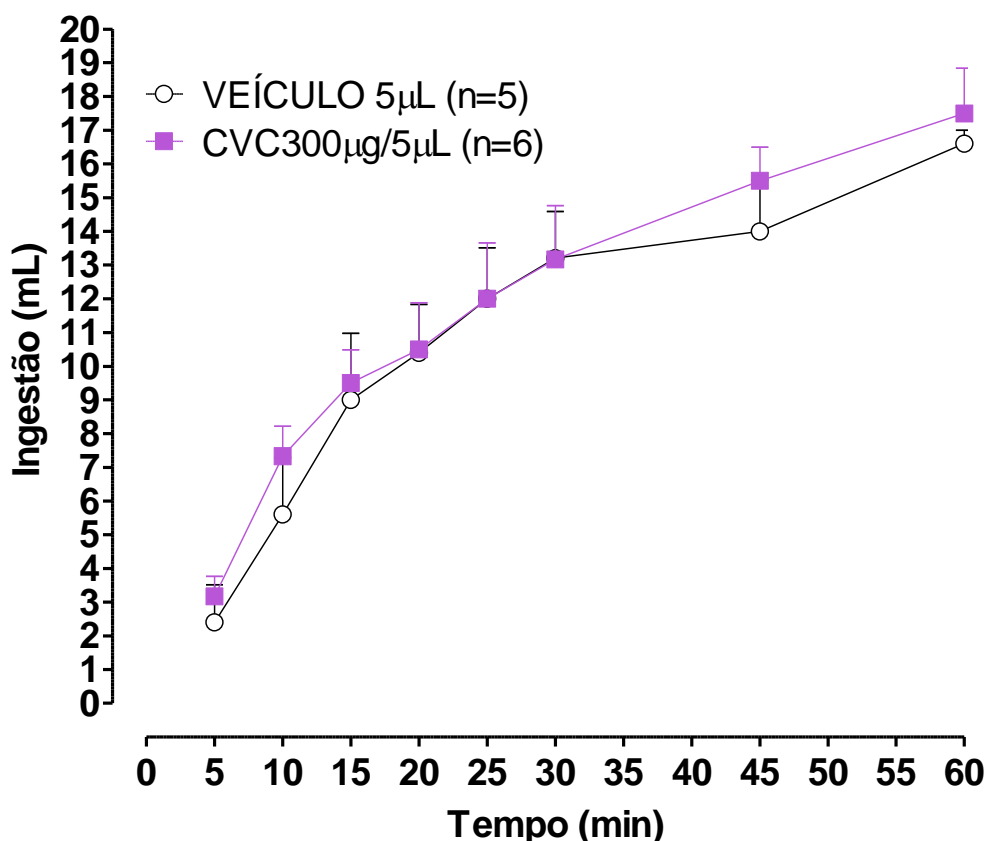


Figura 2. Efeito de microinjeções de CVC ($300\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) no VL sobre a ingestão de água destilada em animais submetidos à privação hídrica por 14 horas *overnight*. Interação: $F(7,63) = 0,4197$, $p = 0,8865$; Tempo: $F(7,63) = 77,84$, $p < 0,0001$.

5.3 PAPEL DAS VIAS SEROTONINÉRGICAS NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO

A administração i.c.v. de PCPA (200 μ g/2 μ L) 72h antes das microinjeções de CVC (300 μ g/5 μ L) inibiu seu efeito antinatriorexigênico. Em nenhum dos tempos observados houve diferença estatística entre os grupos que receberam carvacrol ou veículos e foram pré-tratados com PCPA. Contudo, esses mesmos grupos diferiram do grupo que recebeu CVC e foi pré-tratado com salina em todos os tempos, sendo significativa a partir de 10 minutos. Aos 60 minutos do teste, o grupo que recebeu CVC e foi pré-tratado com PCPA ingeriu em média 11,4 mL, enquanto o grupo que recebeu CVC e foi pré-tratado com salina ingeriu 2,2 mL (PCPA+CVC: 11,4 \pm 1,6 mL; VEIC+CVC: 2,2 \pm 0,9 mL). A ingestão de água destilada foi similar entre os grupos em todos os tempos observados. Os dados são sumarizados na tabela 2 e a ingestão de água destilada e salina é representada na figura 3.

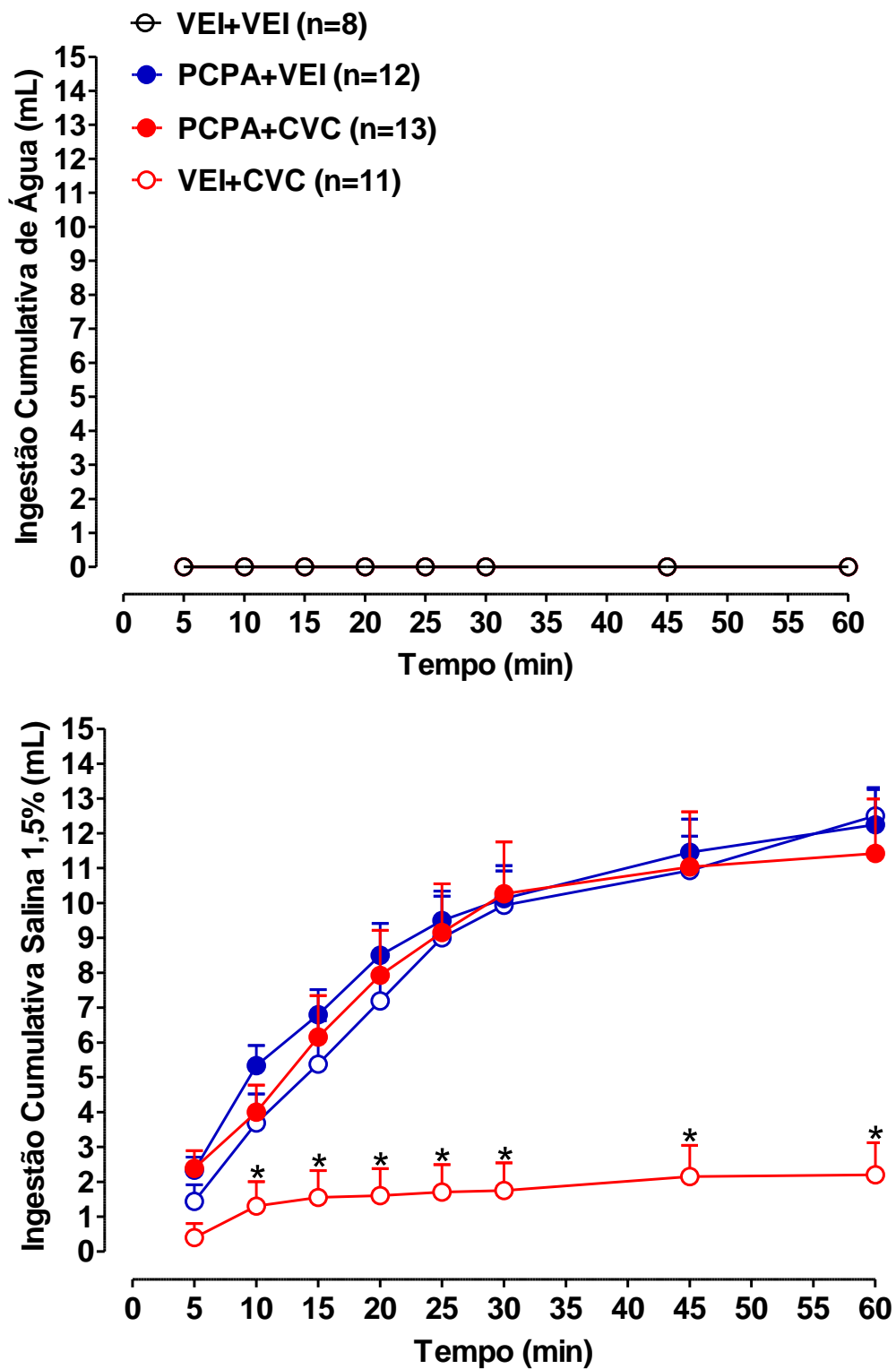


Figura 3. Efeito de microinjeções de pCPA (200 μ g/2 μ L) 72h antes da administração de CVC (300 μ g) no VLE sobre a ingestão de salina hipertônica em animais depletados de sódio. Os dados foram analisados em modelo misto de ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. (*) Diferença relativa ao grupo PCPA+CVC.

Tabela 2. Efeito de microinjeções de PCPA (200µg/2µL) 72h antes da administração de CVC (300µg/5µL) no VL sobre a ingestão de salina 1,5% e água destilada em animais depletados de sódio.

Tratamento	Depleção de sódio							
	VEI+VEI (8)		PCPA+VEI (12)		PCPA+CVC (13)		VEI+CVC (10)	
Tempo	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina
5	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	2,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4
10	0,0 ± 0,0	3,7 ± 0,8	0,0 ± 0,0	5,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	4 ± 0,8	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,7*
15	0,0 ± 0,0	5,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0	6,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	6,2 ± 1,2	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8*
20	0,0 ± 0,0	7,2 ± 1,3	0,0 ± 0,0	8,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	7,9 ± 1,3	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8*
25	0,0 ± 0,0	9,0 ± 1,2	0,0 ± 0,0	9,5 ± 0,8	0,0 ± 0,0	9,2 ± 1,4	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,8*
30	0,0 ± 0,0	9,9 ± 1,1	0,0 ± 0,0	10,1 ± 0,8	0,0 ± 0,0	10,3 ± 1,5	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,8*
45	0,0 ± 0,0	10,9 ± 1,0	0,0 ± 0,0	11,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	11 ± 1,6	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,9*
60	0,0 ± 0,0	12,5 ± 0,8	0,0 ± 0,0	12,3 ± 1,1	0,0 ± 0,0	11,4 ± 1,6	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,9*

Os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com modelo misto de ANOVA seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), e estão representados como média (mL) e desvio-padrão (média ± SEM). (*) Diferença relativa ao grupo PCPA+VEI.

5.4 PAPEL DA VIA A1-ADRENÉRGICA NA RESPOSTA DO CARVACROL NO TESTE DO APETITE POR SÓDIO

A administração i.c.v. de prazosina (PRA) (80 e 160 nmol) impediu parcialmente o efeito antinatriorexigênico de microinjeções de CVC (300 µg). A administração da menor concentração (40nmol/2µL) de prazosina não foi capaz de impedir o efeito inibitório do CVC na ingestão de salina em nenhum dos tempos observados. Aos 20 minutos, o volume médio de salina ingerido foi de 5,0, 1,8 e 2 mL nos grupos que receberam CVC e foram pré-tratados com prazosina nas concentrações de 160, 80 e 40 nmol, não havendo diferença estatística entre o grupo experimental pré-tratado na concentração de 160nmol/2µL e o grupo controle (PRA160+CVC: 5,0 ± 0,9 mL; PRA80+CVC: 1,9 ± 0,5 mL; PRA40+CVC: 2,0 ± 1,0 mL; PRA160+VEI: 7,0 ± 1,4 mL; VEI+CVC: 1,6 ± 0,8 mL). No tempo de 60 minutos, os grupos que receberam CVC e foram pré-tratados com PRA nas concentrações de 160 e 80 nmol/2µL ingeriram significativamente mais solução hipertônica do que os animais tratados com CVC e pré-tratados com salina e também dos ratos pré-tratados com 40nmol/2µL de PRA (PRA160+CVC: 9,2 ± 1,5 mL; PRA80+CVC: 7,0 ± 1,6 mL; PRA40+CVC: 3,3 ± 1,3 mL; VEI+CVC: 2,2 ± 0,9 mL). A ingestão de água destilada foi similar em todos os grupos não havendo diferenças significativas entre os mesmos. Os dados estão sintetizados na tabela 3 e a ingestão de água destilada e salina hipertônica representada na figura 4.

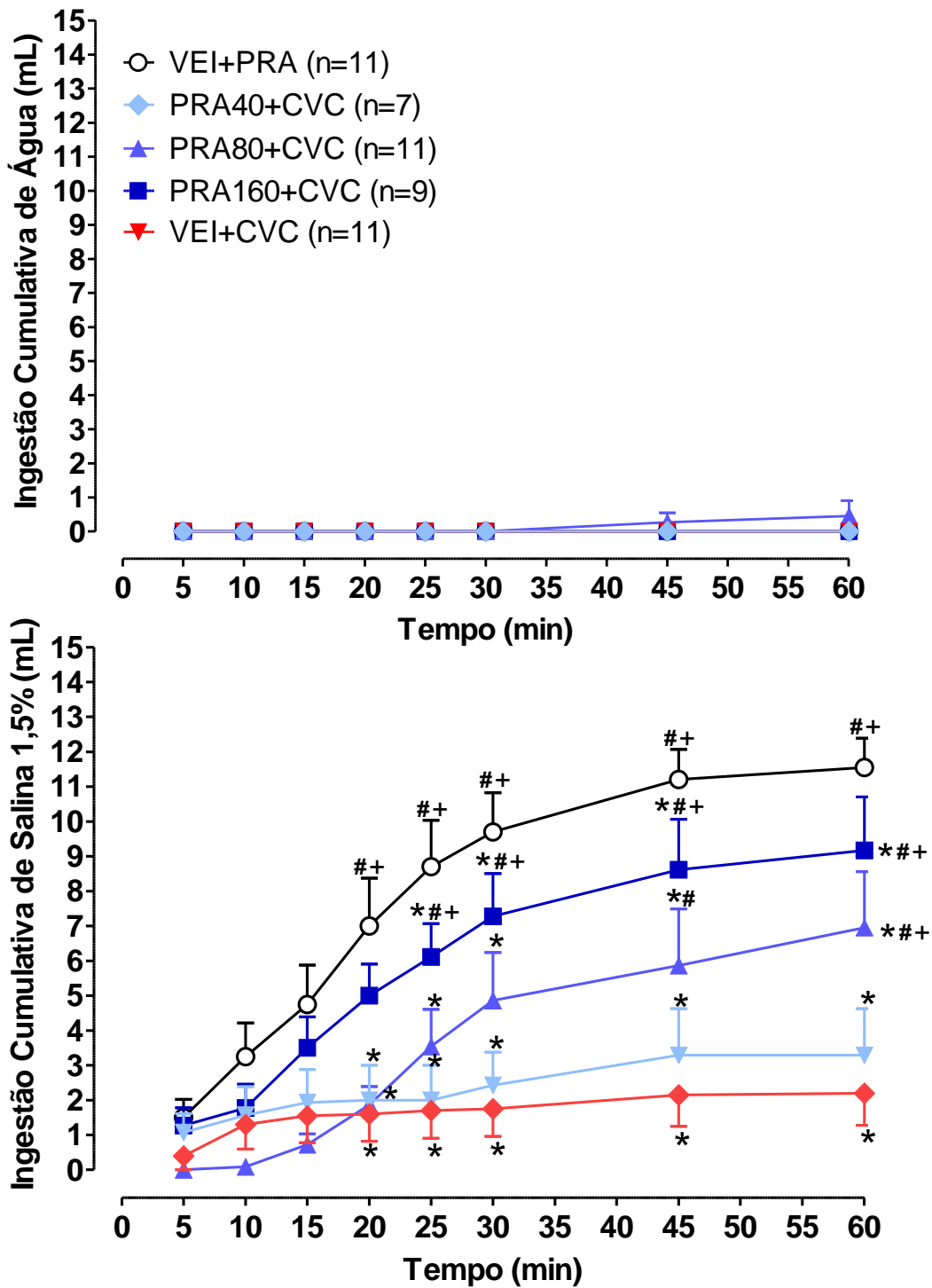


Figura 4. Efeito de microinjeções de prazosina (40, 80 e 160 nmol/2 μ L) 30 minutos antes da administração de CVC (300 μ g/5 μ L) no VL sobre a ingestão de salina hipertônica em animais depletados de sódio. Os dados foram analisados em modelo misto de ANOVA para medidas repetidas seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. (*) Diferença relativa ao grupo PRA160+VEI; (#) Diferença relativa ao grupo VEI+CVC; (+) Diferença relativa ao grupo PRA40+CVC.

Tabela 3. Efeito de microinjeções de PRA (40, 80 e 160 nmol/2µL) 30 min. antes da administração de CVC (300 µg/5µL) no VL sobre a ingestão de salina 1,5% e água destilada (mL) em animais depletados de sódio.

Tratamento	Depleção de sódio									
	PRA160+VEI (10)		PRA40+CVC (7)		PRA80+CVC (11)		PRA160+CVC (9)		VEI+CVC (10)	
Tempo	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina	Água	Salina
5	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4
10	0,0 ± 0,0	3,3 ± 1,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,7
15	0,0 ± 0,0	4,8 ± 1,1	0,0 ± 0,0	1,9 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,3	0,0 ± 0,0	3,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8
20	0,0 ± 0,0	7,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0	2,0 ± 1,0*	0,0 ± 0,0	1,9 ± 0,5*	0,0 ± 0,0	5,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,8*
25	0,0 ± 0,0	8,7 ± 1,3	0,0 ± 0,0	2,0 ± 1,0*	0,0 ± 0,0	3,5 ± 1,1*	0,0 ± 0,0	6,1 ± 1,0*##	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,8*
30	0,0 ± 0,0	9,7 ± 1,1	0,0 ± 0,0	2,4 ± 0,9*	0,0 ± 0,0	4,9 ± 1,4*	0,0 ± 0,0	7,3 ± 1,2*##	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,8*
45	0,0 ± 0,0	11,2 ± 0,9	0,0 ± 0,0	3,3 ± 1,3*	0,3 ± 0,3	5,9 ± 1,6*#	0,0 ± 0,0	8,6 ± 1,5*##	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,9*
60	0,0 ± 0,0	11,6 ± 0,8	0,2 ± 0,2	3,3 ± 1,3*	0,5 ± 0,5	7,0 ± 1,6*##	0,0 ± 0,0	9,2 ± 1,5*##	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,9*

Os números de animais utilizados nos experimentos estão indicados entre parênteses. Os dados foram analisados com modelo misto de ANOVA seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), e estão representados como média e erro-padrão da média. (*) Diferença relativa ao grupo PRA160+VEI; (#) Diferença relativa ao grupo VEI+CVC; (+) Diferença relativa ao grupo PRA40+CVC.

Análises estatísticas dos experimentos do teste de apetite por sódio

Tabela 4. Sumário dos resultados da ANOVA modelo misto para medidas repetidas para a ingestão de salina 1,5% e água destilada, demonstrando correlação entre Interação, Tempo e Droga.

Experimentos	Interação (Tempo x Droga)		Tempo		Droga	
	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p
Experimento CVC						
Ingestão de sal	F (35, 364) = 5,418	< 0,0001	F (7, 364) = 77,22	< 0,0001	F (5, 52) = 7,095	< 0,0001
Ingestão de água	F (35, 378) = 0,8978	0,6386	F (7, 378) = 1,540	0,1522	F (5, 54) = 0,5549	0,7339
Experimento PRA						
Ingestão de sal	F (28, 301) = 4,569	< 0,0001	F (7, 301) = 50,35	< 0,0001	F (4, 43) = 6,210	0,0005
Ingestão de água	F (28, 308) = 0,8531	0,6835	F (7, 308) = 0,7595	0,6218	F (4, 44) = 0,8531	0,4995
Experimento PCPA						
Ingestão de sal	F (21, 273) = 7,729	< 0,0001	F (7, 273) = 105,6	< 0,0001	F (3, 39) = 11,42	< 0,0001
Ingestão de água	F (14, 231) = 0,4408	0,9599	F (7, 231) = 1,834	0,0817	F (2, 33) = 0,4408	0,6473

5.5 EFEITO DO CARVACROL NA ANSIEDADE: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

Os dados referentes às medições do espectro luminoso no centro do LCE e da intensidade luminosa nos cinco pontos do labirinto estão representados nas figuras 5 e 6.

Aos 5 minutos, a administração de CVC na concentração mais alta (600µg/5µL) resultou em aumento do número de entradas nos braços abertos quando comparado ao grupo controle (CVC600: $6,9 \pm 0,7$; VEI: $3,6 \pm 0,9$). Microinjeções de CVC em todas as concentrações levou a maior tempo de permanência nos braços abertos quando comparados ao grupo controle (VEI: $48,4 \pm 10,6$ s; CVC150: $102,5 \pm 21,6$ s; CVC300: $114,1 \pm 16,7$; CVC600: $100,8 \pm 14,8$ s). Não houve diferença entre os grupos na preferência pelos braços abertos (%EBA) ou no número total de entradas em um dos braços (NTEB).

Aos 30 minutos, houve aumento do número de entradas nos braços abertos nos grupos que receberam CVC i.c.v. nas concentrações de 300 e 600 µg/5µL quando comparados ao grupo que recebeu veículo (VEI: $3,2 \pm 0,7$; CVC300: $6,8 \pm 1,1$; CVC600: $8,1 \pm 1,2$). Da mesma forma, os animais que receberam CVC i.c.v. nas concentrações de 300 e 600 µg/5µL também registraram maior tempo de permanência nos braços abertos quando comparados com o grupo que recebeu veículo (VEI: $56,9 \pm 16,1$ s; CVC300: $126,3 \pm 13,7$ s; CVC600: $155,3 \pm 18,3$ s). As três concentrações de CVC administradas resultaram em aumento da percentagem de entrada nos braços abertos (VEI: $37,9 \pm 4,4$ %; CVC150: $59,9 \pm 4,6$ %; CVC300: $52,8 \pm 3,5$ %; CVC600: $62,5 \pm 6,6$ %). Também foi registrada diferença significativa no número total de entradas nos braços entre os grupos que receberam CVC nas concentrações de 300 e 600 µg/5µL quando comparados com o grupo que recebeu veículo (VEI: $7,9 \pm 1,1$; CVC300: $12,2 \pm 1,4$; CVC600: $12,9 \pm 1,0$). Para todos os parâmetros analisados, com exceção do número total de entradas nos braços, o grupo que recebeu DZP demonstrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle (NEBA - DZP: $7,3 \pm 1,2$; CON: $3,5 \pm 0,5$; %EBA - DZP: $64,9 \pm 6,5$ %; CON: $35,2 \pm 3,5$ %; TPBA - DZP: $152,1 \pm 24,6$ s; CON: $68,2 \pm 14,3$ s). Os dados estão sintetizados na tabela 5 e as variáveis analisadas representadas na figura 7.

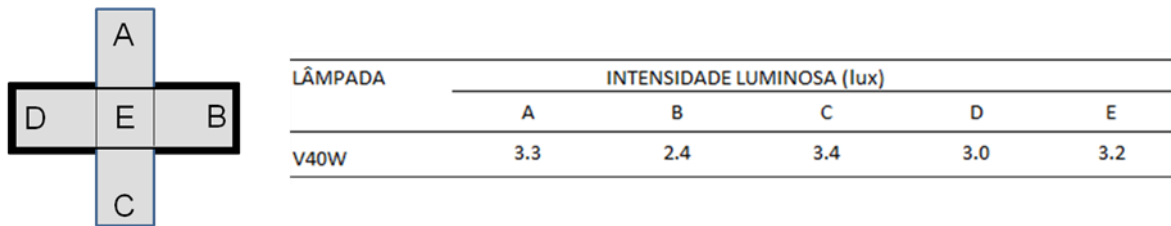


Figura 5. Valores de intensidade luminosa registrados a partir de luxímetro posicionado em 5 diferentes pontos do labirinto em cruz elevada.

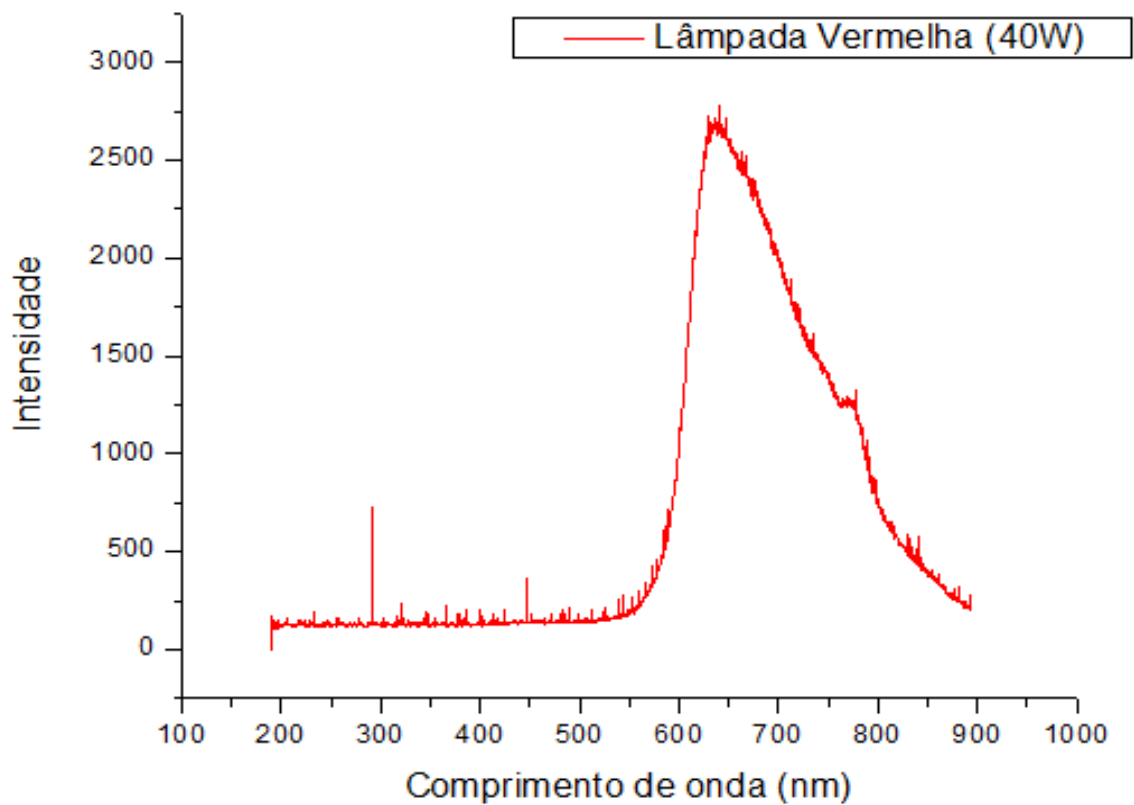


Figura 6. Representação gráfica do registro dos espectros de onda registrados através do uso de espectrômetro no centro do labirinto em cruz elevada.

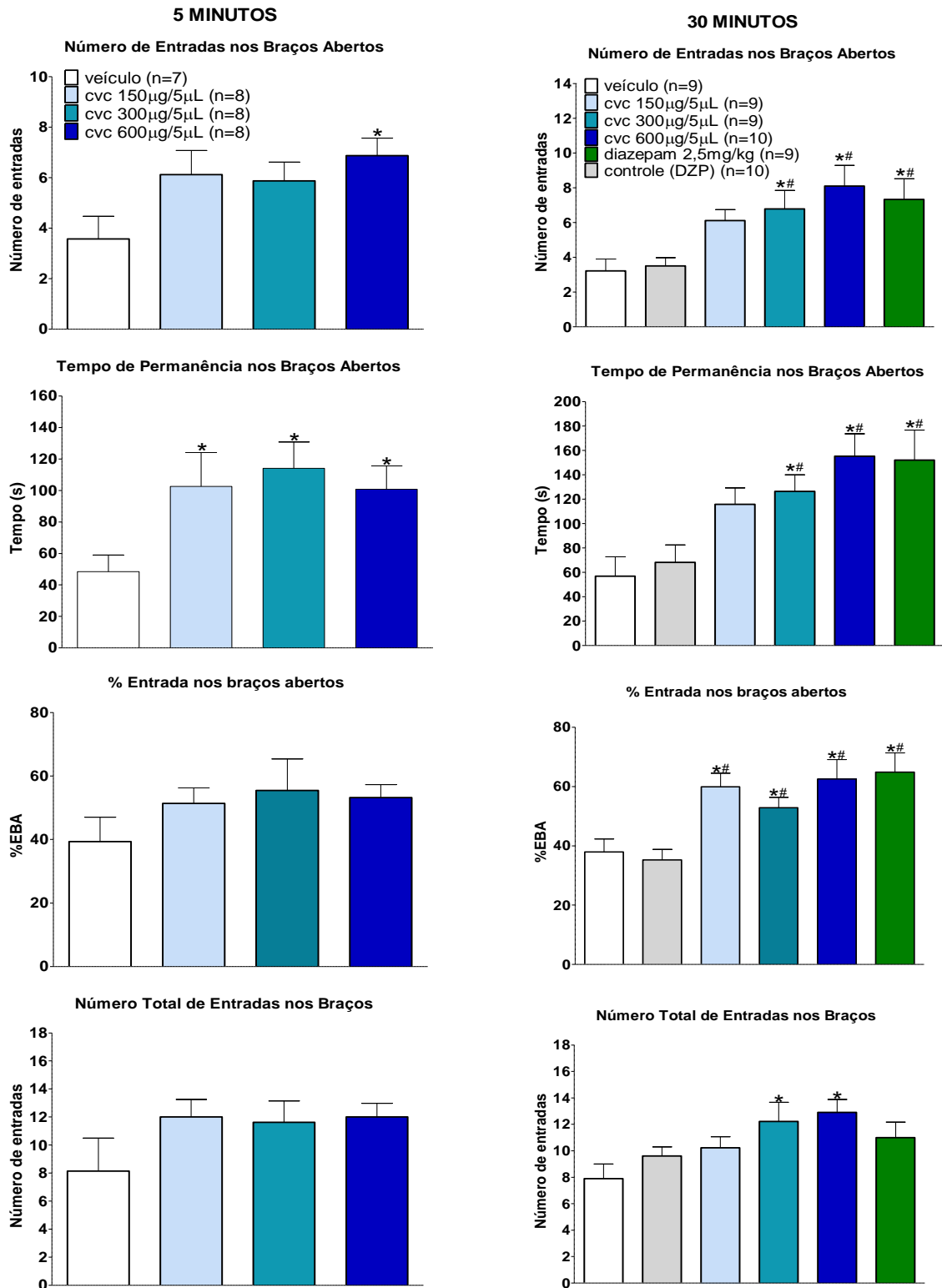


Figura 7. Efeito de microinjeções i.c.v. de CVC no teste do LCE. À esquerda, microinjeções 5 minutos antes do teste; à direita, microinjeções 30 minutos antes do teste. (*) Diferença relativa ao grupo que recebeu veículo (óleo de milho i.c.v., 5µL); (#) Diferença relativa ao grupo controle (salina, i.p. 1 mL).

Análises estatísticas dos experimentos do teste do labirinto em cruz elevada

Tabela 5. Sumário dos resultados da ANOVA *one-way* para as medidas do número de entradas nos braços abertos (NEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) e número total de entradas nos braços (NTEB) para os dois tempos estudados.

Experimentos	NEBA		TPBA		%EBA		NTEB	
	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p	F(DFn,DFd)	p
<i>Cruz Elevada 5 min</i>	F (3, 27) = 2,810	0,0584	F (3, 27) = 2,864	0,0452	F (3, 27) = 0,982	0,4159	F (3, 27) = 1,359	0,2762
<i>Cruz Elevada 30 min</i>	F (5,50) = 4,961	0,0009	F (5,50) = 6,005	0,0002	F (5,50) = 6,545	< 0,0001	F (5,50) = 3,013	0,0187

5.6 EFEITO DO CARVACROL NA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Verificou-se que a atividade locomotora no teste do campo aberto 5 e 30 minutos após microinjeções de CVC (150, 300 e 600 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$) foi similar ao grupo controle, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos (5 minutos - VEI: $32,3 \pm 9,9$; CVC150: $32,5 \pm 2,1$; CVC300: $41,6 \pm 11,2$; CVC600: $30,5 \pm 3,9$; 30 minutos - VEI: $37,3 \pm 5,2$; CVC150: $42,1 \pm 9,3$; CVC300: $40,5 \pm 5,5$; CVC600: $36,6 \pm 5,5$). As variáveis analisadas estão representadas na figura 8.

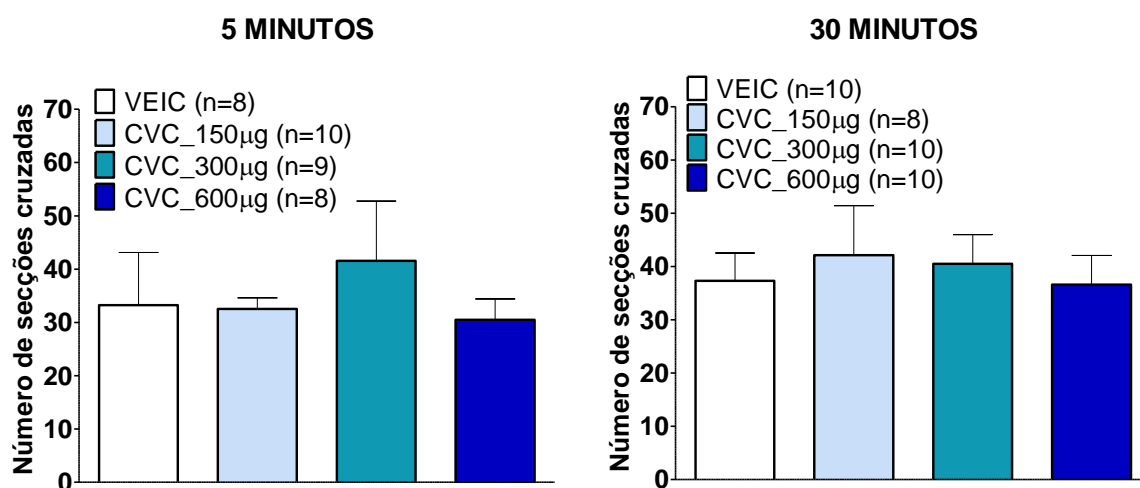


Figura 8. Efeito de microinjeções de CVC 5 e 30 minutos antes do posicionamento dos ratos no centro do campo aberto, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Para 5 minutos, $F(3,31) = 0,4122$, $p = 0,7454$; para 30 minutos, $F(3,34) = 0,1675$, $p = 0,9176$.

5.7 EFEITO DO CARVACROL NA ATIVAÇÃO NEURONAL ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FOS

Os resultados demonstraram que 5 minutos após microinjeções de 300 µg de CVC houve aumento no número de células FOS-IR no grupo experimental dos seguintes núcleos: área pré-óptica medial (VEI: $35,3 \pm 7,5$; CVC: $102,0 \pm 13,5$), núcleo pré-óptico mediano (VEI: $44,3 \pm 5,2$; CVC: $90,0 \pm 14,0$), núcleo paraventricular hipotalâmico (VEI: $54,3 \pm 3,2$; CVC: $272,3 \pm 19,1$), núcleo supra-quiasmático (VEI: $59,0 \pm 4,4$; CVC: $129,3 \pm 20,9$), hipotálamo ventromedial (VEI: $25,3 \pm 1,8$; CVC: $181,0 \pm 44,8$), hipotálamo dorsomedial (VEI: $25,3 \pm 3,3$; CVC: $68,3 \pm 10,3$), hipotálamo lateral anterior (VEI: $29,7 \pm 5,5$; CVC: $50,7 \pm 2,0$), e região ventrolateral (VEI: $32,7 \pm 2,6$; CVC: $137,7 \pm 29,1$), dorsal (VEI: $29,3 \pm 6,4$; CVC: $150,7 \pm 48,0$) e lateral (VEI: $11,7 \pm 2,3$; CVC: $85,0 \pm 17,4$) da matéria cinzenta periaquedutal, amígdala medial (VEI: $33,0 \pm 3,8$; CVC: $249,3 \pm 65,3$) e central (VEI: $42,7 \pm 8,4$; CVC: $154,0 \pm 7,4$), região ventral do leito da estria terminal (VEI: $53,3 \pm 5,9$; CVC: $162,0 \pm 18,0$), núcleo paraventricular talâmico (VEI: $58,7 \pm 10,4$; CVC: $141,0 \pm 19,7$) e núcleo acumbens (VEI: $58,7 \pm 10,4$; CVC: $141,0 \pm 19,7$). Após a contagem de células, não foram encontradas diferenças significativas nos seguintes núcleos: órgão vasculoso da estria terminal (VEI: $20,3 \pm 11,9$; CVC: $48,7 \pm 15,9$), núcleo supra-óptico (VEI: $53,3 \pm 6,5$; CVC: $55,0 \pm 12,5$) e a amígdala basolateral (VEI: $20,7 \pm 3,4$; CVC: $55,0 \pm 16,0$). As figuras 9, 10, 11 e 12 ilustram esses resultados.

Os resultados demonstraram que 30 minutos após microinjeções de 300 µg de CVC houve aumento no número de células FOS-IR no grupo experimental dos seguintes núcleos: núcleo supra-óptico (VEI: $31,3 \pm 5,8$; CVC: $79,2 \pm 10,7$), núcleo supra-quiasmático (VEI: $40,3 \pm 6,2$; CVC: $115,0 \pm 18,5$), hipotálamo ventromedial (VEI: $26,3 \pm 3,7$; CVC: $63,0 \pm 9,9$), hipotálamo dorsomedial (VEI: $17,7 \pm 4,5$; CVC: $78,7 \pm 6,4$), hipotálamo lateral anterior (VEI: $45,3 \pm 8,8$; CVC: $94,3 \pm 9,0$), e região ventrolateral (VEI: $13,0 \pm 8,0$; CVC: $62,7 \pm 2,0$), dorsal (VEI: $8,0 \pm 4,6$; CVC: $57,7 \pm 3,8$) e lateral (VEI: $15,7 \pm 6,8$; CVC: $57,3 \pm 17,4$) da matéria cinzenta periaquedutal, amígdala medial (VEI: $34,0 \pm 11,2$; CVC: $107,0 \pm 9,9$), central (VEI: $21,7 \pm 1,5$; CVC: $111,8 \pm 15,3$) e basolateral (VEI: $17,7 \pm 4,7$; CVC: $67,7 \pm 4,7$), núcleo paraventricular talâmico (VEI: $38,3 \pm 6,4$; CVC: $69,5 \pm 1,8$) e núcleo acumbens (VEI: $21,0 \pm 5,0$; CVC: $65,0 \pm 7,0$). Após a contagem de células, não foram encontradas diferenças significativas nos seguintes núcleos: área pré-óptica medial (VEI: $41,7 \pm 10,5$; CVC:

61,2 ± 22,8), núcleo pré-óptico mediano (VEI: 98,3 ± 41,4; CVC: 135,0 ± 27,5), órgão vasculoso da estria terminal (VEI: 52,3 ± 14,7; CVC: 106,0 ± 28,9), núcleo paraventricular hipotalâmico (VEI: 21,3 ± 11,7; CVC: 41,3 ± 6,1) e núcleo da estria terminal (VEI: 48,7 ± 7,7; CVC: 58,0 ± 13,7). As figuras 8, 9, 10 e 11 ilustram esses resultados.

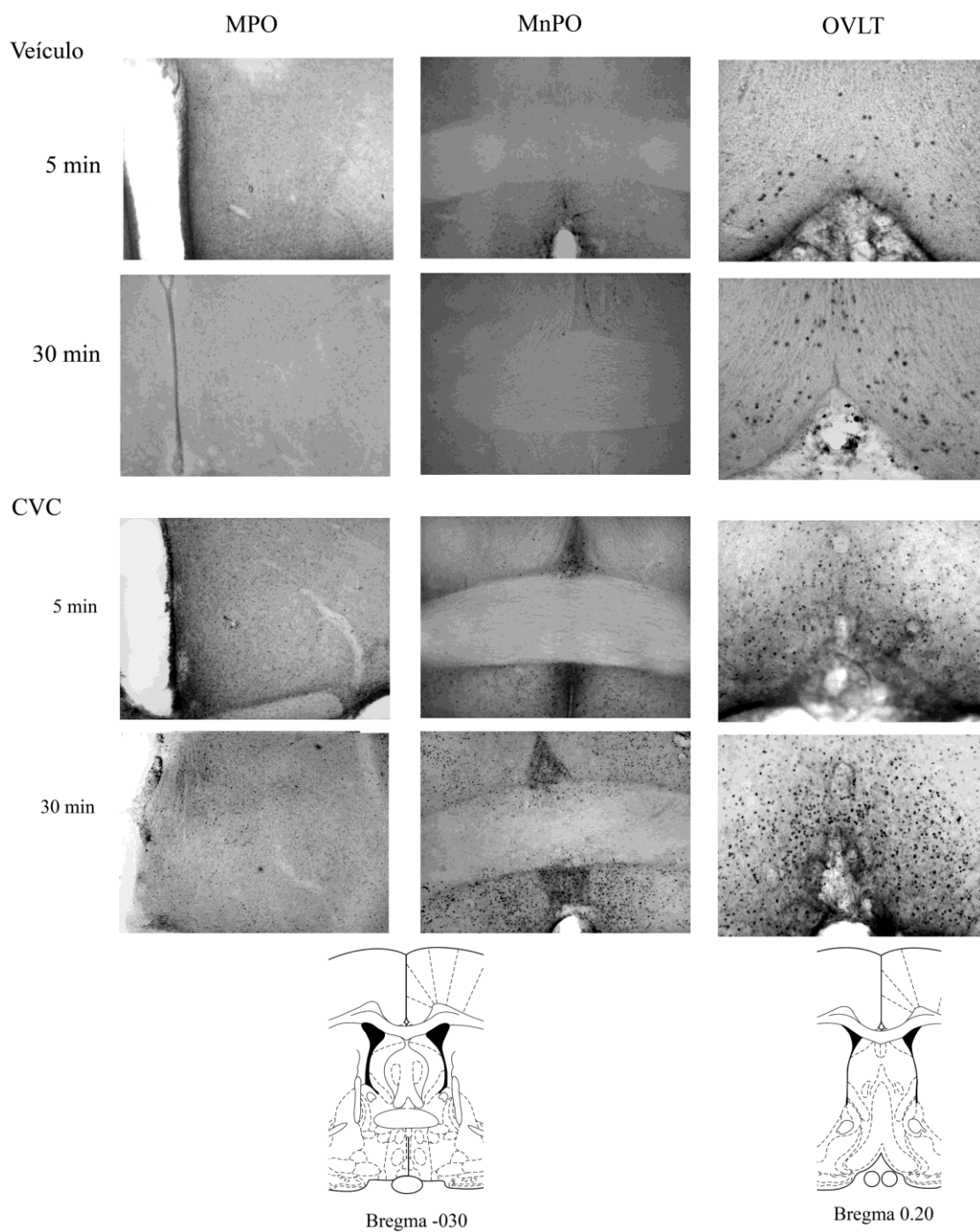


Figura 9. Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS no núcleos pré-óptico mediano e órgão vascular da lâmina terminal, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. A delimitação das áreas foi de acordo com as coordenadas estereotáticas de Paxinos (PAXINOS e WATSON, 1998).

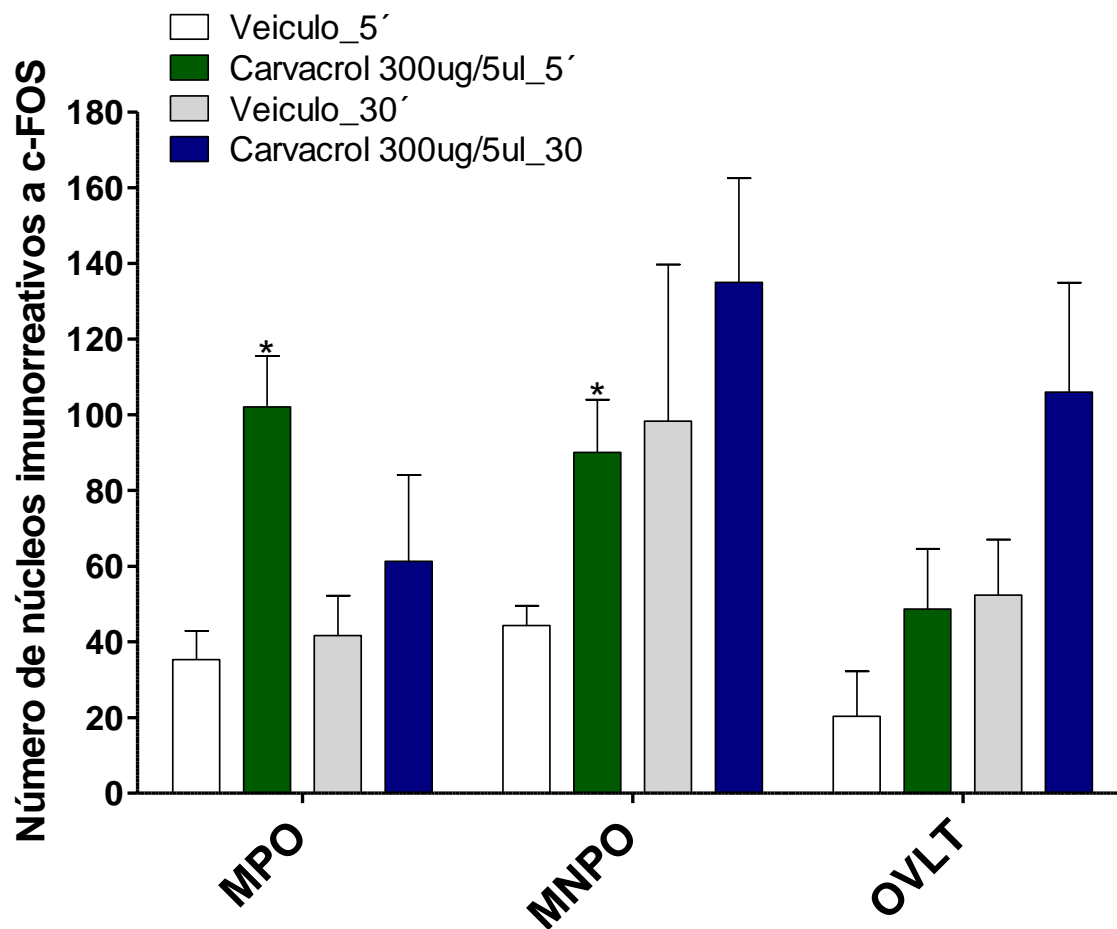


Figura 10. Efeito de microinjeções de 300 μ g de CVC no VL no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos pré-óptico medial, pré-óptico mediano e órgão vasculoso da lâmina terminal, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student entre os diferentes tratamentos no mesmo tempo de ação da droga. (*) Representa valor de $p < 0,05$.

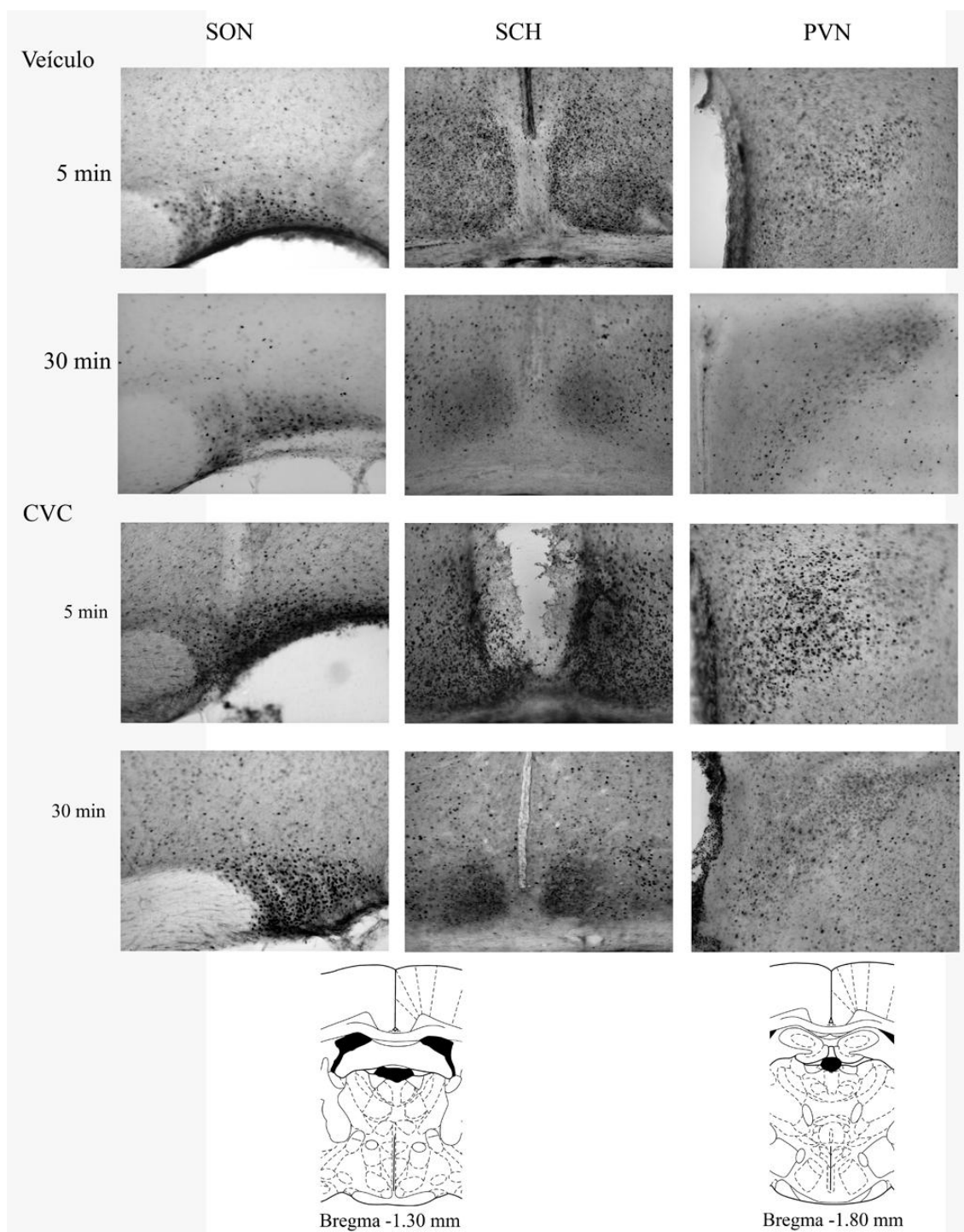


Figura 11. Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 μ g de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos supra-óptico, supraquiasmático e paraventricular hipotalâmico respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. A delimitação das áreas foi de acordo com as coordenadas estereotóxicas de Paxinos (PAXINOS & WATSON, 1998).

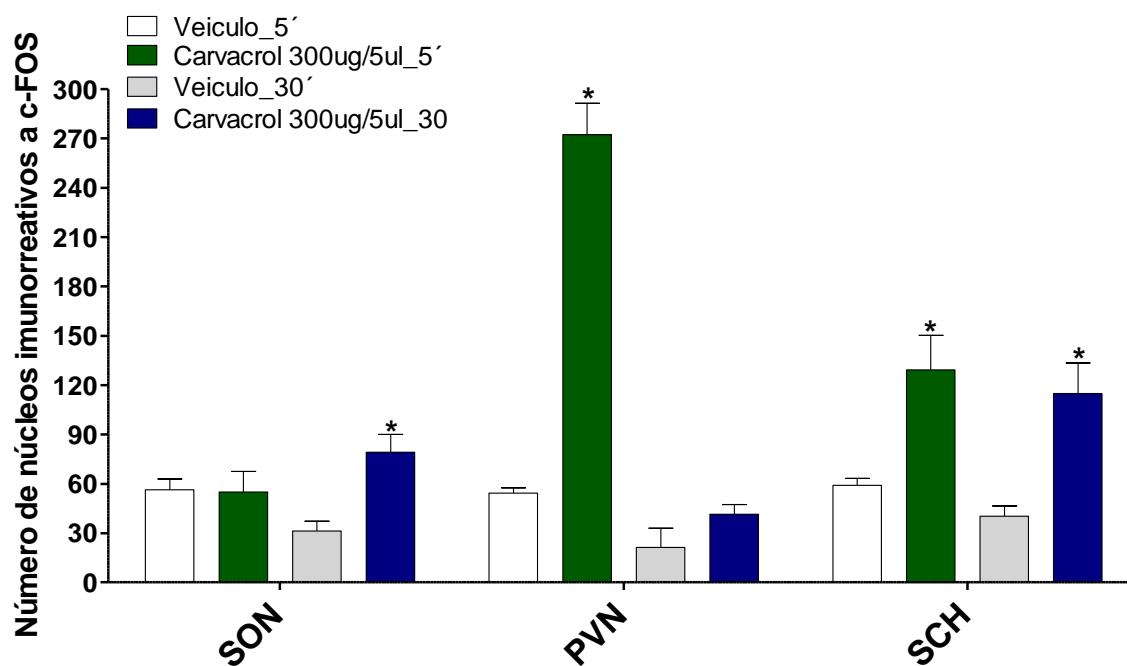


Figura 12. Efeito de microinjeções de 300 μ g de CVC no VL no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos supra-óptico, paraventricular hipotalâmico e supraquiasmático, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student entre os diferentes tratamentos no mesmo tempo de ação da droga. (*) Representa valor de $p < 0,05$.

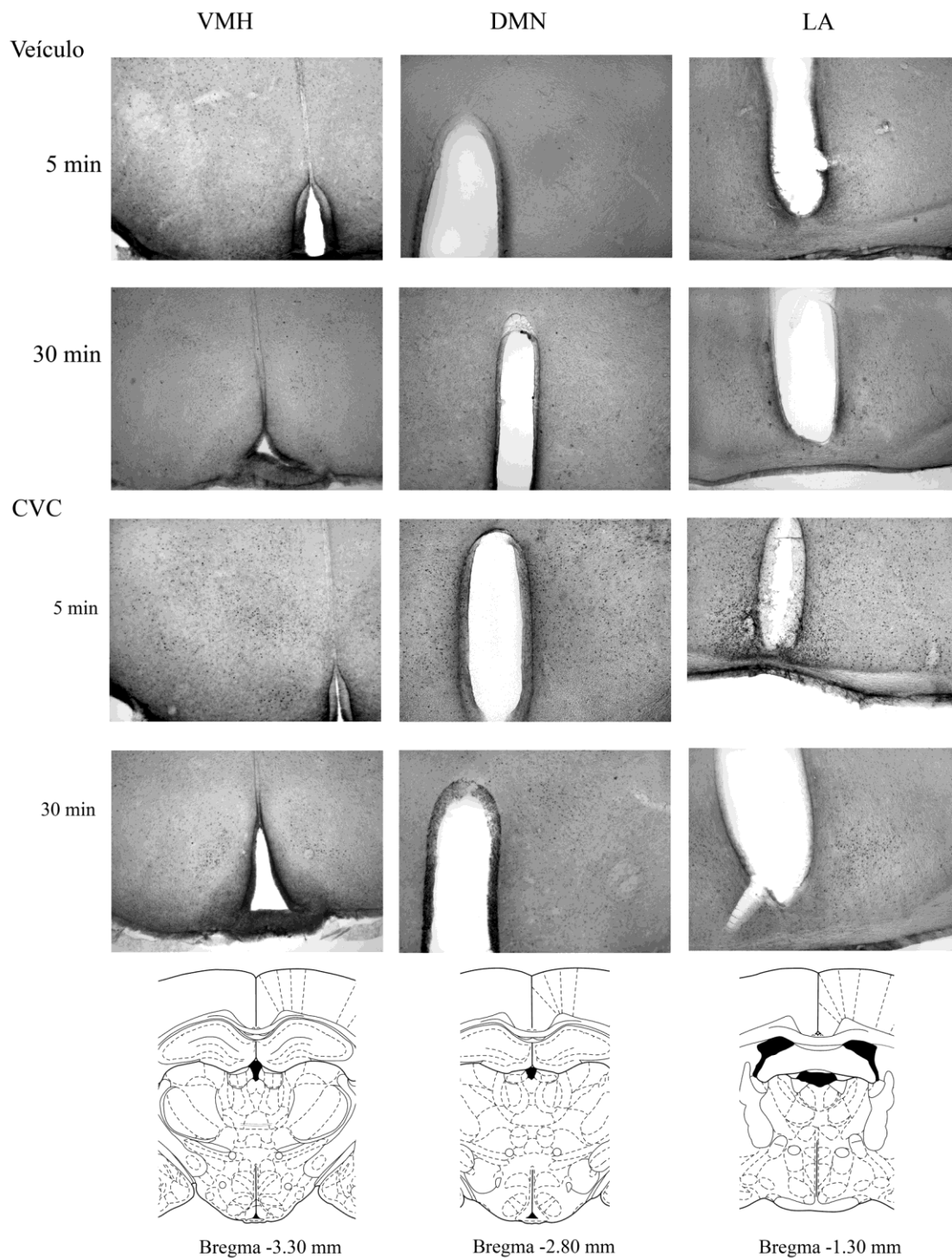


Figura 13. Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 μ g de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos ventromedial, dorsomedial e hipotálamo lateral anterior, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. A delimitação das áreas foi de acordo com as coordenadas estereotáticas de Paxinos (PAXINOS e WATSON, 1998).

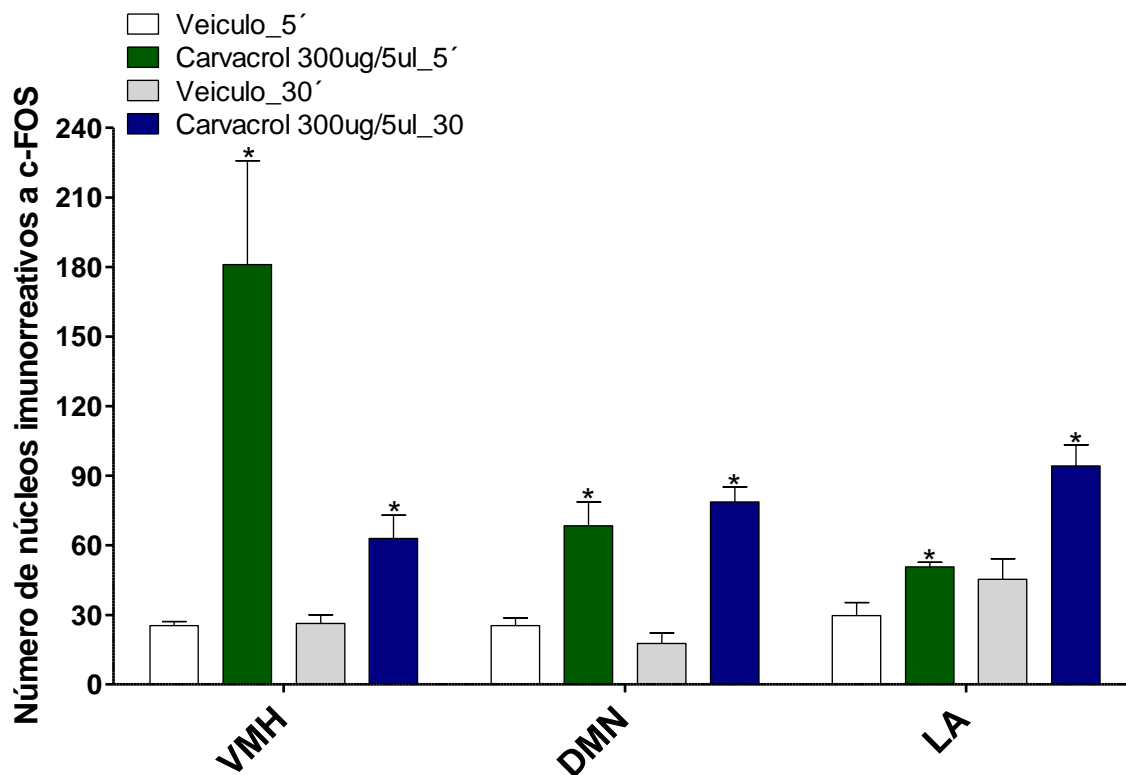


Figura 14. Efeito de microinjeções de 300 μ g de CVC no VL no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos ventromedial, dorsomedial e hipotálamo lateral anterior, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student entre os diferentes tratamentos no mesmo tempo de ação da droga. (*) Representa valor de $p < 0,05$.

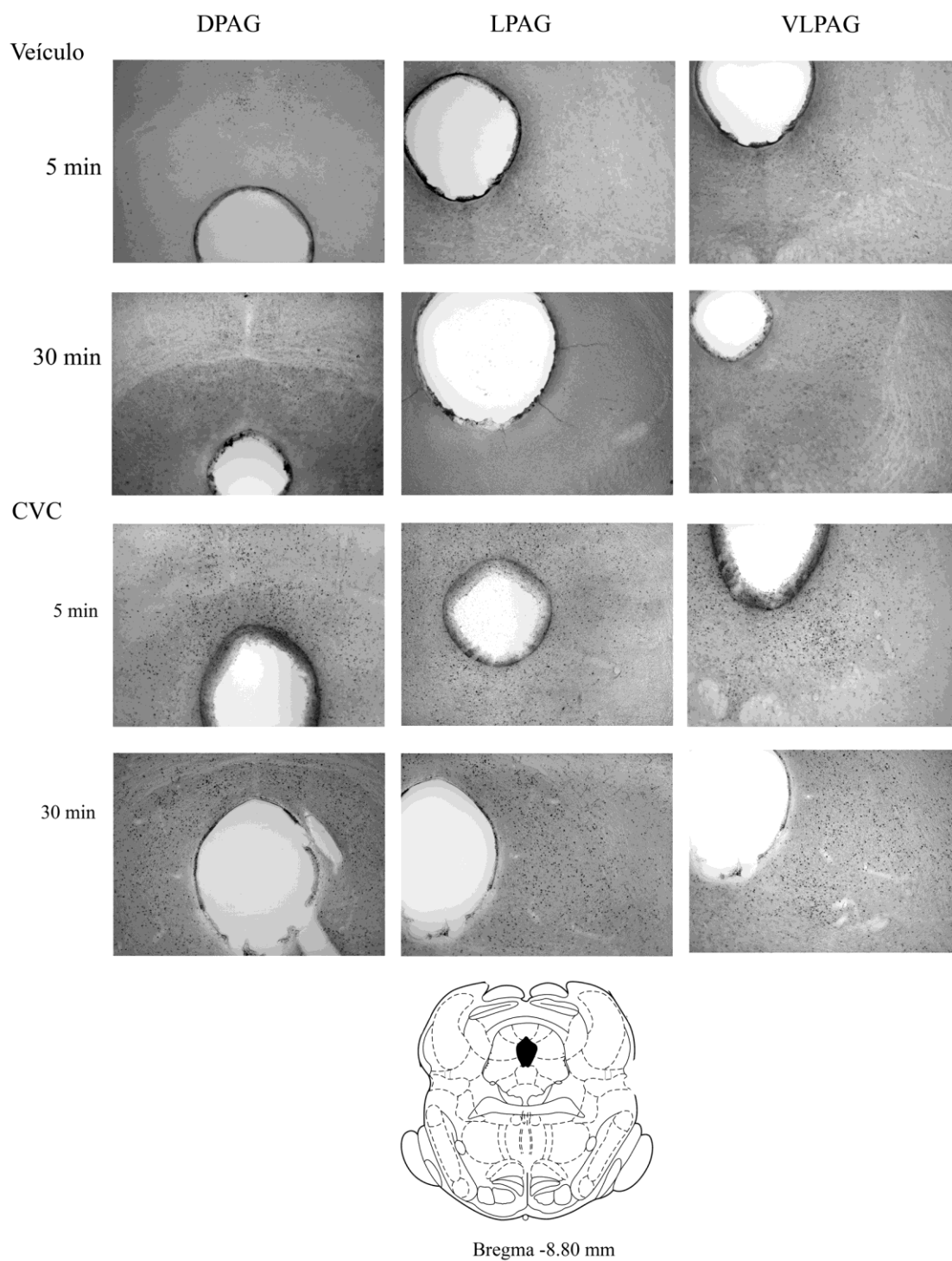


Figura 15. Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 μ g de CVC no número de células imunorreativas a FOS na matéria cinzenta periaquedutal, regiões dorsal, lateral e ventrolateral, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. A delimitação das áreas foi de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos (PAXINOS e WATSON, 1998).

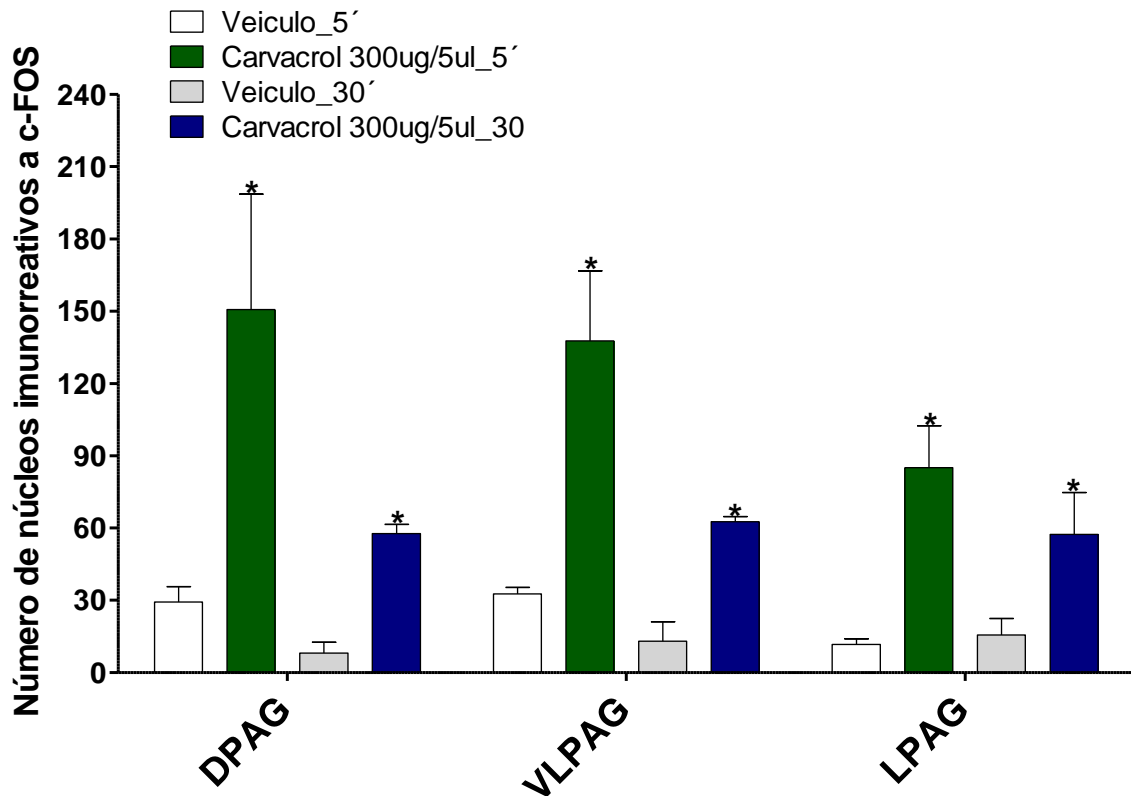


Figura 16. Efeito de microinjeções de 300 μ g de CVC no VL no número de células imunorreativas a FOS na matéria cinzenta periaquedutal, regiões dorsal, ventrolateral e lateral, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student entre os diferentes tratamentos no mesmo tempo de ação da droga. (*) Representa valor de $p < 0,05$.

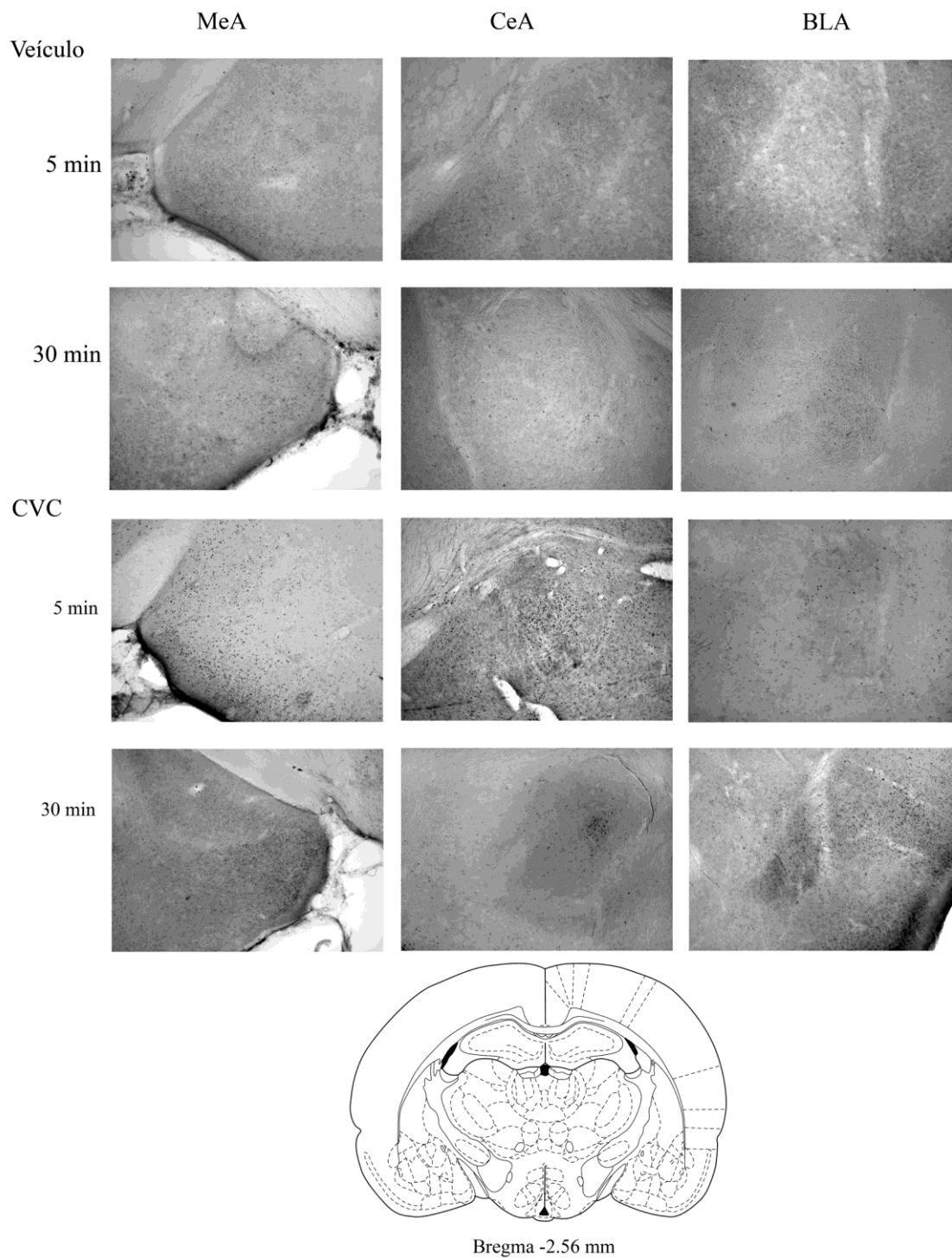


Figura 17. Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 μ g de CVC no número de células imunorreativas a FOS na amígdala, regiões medial, central e basolateral, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. A delimitação das áreas foi de acordo com as coordenadas estereotáticas de Paxinos (PAXINOS e WATSON, 1998).

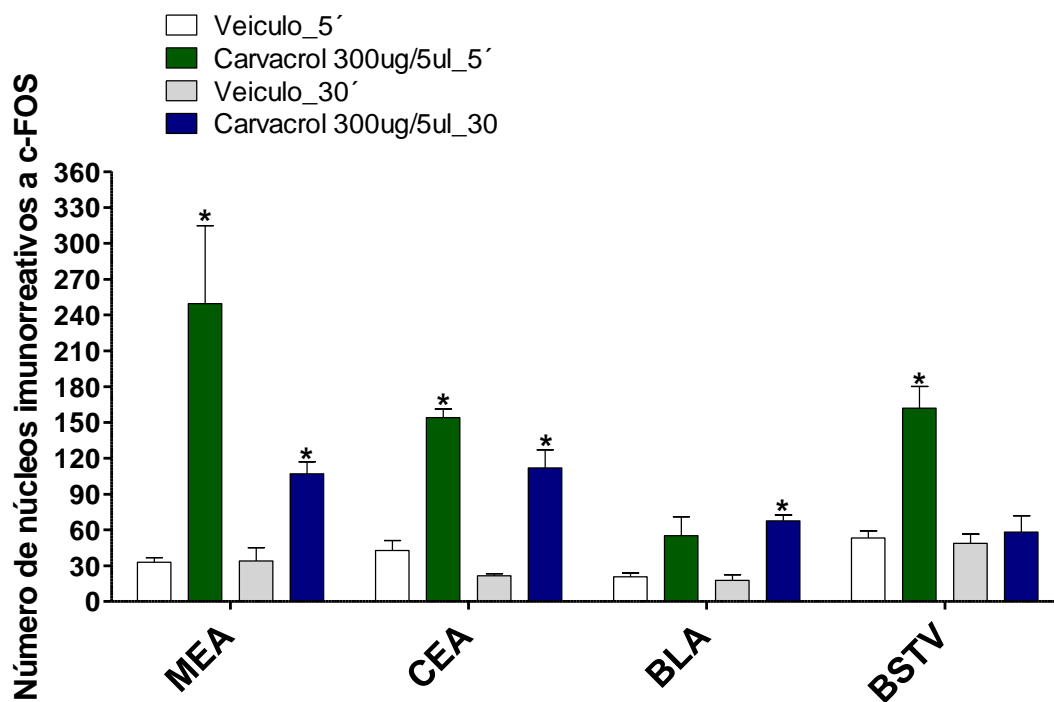


Figura 18. Efeito de microinjeções de 300 μ g de CVC no VL no número de células imunorreativas a FOS na amígdala, regiões medial, central e basolateral, bem como na região ventral do leito da estria terminal, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student entre os diferentes tratamentos no mesmo tempo de ação da droga. (*) Representa valor de $p < 0,05$.

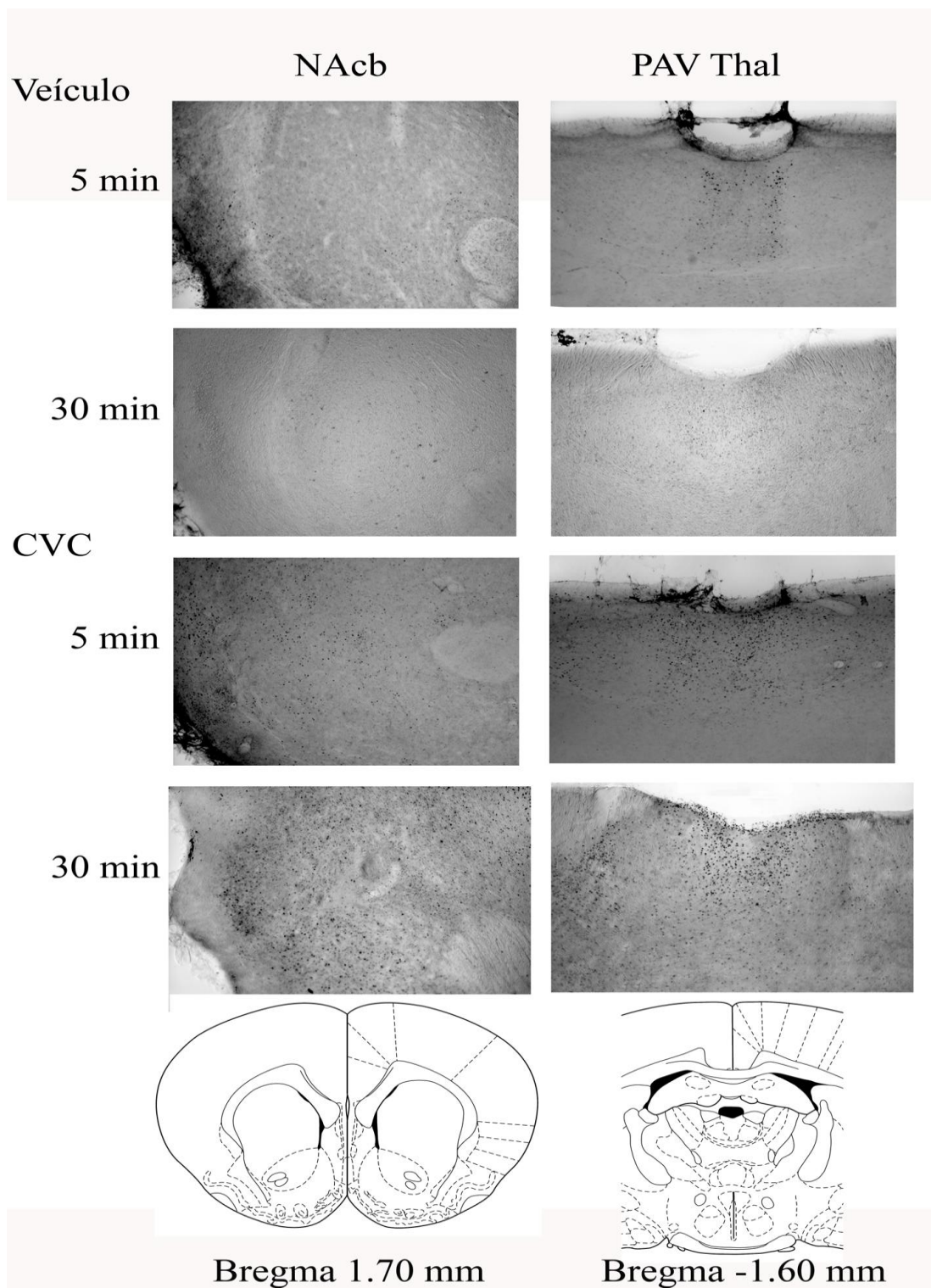


Figura 19. Efeito de microinjeções i.c.v. de 300 µg de CVC no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos acúmbens e paraventricular talâmico, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. A delimitação das áreas foi de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos (PAXINOS e WATSON, 1998).

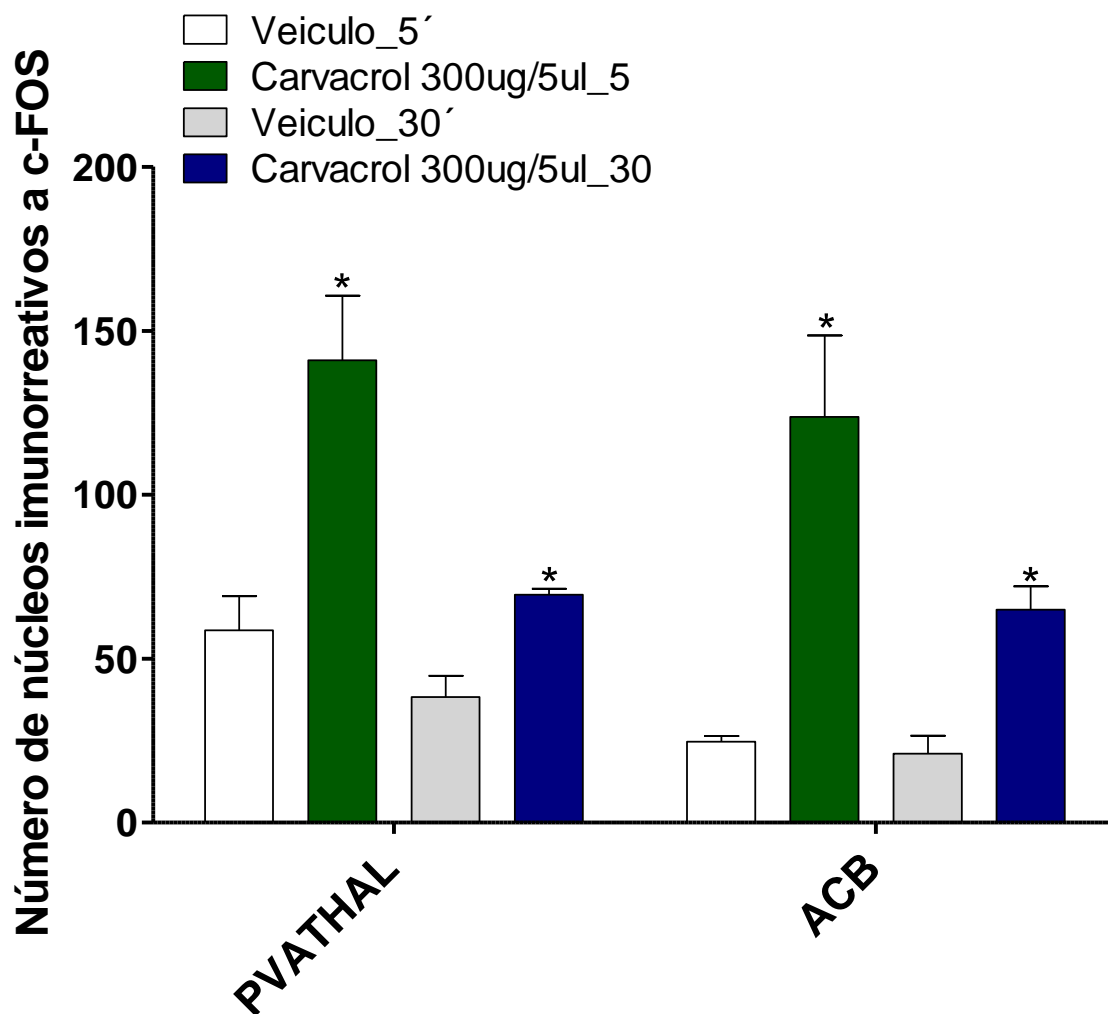


Figura 20. Efeito de microinjeções de 300 μ g de CVC no VL no número de células imunorreativas a FOS nos núcleos paraventricular talâmico e acúmbens, respectivamente, 5 e 30 minutos após administração da droga. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t de Student entre os diferentes tratamentos no mesmo tempo de ação da droga. (*) Representa valor de $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a microinjeção de carvacrol no VL promove significativa inibição do apetite por sódio em ratos depletados deste íon, não altera a ingestão hídrica em ratos privados de água e reduz os níveis de ansiedade no LCE tanto 5 minutos como 30 minutos após a microinjeção. Esses efeitos independem da atividade locomotora dos ratos, uma vez que no teste do campo aberto a atividades dos animais tratados com carvacrol foi semelhante ao grupo controle. Estas alterações comportamentais são acompanhadas de alterações da atividade neuronal em diferentes áreas cerebrais, incluindo núcleos hipotalâmicos (VMH, PVN, MnPO, SCH e SON), talâmicos (PVATHAL), matéria cinzenta periaquedutal (DPAG, VLPAG e LPAG) e zonas corticais (ACB, CEA, MEA e BLA).

O carvacrol é um dos constituintes do óleo essencial de orégano e tem sido demonstrado que a administração intraperitoneal do extrato desta planta em camundongos e ratos inibe a monoamina oxidase (MAO) e aumenta a disponibilidade de serotonina e noradrenalina no hipocampo e em outras estruturas corticais (MECHAN et al., 2011). No presente estudo, verificamos que microinjeções no VL de CVC em diferentes concentrações inibe a ingestão de Na⁺ em ratos depletados deste íon. Diversos estudos têm demonstrado que a transmissão serotoninérgica possui papel inibitório no apetite por sódio. A administração periférica de agonistas dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} reduz a ingestão de salina hipertônica em ratos desidratados ou depletados de sódio (COOPER et al., 1988; NEIL e COOPER, 1989; BADAUÊ-PASSOS et al., 2003). Castro e colaboradores (2003) demonstraram que a administração i.c.v. de agonistas 5-HT_{2C} e 5-HT₃ em ratos também promove resultados semelhantes (CASTRO et al., 2003). Por outro lado, a administração intraperitoneal de antagonistas 5-HT₂ aumenta a ingestão de salina hipertônica em ratos depletados deste íon (ROUAH-ROSILIO et al., 1994). Lima demonstrou que a depleção serotoninérgica induzida pela administração periférica de PCPA (300mg/kg, i.p., durante dois dias) aumenta a ingestão de sódio em ratos depletados deste íon (LIMA et al., 2003). No presente estudo administramos PCPA no VL em dose única e em menor concentração do que foi utilizado pelo grupo de Lima, de acordo com trabalhos prévios (REIS et al., 1994; HRITCU et al., 2007).

Nossos experimentos demonstraram que a depleção prévia de serotonina foi capaz de reverter o efeito antinatriorexigênico do CVC. Os estudos de Mechan mostram que o carvacrol inibe a recaptação e degradação da serotonina. Assim podemos supor que uma das formas de atuação do CVC na inibição do apetite por sódio pode ser mediado pelo aumento dos níveis de serotonina disponíveis, promovendo maior neurotransmissão desta via em áreas cerebrais específicas que levam à inibição deste comportamento. A serotonina possui um papel modulatório do apetite por sódio no complexo amigdalóide, aumentando ou diminuindo o apetite por sódio dependendo do tipo de receptor estimulado (LUZ et al., 2006; 2007). No presente estudo demonstramos aumento da ativação celular na CeA, MeA e BLA pelo CVC. Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que a serotonina atua via receptores 5-HT₃ nestas áreas inibindo o apetite por sódio (CASTRO et al., 2003). Desta forma, nossos resultados sugerem que o CVC pode estar atuando a partir desta via específica na inibição da ingestão de salina hipertônica, mas estudos futuros são necessários para confirmar essa hipótese.

O BNST possui em sua região ventral e lateral neurônios que recebem informações gustatórias do circuito NTS/PBN (NORGREN e LEONARD, 1971; NORGREN e PFAFFMANN, 1975; HERBERT et al. 1990). Desta forma, a amígdala estendida constitui parte do circuito das vias gustatórias ascendente, e está envolvida na modulação de respostas relacionadas ao apetite por substâncias específicas como o sal, desde que lesões envolvendo o BST produzem déficits substanciais na ingestão de sódio (REILLY et al., 1994; ZARDETTO-SMITH et al., 1994). De acordo com Johnson, a via inibitória do apetite que se origina no AP/NTS alcança o PBN através de neurotransmissão serotoninérgica com o objetivo de prevenir o excesso da ingestão de sódio, regulando a resposta do BNST (JOHNSON et al., 1999). Nossos resultados demonstraram ativação neuronal no BNST pelo CVC, sendo também possível que o CVC, pelo aumento da ativação serotoninérgica e noradrenérgica, altere a atividade do BNST. Dessa forma a modulação monoaminérgica do CVC neste núcleo pode participar na modulação do apetite por sódio observado no presente estudo.

A vasopressina é sintetizada por um subconjunto de células MNCs localizadas no PVN e SON do hipotálamo. Essas células projetam seus axônios para a neurohipófise, onde o hormônio é estocado e liberado quando ocorrem potenciais de ação que estimulam o influxo e a exocitose de Ca⁺² através dos canais dependentes de

voltagem (BICKNELL, 1988; FISHER e BOURQUE, 2001). Estudos demonstraram uma correlação positiva entre disparos de potenciais de ação de MNCs e osmolalidade do ECF (WAKERLEY et al., 1978; BOURQUE, 1998). Os disparos neuronais de MNCs sob condições de repouso regulam a secreção basal de VP, enquanto que a diminuição ou o aumento da frequência de disparos resultam respectivamente na inibição e no aumento da liberação do hormônio durante hipotonicidade e hipertonicidade do ECF (BRIMBLE et al., 1978; BOURQUE, 1998).

Tem sido sugerido que o circuito PVN-LPBN processa e integra informações que controlam o balanço de sódio. Um estudo reportou que a lesão seletiva de neurônios parvocelulares do PVN através da administração de ácido cainico (18 pmol) reduziu em 59% a descarga do nervo simpático renal durante expansão isotônica corporal (10%) em ratos (HASELTON et al., 1994) e um trabalho adicional em coelhos mostrou que a ativação do PVN é capaz de modificar o padrão de descargas simpáticas no rim, baço, glândula suprarrenal e coração (DEERING e COOTE, 2000). Outro estudo demonstrou que microinjeção de prazosina no PVN inibiu a ingestão de sódio após a administração de ANGII em ratos, sugerindo que a ativação de vias $\alpha 1$ -adrenérgicas neste núcleo estimula o apetite por sódio (CAMARGO e SAAD, 2001). Nossos resultados demonstraram que o CVC também atua por mecanismos adrenérgicos, uma vez que microinjeções prévias de prazosina no VL diminuíram de modo dose dependente o efeito antinatriorexigênico do CVC, e a investigação imunohistoquímica revelou o aumento da atividade neuronal no PVN em até 5x após a administração de CVC. Dessa forma, é possível que o PVN participe da modulação do apetite por sódio desencadeado pelo CVC, e estudos futuros poderão melhor descrever qual o tipo de interação este composto estabelece com receptores adrenérgicos.

Estudos em mamíferos demonstraram que a hiperosmolalidade do ECF estimula a sensação de sede, promove a busca por água, e libera a vasopressina (VP) com o objetivo de aumentar a reabsorção hídrica pelos rins (DUNN et al., 1973; MCKINLEY et al., 1978; THRASHER et al., 1980). A hiperosmolalidade resultante de infusões de soluções hipertônicas de NaCl na artéria carótida aumentam as taxas de natriurese em mamíferos (BLAINE et al., 1975; MCKINLEY et al., 1992; EMMELUTH et al., 1996), cujo efeito em ratos é mediado parcialmente pela liberação da ocitocina na corrente sanguínea (BRIMBLE e DYBALL, 1977). A liberação de ocitocina também está associada à inibição do apetite por sal nesses animais (BLACKBURN et al., 1993;

1995). Também foi registrado que infusões intravenosas de soluções hipotônicas reduzem a sede em humanos desidratados (MARESH et al., 2001). Outro estudo complementar demonstrou que a atividade elétrica basal dos neurônios hipotalâmicos liberadores de ocitocina é inibida em condição de hiposmolalidade, reduzindo a natriurese e estimulando o apetite por sal (BRIMBLE e DYBALL, 1977).

O fato de haver um controle das respostas osmorregulatórias implica no fato de existirem mecanismos sensoriais capazes de detectar as alterações osmóticas. Os osmorreceptores são definidos como neurônios dotados de habilidade intrínseca para detectarem mudanças na osmolalidade do ECF. Por definição, os neurônios osmorreceptores devem ser capazes de detectar diferenças na osmolalidade do ECF a partir dos níveis basais e codificar essa informação em sinais elétricos que persistem mesmo durante perturbações prolongadas. Estudos conduzidos em células isoladas de regiões cerebrais específicas têm sugerido que neurônios do OVLT e do órgão subfornical (ANDERSON et al., 2000), assim como as células neurosecretoras magnocelulares (MNCs) do núcleo supra-óptico (SON) (OLIET e BOURQUE, 1992; 1993) devem operar como osmorreceptores intrínsecos. Estudos com neurônios osmorreceptores demonstraram que a maioria dessas células é ativada durante estímulo hipertônico e inibidas por estímulo hiposmótico (BOURQUE, 1989). Registros hipotalâmicos revelaram que o estímulo hiperosmótico aumenta as taxas de disparo de potenciais de ação de MNCs (MASON, 1980), e que esse efeito é causado pela geração de correntes catiônicas não seletivas (BOURQUE, 1989; QIU et al., 2004). Esses resultados foram confirmados por estudos com MNCs isolados do SON de ratos (OLIET e BOURQUE, 1992), e trabalhos adicionais revelaram que estímulo hiposmótico inibe os disparos desses neurônios através da hiperpolarização da membrana (OLIET e BOURQUE, 1993; 1993). A atividade elétrica do SON é aumentada após estimulação hiperosmótica do OVLT (RICHARD e BOURQUE, 1992), e esse fenômeno ocorre mais precisamente nas células magnocelulares, que controlam a produção hormonal na hipófise. Um estudo demonstrou que células ocitocinérgicas do SON são ativadas após ingestão de salina hipertônica, sugerindo que esta via está envolvida no processamento de sinais hiperosmóticos, e que neurônios serotoninérgicos são ativados em condições de saciedade (GODINO et al., 2007). Trabalhos adicionais demonstraram que a administração oral de sertralina (inibidor seletivo de recaptação de serotonina) aumentou os níveis plasmáticos de ocitocina (DE MAGALHÃES-NUNES

et al., 2007), e que vias ocitocinérgicas hipotalâmicas também são ativadas em condições de saciedade (GODINO et al., 2010). Nós observamos que a microinjeção de CVC no VL ativa o SON e outros núcleos hipotalâmicos, sugerindo um papel destes núcleos no controle da ingestão de sódio induzida pelo CVC.

O tratamento prévio com PRA, antagonista específico dos receptores α 1-adrenérgicos, também foi capaz de reverter, de modo dose-dependente, o efeito inibitório do CVC no apetite por sódio. Um estudo demonstrou que microinjeções de PRA no LH foi capaz de reduzir a ingestão de água provocada pela administração i.c.v. de ANGII (SAAD et al., 2000), enquanto outro estudo demonstrou que a administração de PRA no LH registrou aumento da ingestão de salina hipertônica induzida por microinjeção de ANGII no SFO (ALMEIDA et al., 1999). Apesar de encontrarmos ativação de células no LH, não registramos qualquer efeito na ingestão de água. Diante das evidências, é possível que o CVC possa atuar no LH por vias α 1-adrenérgicas, diminuindo a ingestão de solução salina, mas estudos adicionais poderão elucidar melhor o papel dessas células ativadas no efeito antinatriorexigênico do CVC.

As células osmorreceptoras parecem ser ativadas por canais osmossensíveis. O primeiro indício da identidade molecular de canais transdutores osmossensíveis surgiu da descoberta do gene *osm-9*, um gene que é mutante em linhagens de *C. elegans*, que leva à deficiência da resposta de evitar soluções hiperosmóticas. Este canal é codificado por um membro da superfamília de canais receptores de potencial transitório (TRPC) (NILIUS et al., 2007). Os genes que codificam os TRP em mamíferos são ortólogos do gene *osm-9* do *C. elegans* (COLBERT et al., 1997). Neurônios osmosensoriais no OVLT expressam TRPV1 e TRPV4 (LIEDTKE et al., 2000; CIURA e BOURQUE, 2006), e as células magnocelulares do SON expressam TRPV1 e TRPV2 (WAINWRIGHT et al., 2004; HOLLIS et al., 2008). Quando transfectados para células heterólogas, os receptores TRPV2 e TRPV4 formam canais iônicos que podem ser ativados em condição de hiposmolaridade (LIEDTKE et al., 2000; MURAKI et al., 2003).

Apesar de se conhecer o efeito do CVC em alguns dos receptores, ainda não se sabe qual o perfil farmacológico que o CVC possui frente a todos os membros da família TRP. É sabido que receptores TRPV2 e TRPV4 podem estar envolvidos na osmossensibilidade, uma vez que são ativados após estímulo hiposmótico (MURAKI et

al., 2003; LIEDTKE et al., 2000; STROTMANN et al., 2000). Um estudo observou que camundongos *knockout* TRPV4^{-/-} não promove sede e liberação de vasopressina em resposta a estímulos osmóticos, e a ativação neuronal (FOS) do OVLT que normalmente é encontrada em condições hiperosmóticas é significativamente reduzida nestes animais (LIEDTKE e FRIEDMAN, 2003). Outro estudo observou que neurônios do OVLT de camundongos *knockout* TRPV1^{-/-} não possuem a capacidade de responderem a estímulos hipertônicos *in vitro* (CIURA e BOURQUE, 2006). A partir destas evidências, autores têm sugerido que a expressão de canais da família TRPV é fundamental para a osmossensibilidade dessas células, da mesma forma que foi demonstrado sua relevância para as células MNCs no SON (SHARIF-NAENI et al., 2006). Uma evidência desta hipótese está no fato de que a resposta de neurônios do OVLT a estímulo hipertônico pode ser bloqueada através da administração do vermelho rutênio, um inibidor genérico de canais TRPV (RAMSEY et al., 2006). Respostas mediadas por canais TRPV4 são maiores em condições hiposmóticas e menores em condição hiperosmótica (GULER et al., 2002), e tem sido reportado que a administração de numerosas drogas estabilizadoras de humor e antidepressivas pode resultar em estado hiposmótico por indução de hiponatremia (MADHUSOODANAN et al., 2002) ativando assim a sinalização via TRPV4. Essa hiponatremia também pode ser provocada por ISRS (WRIGHT e SCHROETER, 2008). Mais estudos são necessários para melhor caracterizar o perfil farmacológico do CVC frente aos receptores TRPV. É possível que o CVC possa modular o apetite por sódio alterando as propriedades dos canais osmossensíveis em regiões circunventriculares, mas esta hipótese necessita ser testada.

O núcleo accumbens (NAc) possui um papel relevante no circuito neural de comportamentos motivados, mas ainda é pouco conhecido sobre os mecanismos específicos que influenciam no comportamento consumatório de alimentos (WIRTSHAFTER et al., 2012). Diversos estudos demonstram que a ativação de vias GABAérgicas com o uso de agonistas promove o aumento da ingestão de alimentos (BASSO e KELLEY, 1999; REYNOLDS e BERRIDGE, 2002; STRATFORD e KELLEY, 1997; STRATFORD e WIRTSHAFTER, 2011), mas a administração de muscimol (agonista de receptores GABA_A) no Acb não modificou a ingestão de salina hipertônica em ratos depletados deste íon. Também sabe-se que o NAc é ativado durante atividades prazerosas (WERME et al., 2002). Estudos sugerem que o aumento

do nível extracelular de dopamina nesta região está envolvido com o aspecto motivacional (WAISE, 2004), e trabalhos com microdiálise demonstraram aumento desses níveis em ratos depletados de sódio após ingestão de salina hipertônica (HOEBEL et al., 1989). Evidências apontam que o CVC pode modular vias GABAérgicas (MELO et al., 2009) e dopaminérgicas (ZOTTI et al., 2013) e estudos futuros são necessários para confirmar qual subtipo neuronal está sendo ativado neste núcleo.

Algumas evidências têm demonstrado que o carvacrol modula a atividade de canais TRP. Evidências sugerem que o CVC ativa canais TRPV3, relacionados à termosensibilidade (XU et al., 2006; LOWRY et al., 2009), e um estudo demonstrou que CVC promove 265% mais corrente em canais TRPV3 do que a cânfora, um dos primeiros agonistas conhecidos para este canal, sendo um dos mais potente ligante dentre 33 terpenos testados (VOGT-EISELE et al., 2007). De fato, alguns estudos já empregam CVC como agonista destes receptores (PETROCELLIS et al., 2012). Contudo, um estudo demonstrou que o CVC não exerce qualquer efeito em canais TRPV1 (XU et al., 2006). Apesar do canal TRPV1 possuir forte relação na modulação da ansiedade, alguns trabalhos tem elucidado a relação entre os canais TRPV3 na regulação emocional, uma das formas pela qual o CVC pode estar exercendo seu efeito ansiolítico (MOUSSAIEFF et al., 2013). Estudos têm investigado a relação entre receptores TRPV3 e serotonina no SNC. Um trabalho constatou que a região interfascicular da rafe dorsal (DRI) possui uma subpopulação de neurônios serotoninérgicos termosensíveis que apresentam propriedades eletrofisiológicas e correlatos comportamentais únicos (RASMUSSEM et al., 1984). Tem sido sugerido que essas células possuem receptores do tipo TRPV3 e TRPV4, e que a desregulação dessa população neuronal possui papel relevante em transtornos neuropsiquiátricos relacionados ao estresse, como a ansiedade (LOWRY et al., 2009).

Alguns poucos trabalhos têm documentado que canais TRPV3 são largamente distribuídos no cérebro de mamíferos. Dentre as regiões identificadas estão o hipotálamo, tálamo e estriado, além de ampla distribuição cortical (XU et al., 2002; VORONOVA et al., 2012). Um estudo recente demonstrou que o acetato de incensol, administrado perifericamente em camundongos, resulta em efeito ansiolítico e antidepressivo. Experimentos para detecção de FOS deste diterpeno demonstrou ativação da Cea, PVN, BNSTv e BNSTd. O destaque deste estudo reside no fato de que

camundongos *knockout* de receptores TRPV3 não demonstraram qualquer diferença nos testes do nado forçado e da cruz elevada após receberem injeções do terpeno, sugerindo que este receptor possui um papel na regulação emocional (MOUSSAIEFF et al., 2008). No presente estudo demonstramos que microinjeções i.c.v. de CVC ativa CEA, PVN e BNSTv, sugerindo que estas áreas podem estar envolvidas na atividade ansiolítica promovida pelo CVC, e estudos futuros poderão avaliar a possível modulação de canais TRPV3 pelo CVC.

Canais do tipo TRPV1 (canais iônicos com maior afinidade para cálcio e magnésio, em detrimento do sódio) são ativados pela capsaicina, e estão associados à nocicepção, regulação térmica corporal, micção dentre outras funções (MORAN et al., 2011). Adicionalmente, esses canais são expressos em áreas cerebrais associadas com o controle de respostas emocionais, como o hipocampo, córtex pré-frontal medial, lócus ceruleus e periaqueduto dorsolateral (PAG) (MEZEY et al., 2000; TOTH et al., 2005), e alguns trabalhos têm evidenciado seu papel na ansiedade. Em 2004, Kaschow e colaboradores divulgaram as primeiras evidências do efeito ansiogênico observado após administração de olvanil (agonista TRPV1) e o efeito ansiolítico da capsazepina (antagonista TRPV1) no teste EPM em ratos (KASCKOW et al., 2004). Diferentes estudos também encontraram efeito ansiolítico após administração deste antagonista no hipocampo ventral (SANTOS et al., 2008), PAG (TERZIAN et al., 2009) e córtex pré frontal (RUBINO et al., 2008). No último estudo citado, os autores reportaram ainda que microinjeções de capsaicina no córtex pré-frontal teve efeito ansiogênico. Trabalhos realizados com camundongos *knockout* para TRPV1 reportaram redução da ansiedade e do condicionamento ao medo nos testes da caixa claro-escuro e no EPM (MARSCH et al., 2007). Finalmente, um trabalho recente demonstrou que a inibição hipocampal (CA1) dos receptores TRPV1 (antagonista AMG9810) produziu efeito ansiolítico em ratos submetidos ao teste do EPM, enquanto que a microinjeção no mesmo local do agonista capsaicina resultou em efeito ansiogênico (HAKIMIZADEH et al., 2012). Todos esses achados sugerem que os receptores TRPV1 devem possuir um papel na modulação do controle da ansiedade no SNC.

Estudos tem demonstrado que a serotonina modula diferentes respostas (ansiolítica e ansiogênica) na PAG de acordo com a região e os receptores ativados. Após microinjeções de 5-HT na DPAG foi observado inibição do substrato neural da aversão (SCHUTZ et al., 1985). Adicionalmente, trabalhos demonstraram que

microinjeções de agonistas 5-HT₂ e 5-HT_{1A} promove efeito panicolítico no labirinto em T, com o emprego do último sendo também ansiolítico no mesmo teste (SOARES e ZANGROSSI-Jr, 2004; POBBE & ZANGROSSI-Jr, 2005). O mesmo grupo de pesquisas também observou efeito ansiolítico após ativação dessas mesmas vias na regial ventrolateral da PAG (SOARES e ZANGROSSI-Jr, 2009). No presente estudo CVC aumentou a atividade neuronal na PAG. É possível que o efeito ansiolítico observado do CVC possa ser reflexo do aumento da disponibilidade de monoaminas nesta região, e estudos futuros são necessários para compreender o desequilíbrio químico que o CVC promove nesta região.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, abrangendo entre 30% a 40% de todas as sinapses cerebrais. Os receptores do tipo GABA_A tem sido implicados na ansiedade, pois sua função é afetada diretamente pelos benzodiazepínicos, barbitúricos e etanol. Este receptor é composto por cinco subunidades, que se unem para formar um canal de cloreto, aberto após a ligação do GABA com o sítio do receptor. O sítio benzodiazepínico, presente nas subunidades α do canal, modula o receptor GABA_A, aumentando ou diminuindo a frequência de abertura dos canais de cloreto em resposta ao GABA. O sítio dos barbitúricos está presente no interior do canal, e em doses baixas, mantêm os canais abertos por mais tempo durante a ativação gabaérgica (GRAEFF e GUIMARÃES, 2012). Tem sido proposto que o CVC possui atividade ansiolítica após administração oral em camundongos, e que essa resposta é mediada por vias GABAérgicas (MELO et al., 2009).

A amígdala é parte do circuito responsável pela formação e armazenamento de memórias relacionadas ao medo (DAVIS 2000; LEDOUX 2000, 2007). Difere de outras áreas por sua baixa atividade neuronal exercido pelo denso controle de neurônios inibitórios (BORDI et al., 1993; PARE e COLLINS, 2000). Quando um sinal indica uma ameaça, o “silêncio” é rompido e os neurônios excitatórios ativam o circuito de defesa (QUIRK et al., 1995, REPA et al., 2001; EHRLICH et al.; 2009). A CeA é predominantemente composta por neurônios GABA locais, e sua inibição opera principalmente através dos receptores GABA_A α ₂ (MAROWSKY et al., 2004), um subtipo de receptor reconhecido por mediar a redução da ansiedade em tratamentos farmacológicos (LOW et al., 2000). Nossos resultados demonstraram que microinjeções de CVC promove intensa ativação da Cea, MeA e BLA sugerindo o

envolvimento dessas áreas na modulação do comportamento ansiolítico observado, mas estudos futuros são necessários para investigar quais subtipos neuronais estão sendo ativados nesses núcleos após microinjeções de CVC no VL.

Em roedores e primatas, a amígdala recebe densas aferências de vias serotoninérgicas, e manipulações experimentais dessas vias causam alterações comportamentais relacionadas com a ansiedade em modelos experimentais (MENARD e TREIT, 1999; LOWRY ET AL., 2005; BAUMAN & AMARAL, 2005; HENSLER 2006; CHRISTIANSON et al., 2010). Tem sido demonstrado que a administração aguda de inibidores seletivos da recaptação de serotonina está relacionada com o aumento da atividade da amígdala em humanos (MCKIE et al., 2005; DEL-BEN et al., 2005). Diversos estudos têm mostrado o envolvimento da amígdala, em particular a CeA, nos comportamentos relacionados ao medo e a ansiedade (LEDOUX 2000; LOWRY et al., 2005; RAINNIE et al., 2004; DAVIS et al., 2010; WANG et al., 2011). Estudo com lesão química (ácido ibotênico) da CeA mostraram que animais submetidos à estresse crônico possuem menor nível de cortisol no plasma quando comparados aos controles. Observou-se, ainda, que o grupo lesionado atenuou comportamentos associados à ansiedade no teste da cruz elevada, quando comparados com o grupo controle. Esses resultados reforçam que a CeA está associada a comportamentos relacionados ao medo, e revela a importância desta região na regulação da atividade do eixo HPA em comportamentos associados à ansiedade acionados pelo estresse (VENTURA-SILVA et al., 2013). No presente estudo demonstramos que a administração i.c.v. do CVC promove intensa ativação na CeA, sugerindo envolvimento desta área no efeito ansiolítico observado.

Estudos eletrofisiológicos têm relacionado medo e ansiedade com o aumento da atividade de neurônios da BLA (MANZANARES et al., 2005). Um estudo recente mostra correlação entre o aumento dos disparos de potenciais de ação em neurônios da BLA de camundongos e comportamentos ansiogênicos durante os testes do campo aberto e da cruz elevada (WANG et al., 2011). Estudos morfológicos em camundongos *knock out* correlacionaram o aumento da densidade de espinhas dendríticas em neurônios piramidais da BLA com a ausência dos transportadores 5-HTT, o que leva a maior nível de 5-HT na fenda sináptica (WELLMAN et al., 2007; NIETZER et al., 2011). Modelos de estresse têm relatado aumento da ansiedade em ratos submetidos ao teste da cruz elevada, juntamente com o aumento do número de espinhas dendríticas em

neurônios da BLA (MITRA et al., 2005), e um trabalho relatou que a espinogênese em neurônios da BLA causada por super-expressão transgênica do fator neurotrófico cerebral é acompanhado pelo aumento da ansiedade em camundongos (GOVINDARAJAN et al., 2006). Dessa forma, tem sido sugerido que a ação ansiogênica do tratamento agudo com inibidores da recaptação de 5-HT poderia estar relacionada com o aumento do número de espinhas dendríticas na amígdala basolateral (RAVINDER et al., 2011). Estes dados representam uma correlação morfológica entre excitabilidade dos neurônios piramidais desse núcleo com o aumento da ansiedade (VYAS et al., 2006; ROOZENDAAL et al., 2009; NIETZER et al., 2011; LEUNER e SHORS, 2013). Para testar essa hipótese, pesquisadores realizaram estudos eletrofisiológicos *in vitro* e *ex-vivo* em neurônios da amígdala lateral e constataram aumento de sua excitabilidade neuronal após tratamento agudo com fluoxetina (i.p.), associada à redução da atividade dos animais nos braços abertos da cruz elevada. Contudo, o emprego da coloração de Golgi não registrou nenhum efeito relacionado com o aumento do número de espinhos dendríticos nesses neurônios, sugerindo que comportamentos ansiogênicos podem ser produzidos na ausência de modificações estruturais das conexões sinápticas (RAVINDER et al., 2011).

Estudos em ratos e camundongos também têm associado à administração de ISRS com o aumento dos níveis de serotonina e glutamato na amígdala. (BOSKER et al., 2001; REZNIKOV et al., 2007). A serotonina possui a capacidade de gerar correntes excitatórias e inibitórias na amígdala (STUTZMANN et al., 1998; RAINNIE, 1999), e isso pode resultar em um favorecimento da excitabilidade de neurônios da BLA durante a manifestação de comportamentos associados à ansiedade. Uma variedade de receptores serotoninérgicos tem sido implicada na modulação do comportamento ansiogênico, e alguns estudos sugerem que a ansiedade induzida pela serotonina via receptores do tipo 5-HT_{2C} pode constituir a base dos efeitos observados pela administração aguda de ISRS (DEKEYNE et al., 2000; SALCHNER e SINGEWALD, 2006). No presente estudo observamos ativação da BLA 30 minutos após a administração i.c.v. de CVC concomitante com atividade ansiolítica de ratos na cruz elevada, sugerindo que a ativação da BLA não implica necessariamente em ansiogênese. Estudos complementares poderão identificar se o CVC modula a via serotoninérgica por vias específicas ou de modo inespecífico.

O papel da BNST na ansiedade ainda não está claramente compreendido. Em um estudo recente, pesquisadores sugeriram que a BNST possui um papel modulatório na geração de respostas condicionadas ao medo. Em experimentos com ratos, os estudos demonstraram que microinjeções em dose única de fluoxetina na BNST, mas não na amígdala central, é suficiente para aumentar a memória condicionada ao medo em um modelo de condicionamento auditivo, e os resultados de testes imunistoquímicos revelaram aumento da expressão de *Arc* (expressa proteína regulada por associação ao citoesqueleto), um gene de expressão inicial relacionado à plasticidade e induzido por condicionamento auditivo. A administração direta da fluoxetina no BNST reproduziu, da mesma forma que a administração sistêmica da droga, a expressão de um marcador molecular de plasticidade, sua expressão aumentada na CeA e o aumento da memória condicionada ao medo (RAVINDER et al., 2013). Nosso estudo demonstrou ativação neuronal na região ventral do BNST cinco minutos após administração de CVC, sugerindo que esta área pode estar entre as primeiras a serem moduladas pela ação do CVC.

Estudos experimentais demonstraram que a via serotoninérgica DRN-PAG tem um papel importante no controle dos ataques de pânico por seu caráter inibitório. Além desse circuito, a conexão MRN-DH também confere resistência ao estresse crônico. Esses dados sugerem que déficits na neurotransmissão serotoninérgica resultam em “panicogênese” (DEAKIN e GRAEFF, 1991). Em um estudo diferente conduzido em pacientes com transtorno do pânico utilizando métodos de neuroimagem (tomografia por emissão de pósitrons – PET; tomografia computadorizada por emissão de próton único - SPECT) foi sugerido que há diminuição do número de receptores de serotonina no tálamo e no lobo temporal (MARON et al., 2004). Posteriormente, o mesmo grupo revelou aumento na concentração de transportadores de serotonina e diminuição de receptores do tipo 5-HT_{1A} em diversas estruturas cerebrais. Esses dados sugerem que menor concentração de 5-HT nas rafe medial e dorsal, bem como nos córtex cingulado e frontal, está associado à ansiedade em pacientes que sofrem desse transtorno, contribuindo para a ansiedade (MARON et al., 2011). Um estudo reportou que o carvacrol possui efeito antinociceptivo através do modelo por indução de dor através do glutamato (GUIMARÃES et al., 2010). Ratos submetidos à ativação de longo-termo por vias glutamatérgicas na amígdala demonstraram comportamento ansiolítico no teste da cruz elevada (KALYNCHUCK et al., 1997). Em um trabalho recente, um grupo de

pesquisas demonstrou que a administração de NMDA no PAG em baixa concentração promoveu aumento da ansiedade de ratos no teste da cruz elevada, e que esse comportamento foi parcialmente revertido após administração de antagonistas serotoninérgicos (MORAES et al., 2008). Esses dados sugerem que a via glutamatérgica presente no PAG age juntamente com vias serotoninérgicas nessa mesma área para a modulação dos comportamentos de ansiedade. No presente estudo demonstramos que o CVC modula vias serotoninérgicas e que a PAG em suas diferentes subdivisões (dorsal, lateral e ventrolateral) são intensamente ativadas após administração de CVC no VL nos dois tempos observados, o que sugere uma participação efetiva deste componente no comportamento ansiolítico observado na cruz elevada.

Recentemente foi investigado a relevância dos neurônios glutamatérgicos da via BLA-vHPC nos testes de ansiedade em camundongos, através do emprego de técnica optogenética. A inibição bilateral dos terminais axônicos projetados da BLA no hipocampo ventral reduziu, em fração de segundos, a ansiedade observada nos testes EPM e OF, enquanto que a ativação desses terminais aumentou comportamentos de ansiedade nos mesmos testes, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Adicionalmente, os pesquisadores observaram que o uso de antagonistas glutamatérgicos, administrados diretamente no hipocampo, foi capaz de reverter os efeitos ansiogênicos induzidos pela ativação dos terminais axônicos da BLA, sugerindo a via glutamatérgica como fundamental para a modulação dos estados de ansiedade através da via BLA-vHPC (FELIX-ORTIZ et al; 2013). Nossos resultados demonstram ativação da BLA após 30 min de administração i.c.v. de CVC, e experimentos futuros poderão demonstrar de que forma o CVC atua na BLA na modulação do comportamento ansiolítico observado.

O PVATHAL possui intensa aferência orexítocinérgica (ORX), e sabe-se que esta via está relacionada com o stress (BERRIDGE et al., 2010). Estudos recentes têm demonstrado que a ativação de receptores ORX no PVATHAL intensifica a ansiedade em ratos, enquanto que o bloqueio destes receptores possui efeito ansiolítico (LI et al., 2010). Adicionalmente, o bloqueio de receptores ORX previne a ativação do eixo HPA frente a situação de estresse em ratos (HEYDENDAEL et al., 2011). Contudo, não há trabalhos que tenham descrito se vias serotoninérgicas ou noradrenérgicas no PVATHAL possuem papel relevante para a ansiedade. No presente estudo foi

demonstrado que o CVC injetado no VL pode ativar células no PVATHAL, mas estudos futuros serão necessários para determinar os subtipos neuronais ativados.

Poucos estudos têm investigado o papel das vias adrenérgicas na ansiedade. Manipulações dos receptores adrenérgicos α_2 através de diferentes estratégias moleculares têm gerado resultados controversos. Um estudo demonstrou que camundongos *knockout* para o receptor α_2A manifestaram mais ansiedade do que animais controles no teste da cruz elevada e da caixa claro/escuro, bem como maior tempo de imobilização no teste do nado forçado (SCHRAMM et al., 2001), sugerindo que estes receptores podem possuir um papel protetor para ansiedade e depressão. Contudo, outro estudo reportou efeito oposto quando a expressão gênica dos receptores α_2A foi bloqueada através do uso de oligonucleotídeos *antisense* (SHISHKINA et al., 2001). A discrepância pode ser explicada por diferenças nas metodologias dos trabalhos descritos, como o emprego de camundongos no primeiro trabalho e de ratos no último, mas estudos futuros são necessários para melhor explicar o papel desses receptores nos mecanismos da ansiedade (ITOI e SUGIMOTO, 2010). Tem sido reportado recentemente que microinjeções de NA diretamente na região dorsal da PAG em ratos resultou em efeito ansiolítico no teste do LCE (PELOSI GG et al., 2009). Nossos dados demonstraram que a administração i.c.v. de CVC promove ativação neuronal nesta região da PAG, e dados da literatura demonstram que o CVC atua como inibidor da recaptação de monoaminas, como a noradrenalina (MECHAN et al., 2011). Estudos futuros poderão confirmar se o carvacrol pode modular a ansiedade através de vias adrenérgicas na PAG.

O eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) está sob regulação de uma variedade de aferências hipotalâmicas, e a via da NA parece ter um papel importante nessa regulação (ITOI & SUGIMOTO, 2010). Sua ação se dá principalmente nos neurônios liberadores da corticotrofina (CRF) no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (PACAK e PALKOVITS, 2001; ITOI et al., 2004). A desregulação desse eixo foi observada em pacientes com depressão (CHARNEY, 2003), e a concentração de noradrenalina no líquido cefalorraquidiano desses pacientes é maior quando comparados com os níveis normais, ocorrendo em paralelo com o aumento do cortisol no plasma (GOLD et al., 2005). Esses resultados sugerem uma relação entre a disfunção do eixo HPA e transtornos emocionais. No presente estudo observamos que o CVC pode modular vias adrenérgicas, e que o PVN possui intensa ativação neuronal

imediatamente após a administração i.c.v. de CVC. Estudos futuros poderão esclarecer se o CVC interfere na liberação de corticotrofina por neurônios do PVN e se esta atividade estaria relacionada com o efeito ansiolítico observado.

Alguns estudos clínicos também mostram evidências de que a modulação noradrenérgica interfere nos mecanismos de ansiedade. Foi demonstrado que pacientes com síndrome do pânico tratados com ioimbina (antagonista do receptor adrenérgico pré-sináptico α_2) tiveram aumento da pressão sistólica, dos níveis plasmáticos de cortisol e da ansiedade (CHARNEY et al., 1984; 1987). Também foi relatado que o mesmo tratamento em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático resultou em aumento da ansiedade (SOUTHWICK et al., 1993; 1997). Em uma revisão recente (KALK et al., 2011) verifica-se que uma série de trabalhos aponta que a administração de clonidina (agonista dos receptores α_2) reduziu os níveis de ansiedade em pacientes com síndrome do pânico. Entretanto, embora haja um número significativo de evidências que relacionam disfunção noradrenérgica com síndrome do pânico, os resultados são baseados no uso de medições indiretas e na administração periférica dos fármacos (KALK et al., 2011).

O núcleo da estria terminal (BNST) possui conexões com o PVN, e também recebe aferências de núcleos noradrenérgicos, mais precisamente dos núcleos A1 e A2 (DELFS et al., 2000). Essa estrutura límbica parece estar envolvida com a ansiedade. Microinjeções de antagonistas α_1 e β adrenérgicos no BNST em ratos atenua a inibição da exploração dos braços abertos no labirinto da cruz elevada induzidos pelo estresse, sugerindo que a influência noradrenérgica neste núcleo está relacionada com o aumento da ansiedade induzido pelo estresse (CECCHI et al., 2002; MORILAK et al., 2005). Também há registros de redução da ansiedade em ratos que receberam antagonistas β -adrenérgicos no hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (TULLY e BOLSHAKOV, 2010). Outro estudo constatou que o bloqueio dos receptores adrenérgicos do tipo α_1 na BNST de ratos inibe parcialmente o aumento de ACTH plasmático induzido por baixas temperaturas, demonstrando que esta via pode estar relacionada com a ativação do eixo HPA em situações de estresse (DELFS et al., 2000). Nossos resultados demonstrou que o CVC pode modular a via noradrenérgica através da ação nos receptores α_1 , e novos estudos poderão esclarecer melhor os mecanismos de ação do CVC por esta via.

O presente estudo demonstrou que microinjeção intracerebroventricular de CVC em ratos possui efeito antinatriorexigênico e ansiolítico, sem alterar a atividade motora dos animais. Apesar de observarmos envolvimento de vias noradrenérgicas e serotoninérgicas, bem como a ativação de diversas regiões neurais, o mecanismo de ação do carvacrol nos comportamentos observados ainda não está totalmente esclarecido. A literatura tem descrito este monoterpeneo como um composto de perfil farmacológico complexo, capaz de modular diferentes vias neurais através do desbalanço na disponibilidade de monoaminas. Estudos futuros como o emprego de agonistas e antagonistas, bem como microinjeções do CVC em áreas específicas poderão caracterizar melhor as vias que determinam os comportamentos observados. Estudos com microdiálise são necessários para determinar de que forma o CVC altera a disponibilidade de monoaminas, e se estas alterações ocorrem de acordo com as diferentes regiões envolvidas. Finalmente, estudos imunohistoquímicos com dupla marcação podem melhor identificar os subtipos neuronais ativados pelo CVC. Todos estes estudos futuros poderão contribuir para melhor esclarecer os mecanismos de ação neural do carvacrol.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, J. K. et al. Serotonergic system associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. **Neuroscience**, v. 133, p. 983-987, 2005.
- ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. **Front Behav Neurosci.**, v. 8, p. 1-6, 2014.
- ALMEIDA, N. A. A. et al. Effects of the alpha antagonists and agonists injected into the lateral hypothalamus on the water and sodium intake induced by angiotensin injection into the subfornical organ. **Brain Res. Bull.**, v. 5, p. 521-525, 1999.
- AMANO, T. et al. The fear circuit revisited: contributions of the basal amygdale nuclei to conditioned fear. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 15481-15489, 2011.
- ANDERSON, J.W. et al. Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons. **Neuroscience**, v. 100, n. 3, p. 539-547, 2000.
- ANDRADE, C.A.F. et al. Activation of α 2-adrenoreceptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, p. 25-34, 2004.
- ANDRADE, T.G.C.S. et al. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **J Psychopharm**, v. 27, n. 12, p. 1107-1115, 2013.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 1, p. 169-208, 2004.
- ARIMA, H. et al. Regulation of vasopressin synthesis and release by área postrema in rats. **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p.1481-1486, 1998.
- AYDIN, S. et al. Investigation of Origanum onites, Sideritis congesta and Satureja cuneifolia oils for analgesic activity. **Phytother Res.**, v. 10, p. 342-4, 1996.
- AYDIN, Y. et al. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. **Planta Med.**, v. 73, n. 13, p. 1365-71, 2007.
- AZMITIA, E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. **Brain Res Bull.**, v. 56, n. 5, p. 413-424, 2001.
- BADAUE-PASSOS, D.J.R. et al. Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite of ethyroid and hypothyroid rats. **Exp Physiol.**, v. 88, n. 2, p. 251-260, 2003.
- BALDESSARINI, R.J. Drug therapy of depression and anxiety disorders. Em: Brunton LL, Lao JS, arker KL. The Pharmacological basis of therapeutics, 11th edn. **McGraw Hill**, p. 429-459, 2006.
- BASER, K.H.C. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. **Current Pharm. Design**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.
- BASSO, E.M.; KELEY, A.E. Feeding induced by GABA(A) receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. **Behav Neurosci.**, v. 113, n. 2, p. 324-336, 1999.
- BAUMAN, M.D.; AMARAL, D.G. The distribution of serotonergic fibers in the macaque monkey amygdale: an imunohistochemical study using antisera to 5-hydroxytryptamine. **Neuroscience**, v. 136, p. 193-203, 2005.
- BECKER, A.; GRECKSCH, G. illumination has no effect on rats behavior in the elevated plus maze. **Physiol Behav.**, v. 59, n. 6, p. 1175-1777, 1996.

- BECKET, S.R. et al. Central cFOS expression following 20khertz/ultrasound induced defense behavior in the rat. **Brain Res Bull.**, v. 42, n. 6, p. 421-426, 1997.
- BELL, C.J.; NUTT, D.J. Serotonin and panic. **Br J Psychiatry**, v. 172, p. 465-471, 1998.
- BERRIDGE, C.W.; WATERHOUSE, B.W. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state dependent cognitive processes. **Brain Res.** v. 42, p. 33-84, 2003.
- BERRIDGE, C.W. et al. Hypocretin/orexin in arousal and stress. **Brain Res.**, v. 1314, p. 91-102, 2010.
- BICKNELL, R.J. Optimazing release from peptide hormone secretory nerve terminals. **J Exp Biol.**, v. 139, p. 51-65, 1988.
- BLACKBURN, R.E. et al. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Neurobiology**, v. 90, p. 10380-10384, 1993.
- BLACKBURN, R.E. et al. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am J Physiol.**, v. 269, p. 245-251, 1995.
- BLAINE, E.H. et al. A central osmosensitive receptor for renal sodium excretion. **J Physiol.**, v. 244, p. 497-509, 1975.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **J Comp Physiol.**, v. 103, p. 70-82, 1989.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. **Anxiety. Otago University Press.**, p. 124-133, 1990a.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defense as models of animal fear and anxiety. **Fear and Defence. Harwood Academic**, p. 89-108, 1990b.
- BLANCHARD, R.J. et al. The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. **Neurosci Behav Rev.**, v. 14, p. 463-472, 1990.
- BLANCHARD, R.J. et al. Differentiation of anxyolytic and panicolytic by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Bahev Rev.**, v. 21, p. 783-789, 1997.
- BOSTER, F.J. et al. Acute and chronic effects of citalopram on postsynaptic 5-hydroxytryptamine 1A receptor-mediated feedback: a microdialysis study in the amygdala. **J Neurochem.**, v. 76, p. 1645-1653, 2001.
- BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.
- BOURIN, M.; HASCOUET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol.**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, 2003.
- BOURQUE, C.W. Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurons by hyperosmotic stimuli. **J Physiol.**, v. 417, p. 263-277, 1989.
- BOURQUE, C.W. Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes. **Prog Brain Res.**, v. 119, p. 59-76, 1998.
- BOURQUE, C.W. Central mechanism of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci.**, v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008.

- BOUWKNECHT, J.A. et al. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to cFOS expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Brain Res Bull.**, v. 72, p. 32-43, 2007.
- BREMNER, J.D. et al. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I Pre clinical studies. **Synapse.**, v. 23, n. 1, p. 28-38, 1996.
- BRIMBLE, M.J.; DYBAL, E.J. Characterization of the responses of oxytocin and vasopressin secretin neurons in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. **J Physiol.**, v. 271, p. 253-271, 1977.
- BRIMBLE, M.J. et al. Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei. **J Physiol.**, v. 278, p. 69-78, 1978.
- BUGGY, J. et al. Osmosensitivity of rat third ventricle and interections with angiotensin. **Am J Physiol.**, v. 236, n. 1, p. 75-82, 1979.
- BYKOWSKY, M.R. et al. Regulation of NaCl solution intake and gastric emptying in adrenalectomized rats. **Physiol Behav.**, v. 92, p. 781-789, 2007.
- CAMARGO, L.A.A.; SAAD, W.A. Role of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ adrenoreceptors of the paraventricular nucleus on the water and salt intake, renal excretion, and arterial pressure induced by angiotensin II injection into the medial septal area. **Brain Res Bull.**, v. 6, p. 595-602, 2001.
- CAMPBELL, B.M.; MERCHANT, K.M. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdale induces acute fear-like responses in an open-field environment. **Brain Res.**, v. 993, p. 1-9, 2003.
- CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport.**, v. 10, n. 2, p. 413-418, 1999.
- CARDENAS, F. et al. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus maze. **Beh Brain Res.**, v. 122, p. 169-174, 2001.
- CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety like behavior: the elevated plus maze model twenty years on. **Neurosci Behav Rev.**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.
- CARVALHO, A.F.; BOCKSTAELE, E.J.V. Cannabinoid modulation of noradrenergic circuits: implications for psychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmac Biol Psychi.**, v. 38, p. 59-67, 2012.
- CARVALHO, M.C. et al. Central, but not basolateral, amygdala involvement in the anxiolytic-like effects of midazolam in rats in the elevated plus maze. **J Psychopharmacol.**, v. 26, p. 543-554, 2012.
- CASTRO, L. et al. Central 5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v. 981, p. 151-159, 2003.
- CAVALCANTI-LIMA, H.R. et al. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neurosci Lett.**, v. 374, n. 1, p. 5-10, 2005.
- CECCHI, M. et al. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 13-21, 2002.

- CELADA, P. et al. Control of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus by the lateral hypothalamus. **Brain Res.**, v. 932, n. 1-2, p. 79-90, 2002.
- CHARNEY, D.S. et al. Noradrenergic function in panic anxiety: effect of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. **Arc Gen Psychiatry**, v. 41, p. 751-763, 1984.
- CHARNEY, D.S. et al. Neurobiological mechanisms of panic anxiety: biochemical and behavioral correlates of yohimbine-induced panic attacks. **Am J Psychiatry**, v. 144, p. 1030-1036, 1987.
- CHARNEY, D.S. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. **ACTA Psychiatrica Scandinavica**, v. 108, p. 38-50, 2003.
- CHARRON, G. et al. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. **FASEB J Express**, v. 16, n. 6, p. 610-612, 2002.
- CHOI, D.C. et al. Bed nucleus of stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. **J Neurosci.**, v. 27, n. 8, p. 2025-2034, 2007.
- CHRISTIANSON, J.P. et al. 5-Hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. **Biol Psych.**, v. 67, p. 339-345, 2010.
- CIOCCHI, S. et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. **Nature**, v. 468, p. 277-282, 2010.
- CIURA, S.; BOURQUE, C.W. Transient receptor potential vanilloid is required for intrinsic osmoreception in organ vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. **J Neurosci.**, v. 26, n. 35, p. 9069-9075, 2006.
- COLBERT, H.A. et al. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci.**, v. 17, n. 21, p. 8259-8269, 1997.
- COLOMBARI, E. et al. Role of central alpha 1 and alpha 2 adrenoreceptors on the dipsogenic and cardiovascular effect of angiotensin II. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 36, n. 4, p. 893-896.
- CONTRERAS, R.J.; STETSON, P.W. Changes in salt intake lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. **Brain Res.**, v. 211, n. 2, p. 355-366, 1981.
- COOPER, S.J. et al. Specific effect of putative 5-HT_{1A} agonists, 8-OH-DPAT and gepirone, to increase hypertonic saline consumption in the rat: evidence against a general hyperdipsic action. **Physiol Behav.**, v. 43, n. 4, p. 533-537, 1988.
- CRAIG, A.D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Nature Rev.**, v. 3, p. 655-666, 2002.
- CRAIG, A.D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Curr Op Neurobiol.**, v. 13, p. 500-505, 2003a.
- CRAIG, A.D. A new view of pain as a homeostatic emotion. **Trends Neurosci.**, v. 26, n. 6, p. 303-307, 2003b.

- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.
- CUBERO, I. et al. Insular cortex lesions and taste aversion learning: effects of conditioning method and timing of lesion. **Brain Res.**, v. 839, p. 323-330, 1999.
- CUENYA, L. et al. Effect of isolation in adulthood on frustration and anxiety. **Behav Process**, v. 90, p. 155-160, 2012.
- CURTIS, K.S. et al. Area postrema lesions in rats appear to disrupt rapid feedback inhibition of fluid intake. **Brain Res.**, v. 726, p. 31-38, 1996.
- CURTIS, K.S. et al. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. **Am J Physiol.**, v. 277, p. R209-219, 1999.
- DANIELS, D.; FLUHARTY, S.J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiol Behav.**, v. 81, p. 319-337, 2004.
- DARVEN, P.J.; MCKINLEY, M.J. Forebrain regions affected by lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms that influence sodium appetite. **Brain Res.**, v. 1339, p. 41-48, 2010.
- DAVIS, M., SHI C. The amygdala. **Curr Biol.**, v. 10, n. 4, p. R131, 2000.
- DAVIS, M. et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 105-135, 2010.
- DE LUCA JR, L.A. et al. On a possible dual role for central noradrenaline in the control of hydromineral fluid intake. **Braz J Med Biol Res.**, v. 27, p. 905-914, 1994.
- DE LUCA JR, L.A.; MENANI, J.V. Multifactorial control of water and saline intake: role of α 2-adrenoreceptors. **Braz J Biol Med Res.**, v. 30, p. 497-502, 1997.
- DE MAGALHÃES-NUNES, A.P. et al. Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. **Exp Physiol.**, v. 92, n. 5, p. 913-922, 2007.
- DE PAULA, P.M. et al. Effects of central α -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neurosci Lett.**, v. 214, p. 155-158, 1996.
- DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.
- DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5HT and mechanisms of defense. **J Psychopharm.**, v. 7, p. 283-289, 1991.
- DEERING, J.; COOTE, J.H. Paraventricular neurons elicit a volume expansion-like change of activity in sympathetic nerves to the rat and kidney in the rabbit. **Exp Physiol.**, v. 85, n. 2, p. 177-186, 2000.
- DEL-BEN, C.M. et al. The effect of citalopram pretreatment of neuronal responses to neuropsychological tasks in normal volunteers: an fMRI study. **Neuropsychopharm.**, v. 30, p. 1724-1734, 2005.
- DELFS, J.M. et al. Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate-withdraw induced aversion. **Lett Nature**, v. 403, p. 430-434, 2000.
- DENG, W. et al. Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. **J Mol Neurosci.**, v. 51, p. 813-819, 2013.

- DENTON, D. et al. Neuroimaging of genesis and station of thirst and an interoceptor-driven theory of origins of primary consciousness. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 96, p. 5304-5309, 1999.
- DIELLENBERG, R.A. et al. "When a rat smells a cat": the distribution of fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.
- DORMAN, H.J.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol.**, v. 88, n. 2, p. 308-16, 2000.
- DUNN, F.L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest.**, v. 52, n. 12, p. 3212-3219, 1973.
- DURVACI, S. et al. The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. **J Neurosci.**, v. 29, p. 10357-10361, 2009.
- EGAN, G. et al. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. **PNAS.**, v. 100, n. 25, p. 15241-15246, 2003.
- EHRlich, I. et al. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. **Neuron**, v. 62, p. 757-771, 2009.
- EMMELUTH, C. et al. Natriuresis caused by increased carotid Na⁺ concentration after renal denervation. **Am J Physiol.**, v. 270, p. 510-517, 1996.
- EPSTEIN, A.N.; STELLAR, E. The control of salt preference in the adrenalectomized rat. **J Comp Physiol Psychol.**, v. 48, p. 167-172, 1955.
- EPSTEIN, A.N. Mineralocorticoids and cerebral angiotensin may act together to produce sodium appetite. **Peptides**, v. 3, p. 483-494, 1982.
- FALK, J.L. Serial sodium depletion and NaCl solution. **Physiol Behav.**, v. 1, p. 75-77, 1966.
- FARREL, M.J. et al. Effect of aging on regional cerebral blood flow responses associated with osmotic thirst and its sensation by water drinking: a PET study. **PNAS.**, v. 105, n. 1, p. 382-387, 2008.
- FEDOTOVA, J.O. et al. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonist and antagonist on anxiety in intact and ovariectomized female rats. **Acta Physiol Hung.**, v. 91, n. 3-4, p. 175-184, 2004.
- FELIX-ORTIZ, A.C. et al. BLA to VHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. **Neuron**, v. 79, n. 4, p. 658-664, 2013.
- FERNANDEZ, C.; FILE, S.E. The influence of open arms ledge and maze experience in the elevated plus maze. **Pharmac Bioch Beh.**, v. 54, p. 31-40, 1996.
- FERRARI, A.C. et al. Role of the α_1 and α_2 adrenoreceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. **Brain Res.**, v. 560, p. 291-296, 1991.
- FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In *Experimental approaches to anxiety and depression*. **Wiley**, Nova Iorque, p. 25-44, 1992.
- FISHER, T.E.; BOURQUE, C.W. The function of Ca²⁺ channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. **Prog Biophy Mol Biol.**, v. 77, p. 269-303, 2001.

- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, Thirst and Sodium Appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 583-686, 1998.
- FOSTER, G.L. et al. Corticotrone-releasing factor in the dorsal raphe elicits temporally distinct serotonergic responses in the limbic system in relation to fear behavior. **Neuroscience**, v. 141, p. 1047-1055, 2006.
- FOX, J.H.; LOWRY, C.A. Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior. **Front Neurosci.**, v. 7, p. 1-16, 2013.
- GARCIA, A.M.B. et al. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus maze. **Physiol Behav.**, v. 85, p. 265-270, 2005.
- GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Central regulation of sodium appetite. **Exp Physiol.**, v. 93, p. 178-209, 2008.
- GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Inhibition of membrane bound ATPases of Escherichia coli and Listeria monocytogenes by plan oil aromatics. **Int J Food Microb.**, v. 111, p. 170-174, 2006.
- GIOVANELLI, L. et al. Expression of c-fos protein by immunohistochemically identified oxytocin neurons in the rat hypothalamus upon osmotic stimulation. **Brain Res.**, v. 588, p. 41-48, 1992.
- GODINO, A. et al. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? **American Journal of Physiology**, v. 293, p. R1027-R1036, 2007.
- GODINO, A. et al. Activation of lateral parabrachial afferent pathways and endocrine responses during sodium appetite regulation. **Exp Neurol.**, v. 221, .n 2, p. 275-284, 2010.
- GOETZ, R.R. et al. Acute panic inventory symptoms during CO2 inhalation and room-air hyperventilation among panic disorder patients and normal controls. **Depress Anxiety**, v. 14, p. 123-136, 2001.
- GOLD, P.W. et al. Cardiac implications of increased arterial entry and reversible 24h central and peripheral norepinephrine levels in melancholia. **PNAS.**, v. 102, n. 23, p. 8303-8308, 2005.
- GORMAN, J.M. et al. Neuroanatomical hypothesis of panic disorders, revised. **Am J Psychiatry.**, v. 157, n. 4, p. 493-505, 2000.
- GOTO, T. et al. Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate Carbohydrate and Lipid Metabolism. **PPAR Res.**, p. 1-9, 2011.
- GOVINDARAJAN, A. et al. Transgenic brain derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. **PNAS.**, v. 103, n. 35, p. 13208-13213, 2006.
- GRAEFF, F.G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic. **Behav Brain Res.**, v. 58, n. 1-2, p. 123-131, 1993.
- GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defense behaviors and related emotions in mammals. **Braz J Med Biol Res.**, v. 27, p. 811-829, 1994.
- GRAEFF, F.G. et al. Role of 5HT in stress, anxiety and depression. **Pharmac Bioch Beh.**, v. 54, p. 129-141, 1996.

- GRAEFF, F.G. Serotonergic Systems. **Psych Clin North America**, v. 20, n. 4, p. 723-739, 1997.
- GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467-476, 2002.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Fundamentos de psicofarmacologia. Ed **Atheneu**, 2012.
- GRAY, J.A. The behavioural inhibition system: a possible substrate for anxiety. In *Theoretical and experimental bases of behavior modification*. p. 3-41, 1976.
- GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. **Oxford University Press**, 2000.
- GRAY, T.S. Amygdaloid CRF pathways: role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. **Ann NY Acad Sci.**, v. 697, p. 53-60, 1993.
- GREENWOOD, B.N. et al. 5-HT_{2C} receptors in the basolateral amygdale and dorsal striatum are a novel target for the anxiolytic and antidepressant effects of exercise. **Plos One**, v. 7, p. e46118, 2012.
- GRIEBEL G. et al. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus maze. **Beh Processes**, v. 29, p. 37-48, 1993.
- GRILLON, C. Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 421-437, 2008.
- GUIMARÃES, A.G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v., 107, n. 6, p. 949-57, 2010.
- GULER, A.D. et al. Heat-evoked activation of ion channel, TRPV4. **J Neurosci.**, v. 22, n. 15, p. 6408-6414, 2002.
- GUO, J.D. et al. Bidirectional modulation of bed nucleus of stria terminalis neurons by 5HT: molecular expression and functional properties of excitatory 5HT receptor subtypes. **Neuroscience**, v. 164, p. 1776-1793, 2009.
- HAKIMIZADEH, E. et al. Endocannabinoid system and TRPV1 receptors in the dorsal hippocampus of the rats modulate anxiety-like behaviors. **Ir J Bas Med Sci.**, v. 15, n. 3, p. 795-802, 2012.
- HALE, M.W. et al. Exposure to an open-field arena increases c-FOS expression in a subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex. **Neuroscience**, v. 157, p. 733-748, 2008.
- HAMMACK, S.E. et al. The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety. **Progress in Neuro-Psychopharmacology**, v. 33, p. 1309-1320, 2009.
- HANAMORI, T. et al. Neurons in the posterior insular cortex are responsive to gustatory stimulation of the pharyngolarynx, baroreceptor and chemoreceptor stimulation, and tail pint in rats. **Brain Res.**, v. 785, p. 97-106, 1998.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear"-motivated behavior. **N Arch Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HARIRI, A.R. et al. Serotonin transporter variation genetic and the response of the human amygdala. **Science**, v. 297, p. 400-403, 2002.

HARRO, J. et al. Impaired exploratory behaviour after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. **Eur Neuropsychopharm.**, v. 5, p. 447-455, 1995.

HASELTON, J.R. et al. Parvocellular neurons of the paraventricular nucleus are involved in the reduction in renal nerve discharge during isotonic volume expansion. **J Auton Nerv Syst.**, v. 50, n. 1, p. 1-11, 1994.

HENSLER, J.G. Serotonergic modulation of limbic system. **Neurosci Beh Rev.**, v. 30, p. 203-214, 2006.

HERBERT, H. et al. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 293, n. 4, p. 540-580, 1990.

HERMAN, J.P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psichopharmacology**, v. 29, p. 1201-1213, 2005.

HESS, W.R. et al. The control of the autonomic nervous system by the hypothalamus. **The Lancet**, v. 257, p. 627-629, 1951.

HEYDENDAEL, W. et al. Orexins/hypocretins act in the posterior paraventricular thalamic nucleus during repeated stress to regulate facilitation of novel stress. **Endocrinology**, v. 152, p. 4738-4752, 2011.

HIYAMA, T.Y. et al. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt-intake behavior. **J Neurosci**, v. 24, p. 9276-9281, 2004.

HOEBEL, B.G. et al. Microdialysis studies of brain norepinephrine, dopamine and serotonin release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications. **Ann NY Acad Sci.**, v. 575, p. 171-191, 1989.

HOLLIS, J.H. et al. The trajectory of sensory pathways from the lamina terminalis to the insular and cingulate cortex: a neuroanatomical framework for the generation of thirst. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 294, p. R1390-R1401, 2008.

HOLMES, A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. **Neurosci Behav Rev.**, v. 32, p. 1293-1314, 2008.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L. The search for biologically active secondary metabolites. **Pestic Sci.**, v. 51, p. 471-82, 1997.

HOYER, D. et al. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 71, p. 533-554, 2002.

HRICTCU, L. et al. Brain serotonin depletion impairs short term memory, but not long term memory in rats. **Physiol Behav.**, v. 91, n. 5, p. 652-657, 2007.

HSU, D.T. et al. Contributions of the paraventricular thalamic nucleus in the regulation of stress, motivation and mood. **Front Behav Neurosci.**, v. 8, n. 73, p. 1-10, 2014.

HUANG, W. et al. Vasopressin and oxytocin release evoked by NaCl loads are selective blunted by area postrema lesions. **Am J Physiol.**, v. 278, p. R732-740, 2000.

- IMHOF, J.T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Beh Brain Res.**, v. 56, p. 177-180, 1993.
- ITOI, K. et al. Regulatory Mechanisms of corticotropine-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. **J Neuroendocrinology**, v. 16, p. 348-355, 2004.
- ITOI, K.; SUGIMOTO, N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. **J Neuroendocrinol.**, v. 22, p. 355-361, 2010.
- JOHNSON, A.K. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. **Brain Res.**, v. 15, p. 595-601, 1985.
- JOHNSON, A.K. et al. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. **Cli Exp Pharmacol Physiol.**, v. 23, n. 2, p. 183-191, 1996.
- JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: Visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, p. 292-353, 1997.
- JOHNSON, A.K. et al. The extended amygdala and salt appetite. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 877, p. 258-280, 1999.
- JOHNSON, A.K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 39, n. 8, p. 1388-1400, 2007.
- JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiol Behav.**, v. 29, p. 245-250, 1991.
- KALYNCHUCK, L.E. et al. Changes in emotional behavior produced by long term amygdala kindling in rats. **Biol Psychiatry.**, v. 41, p. 438-451, 1997.
- KALK, N.J. et al. The role of central noradrenergic dysregulation in anxiety disorders: evidence from clinical studies. **J Psychopharm.**, v. 25, n. 1, p. 3-16, 2011.
- KARKABOUNAS, S. et al. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Exp Oncol.**, v. 28, n. 2, p. 121-125, 2006.
- KASCHOW, J.W. et al. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 291-295, 2004.
- KIROUAC, G.J.; PARSONS, M.P., LI S. Orexin (hypocretin) innervations of the paraventricular nucleus of the thalamus. **Brain Res.**, v. 1059, p. 179-188, 2005.
- KOBASHI, M. et al. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neuroscience**, v. 50, p. 158-247, 1993.
- KOPARAL, A.T.; ZEYTINOGLU, M. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. **Cytotechnology**, v. 43, p. 149-154, 2003.
- KRAPIVINSKY, G. et al. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affect transmitter release. **Neuron**, v. 52, n. 3, p. 485-496, 2006.
- LAMBERT, R.J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol.**, v. 91, n. 3, p. 453-62, 2001.

- LANÇA, A.J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1117-1126, 1985.
- LAPIZ, M.D.S. et al. Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behavior of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 251-259, 2001.
- LEDOUZ, J. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci.**, v. 23, p. 155-184, 2000.
- LEDOUX, J. The amygdala. **Current Biology**, v. 17, n. 2, p. 868-874, 2007.
- LEIBOWITZ, S.F. Hypothalamic alpha- and beta-adrenergic systems regulate both thirst and hunger in the rat. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 68, p. 332-334, 1971.
- LESCH, K.P. et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science**, v. 274, p. 1527-1531, 1996.
- LEUNER, B.; SHORS, T.J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections?. **Neuroscience**, v. 251, p. 108-119, 2013.
- LEVITA, L. et al. 5-hydroxytryptamine 1A-like receptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: electrophysiological and behavioral studies. **Neuroscience**, v. 128, p. 583-596, 2004.
- LI, D. et al. Toward an integrative understanding of social phobia. **J Psychia Neurosci.**, v. 26, n. 3, p. 190-202, 2001.
- LI, Q. et al. Anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptors and anxiogenic effects of 5-HT_{2C} receptors in the amygdala of mice. **Neuropharmacology**, v. 72, p. 474-484, 2012.
- LI, S.; KIROUAC, G.J. Projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the forebrain, with special emphasis on the extended amygdala. **J Comp Neurol.**, v. 506, p. 263-287, 2008.
- LI, Y. et al. Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 95, p. 121-128, 2010.
- LIAMIS, G. et al. Clinical and laboratory characteristics of hyponatremia on an internal medicine clinic. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 23, p. 136-143, 2008.
- LIMA, H.R.C. et al. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. **Ann Braz Aca Sci.**, v. 76, n. 1, p. 85-92, 2004.
- LIEDTKE, W. et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 525-535, 2000.
- LIEDTKE, W.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. **PNAS.**, v. 100, n. 23, p. 13698-13703, 2003.
- LOBERBAUM, J.P. et al. Neural correlates of speech anticipatory anxiety in generalized social phobia. **Brain Imaging**, v. 15, n. 18, p. 2701-2705, 2004.
- LOW, K. et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v. 290, p. 131-134, 2000.
- LOWRY, C.A. et al. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress**, v. 8, n. 4, p. 233-246, 2005.

- LOWRY, C.A. et al. That warm fuzzy feeling: brain serotonergic neurons and the regulation of emotion. **J Psychopharmac**, v. 23, n. 4, p. 392-400, 2009.
- LOVICK, T.A. et al. Serotonergic transmission in the periaqueductal grey matter in relation to aversive behavior: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. **Neuroscience**, v. 95, n. 3, p. 763-772, 2000.
- LUZ, C.P. et al. Role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors located within the medial amygdala in the control of salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Research**, v. 1099, p. 121-132, 2006.
- LUZ, C.P. et al. The central amygdala regulates sodium intake in sodium depleted rats: role of 5-HT₃ and 5-HT_{2C} receptors. **Brain Research**, v. 1139, p. 178-194, 2007.
- MADHUSOODANAN, S. et al. Hyponatremia associated with psychotropic medications. A review of the literature and spontaneous report. **Adversive Drug React Toxicol Rev.**, v. 21, n. 1-2, p. 17-29, 2002.
- MAISONNETTE, S. et al. Role of resocialization and of 5HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus maze test. **Physiol Beh.**, v. 54, p. 753-758, 1993.
- MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Mol Cell Biochem.**, v. 228, n. 1-2, p. 111-7, 2001.
- MANZANARES, P.A.R. et al. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. **J Neurosci.**, v. 25, n. 38, p. 8725-8734, 2005.
- MARESH, C.M. et al. Perceptual responses in the heat after brief intravenous versus oral rehydration. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 36, n. 6, p. 1039-1045, 2001.
- MARON, E. et al. Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder. **Psych Res.**, v. 132, p. 173-181, 2004.
- MARON, E. et al. Gender differences in brain serotonin transporter availability in panic disorder. **J Psychopharm.**, v. 25, n. 7, p. 952-949, 2011.
- MARSCH, R. et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vallinoid type1 receptor-deficient mice. **J Neurosci.**, v. 27, n. 4, p. 832-839, 2007.
- MAROWSKY, A. et al. Functional mapping of GABA_A receptor subtypes in the amygdala. **Eur J Neurosci.**, v. 20, p. 1281-1289, 2004.
- MATINEZ, J.C. et al. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus maze. **Beh Process**, v. 60, p. 15-26, 2002.
- MASON, W.T. Supraoptic neurons of rat hypothalamus are osmosensitive. **Nature**, v. 287, n. 5778, p. 154-157, 1980.
- MCCANCE, R.A. Medical problems in mineral metabolism: III. Experimental human salt deficiency. **Lancet**, v. 1, p. 823-830, 1936.
- MCKIE, S. et al. Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacMRI. **Psychopharm.**, v. 180, p. 680-686.
- MCKINLEY, M.J. et al. Sensors for antidiuresis and thirst: osmoreceptors or CSF sodium detectors?. **Brain Res.**, v. 141, p. 89-103, 1978.

- MCKINLEY, M.J. et al. Periventricular lesions block natriuresis to hypertonic but not isotonic NaCl loads. **Am J Physiol.**, v. 262, p. 98-107, 1992.
- MCKINLEY, M.J. et al. The brain rennin-angiotensin system: location and physiological roles. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 35, p. 901-918, 2003.
- MCKINLEY, M.J.; JOHNSON, A.K. The psychological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol Sci.**, v. 19, p. 1-6, 2004.
- MCKINLEY, M.J. et al. Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst. **Semin Nephrol.**, v. 26, n. 3, p. 249-257, 2006.
- MECHAN, A.O. et al. Monoamine reuptake inhibition and mood-enhancing potential of a specified oregano extract. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 1150-1163, 2011.
- MELO, F.H.C. et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 437-443, 2010.
- MELO, F.H.C. et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 362-367, 2011.
- MENANI, J.V. et al. Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ on water intake. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 20, n. 2, p. 301-306, 1984.
- MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am J Physiol.**, v. 269, n. 5, p. R1044-1049, 1995.
- MENANI, J.V. et al. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am J Physiol.**, v. 270, n. 1, p. R162-168, 1996.
- MENANI, J.V. et al. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am J Physiol.**, v. 274, n. 2, p. R555-560, 1998.
- MENANI, J.V. et al. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **Am J Physiol.**, v. 306, p. R201-210, 2014.
- MENARDI, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci Behav Rev.**, v. 23, p. 591-613, 1999.
- MEZEY, E. et al. Distribution of m RNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1) and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **PNAS.**, v. 97, n. 7, p. 3655-3660, 2000.
- MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress Neurob.**, v. 70, p. 83-244, 2003.
- MITRA, R. et al. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdale. **PNAS.**, v. 102, n. 26, p. 9371-9376, 2005.
- MOGHADDAM, A.H. et al. Cannabinoid system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviors in rats. **Arch Ir Med.**, v. 16, n. 12, p. 711-716, 2013.
- MOGUENSON, G.J.; STEVENSON, J.A.F. Drinking induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. **Exp Neurol.**, v. 17, p. 119-127, 1967.

- MOLLER, C. et al. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. **Brain Res.**, v. 760, p. 94-101, 1997.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol.**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.
- MORAES, C.L.K. et al. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal grey modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res.**, v. 194, p. 181-186, 2008.
- MORAN, M.M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature**, v. 10, p. 601-620, 2011.
- MORATO, S.; CASTRECHINI, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus maze. **Braz J Med Biol Res.**, v. 22, p. 707-710, 1989.
- MORATO, S.; BRANDAO, M.L. Transporting rats to the test situation on a cart can modify rat exploratory behavior in the elevated plus maze. **Psychobiology**, v. 24, p. 247-252, 1996.
- MOREIRA, C.M. et al. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus maze is differentially sensitive to inactivation of basolateral and central amygdaloid nuclei. **Brain Res Bull.**, v. 71, p. 466-474, 2007.
- MORILAK, D.A. et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1214-1224, 2005.
- MORMOTO, T. Thermoregulation and body fluids: role of blood volume and central venous pressure. **Jap J Physiol.**, v. 40, p. 165-179, 1990.
- MORGAN, J.I.; CURRAN, T. Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annu Rev Neurosci.**, v. 14, p. 421-451, 1991.
- MORITA, H. et al. Sequence of forebrain activation induced by intraventricular injection of hypertonic NaCl detected by Mn²⁺ contrasted T1-weighted MRI. **Auton Neurosci.**, v. 113, p. 43-54, 2004.
- MORRIS, M.J. et al. Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiol Behav.**, v. 94, p. 709-721, 2008.
- MOUSSAIEFF, A. et al. Incense acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain. **FASEB J.**, v. 22, n. 8, p. 3024-3034, 2008.
- MURAKI, K. et al. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. **J Am Heart Assoc.**, v. 93, p. 829-838, 2003.
- NAEINI, R.S. et al. An N-terminal variant of TRPV1 channel is required for osmosensory transduction. **Nature Neurosci.**, v. 9, n. 1, p. 93-98, 2006.
- NASCIMENTO, N.C.; FETT-NETO, A.G. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. **Methods Mol Biol.**, v. 643, p. 1-13, 2010.
- 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.

- NIETZER, S.L. et al. Serotonin transporter knockout and repeated social defeat stress: impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brain areas. **Beh Brain Res.**, v. 220, p. 42-54, 2011.
- NILIUS, B. et al. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 165-217, 2007.
- NORGREN, R.; LEONARD, C.M. Taste pathway in rat brainstem. **Science**, v. 173, n. 4002, p. 1136-9, 1971.
- NORGREN, R.; PFAFFMAN, C. The pontine taste area in the rat. **Brain Res.**, v. 91, n. 1, p. 99-117, 1975.
- NORGREN, R.; SMITH, G.P. Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 273, n. 2, p. 207-223, 1988.
- NORGREN, R. Gustatory System. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. Australia, **Academic Press.**, p. 751-771, 1995.
- OFRAN, Y. et al. Fatal voluntary salt intake resulting in the highest ever documented sodium plasma level in adults: a disorder linked to female gender and psychiatric disorders. **J Int Med.**, v. 256, p. 525-528, 2004.
- OLIET, S.H.R.; BOURQUE, C.W. Properties of supraoptic magnocellular neurons isolated from the adult rat. **J Physiol.**, v. 455, p. 291-306, 1992.
- OLIET, S.H.R.; BOURQUE, C.W. Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. **Am J Physiol.**, v. 265, p. 1475-1479, 1993.
- OLIET, S.H.R.; BOURQUE, C.W. Gadolinium uncouples mechanical detection and osmoreceptor potential insupraoptic neurons. **Neuron**, v. 16, p. 175-181, 1996.
- OLIVARES, E.L. et al. Effect of the electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, n. 12, p. 1709-1716, 2003.
- OTAKE, K.; NAKAMURA, Y. Sites of origin of corticotrophin-releasing factor-like immunoreactive projections fiber to the paraventricular thalamic nucleus in the rat. **Neurosci Lett.**, v. 201, p. 84-86, 1995.
- PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress related disorders. **Endoc Rev.**, v. 22, n. 4, p. 502-548, 2001.
- PARÉ, D.; COLLINS, D.R. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdale: multiple extracellular recordings in conscious cats. **J Neurosci.**, v. 20, n. 7, p. 2701-2710, 2000.
- PARNAS, M. et al. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. **Cell Calcium**, v. 45, n. 3, p. 300-309, 2009.
- PASANTES-MORALES, H.; TUZ, K. Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death. **Contrib Nephrol.**, v. 152, p. 221-240, 2006.
- PATRONAS, P. et al. Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. **Brain Res.**, v. 798, p. 127-139, 1998.
- PATUSKOVAS, C.V. et al. Increased cellular activity in rat insular cortex after water and salt ingestion induced by fluid depletion. **Am J Physiol.**, v. 284, p. R1119-1125, 2002.

- PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 24, n. 3, p. 341-50, 2010.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Meth.**, v. 14, p. 149-67, 1985.
- PELOSI, G.G. et al. Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Behav Pharmacol.**, v. 20, n. 3, p. 252-259, 2009.
- PEÑUELAS, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends Plant Sci.**, v. 10, n. 4, p. 166-9, 2005.
- PETERS, M. et al. Carvacrol together with TRPC1 elimination improve functional recovery after traumatic brain injury in mice. **Jour Neurotr.**, v. 29, p. 2831-2834, 2012.
- PETROCELLIS, L.D. et al. Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on the TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. **ACTA Physiol.**, v. 204, p. 255-266, 2012.
- PIRES, L.F. et al. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivate of carvacrol, in mice. **Pharm Biochem Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013.
- POBBE, R.L.H.; ZANGROSSI Jr, H. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Psychopharm.**, v. 183, p. 314-321, 2005.
- PREUSS, H.G. et al. Effects of Essential Oils and Monolaurin on Staphylococcus aureus: In Vitro and In Vivo Studies. **Toxicol Mech Methods**, v. 15, n. 4, p. 279-85, 2005.
- PRICE, J.S. Evolutionary aspects of anxiety disorders. **Dialogues Clin Neurosci.**, v. 5, p. 223-236, 2003.
- PRIETO, J.M. et al. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. **Food Chem.**, v. 104, p. 889-95, 2007.
- QIU, D.L. et al. Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons in vitro. **Neurosci Lett.**, v. 355, p. 117-120, 2004.
- QUIRK, G.J. et al. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v. 15, p. 1029-1039, 1995.
- RAINNIE, D.G. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. **J Neurophysiol.**, v. 82, p. 69-85, 1999.
- RAINNIE, D.G. et al. Corticotropin release factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. **J Neurosci.**, v. 24, n. 14, p. 3471-79, 2004.
- RAMSEY, I.S. et al. An introduction to trp channels. **Annu Rev Physiol.**, v. 68, p. 619-647, 2006.
- RASMUSSEM, K. et al. Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats. **Exp Neurol.**, v. 83, p. 302-317, 1984.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, p. 603-613, 2001.

- RAVINDER, S. et al. Cellular correlates of enhanced anxiety caused by acute treatment with the selective reuptake inhibitor fluoxetine in rats. **Front Beh Neurosci.**, v. 5, n. 88, p. 1-10, 2011.
- RAVINDER, S. et al. A role of the extended amygdala in the fear-enhancing effects of acute selective serotonin reuptake inhibitor treatment. **Transl Psychiatry**, v. 15, p. 3e209, 2013.
- REILLY, J.J. et al. The effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis on sodium appetite. **ACTA Neurobiol.**, v. 5, p. 253-257, 1994.
- REIS, L.C. et al. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 91, n. 25, p. 12022-12026, 1994.
- REIS, L.C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **An Acad Bras Cienc.**, v. 79, n. 2, p. 261-283, 2007.
- REPA, J.C. et al. Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. **Nature Neurosci.**, v. 4, n. 7, p. 724-731, 2001.
- REYNOLDS, S.M.; BERRIDGE, K.C. Positive and negative motivation in the nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradient for GABA-elicited eating, taste "liking"/"dislike" reactions, place preference/avoidance, and fear. **J Neurosci.**, v. 22, n. 16, p. 7308-7320, 2002.
- REZNIKOV, L.R. et al. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. **Eur J Neurosci.**, v. 25, p. 3109-3114, 2007.
- RICHARD, D.; BOURQUE, C.W. Synaptic activation of rat supraoptic neurons by osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis. **Neuroendocrinology**, v. 55, n. 5, p. 609-611, 1992.
- RICHTER, C.P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **Am J Physiol.**, v. 115, p. 155-161, 1936.
- ROBINSON, B.W.; MISHKIN, M. Alimentary responses to forebrain stimulation in Monkeys. **Exp Brain Res.**, v. 4, p. 330-336, 1968.
- ROGOZ, Z. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of 7-OH-DPAT, preferential dopamine D3 receptor agonist, in rats. **Pol J Pharmacol.**, v. 56, p. 519-526, 2004.
- ROOZENDAAL, B. et al. Stress, memory and the amygdala. **Nature Rev.**, v. 10, p. 423-433, 2009.
- ROUAH-ROSILIO, M. et al. Serotonergic modulation of sodium appetite in the rat. **Physiol Behav.**, v. 55, n. 5, p. 811-816, 1994.
- RUBINO, T. et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, p. 1292-1301, 2008.
- SAAD, W.A. et al. Participation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ adrenoreceptor of the lateral hypothalamic area in water intake, and renal sodium, potassium and urinary volume excretion induced by central administration of angiotensin II. **Brain Res Bull.**, v. 6, p. 491-497, 2000.

- SAAD, W.A. et al. Interaction between supraoptic nucleus and septal area in the control of water, sodium intake and arterial blood pressure induced by injection of angiotensin II. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 77, p. 667-674, 2004.
- SAAVEDRA, J.M. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 25, p. 485-512, 2005.
- SAKAI, R.R. et al. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. **Behav Neurosc.**, v. 101, p. 724-731, 1987.
- SAKANAKA, M. et al. Corticotropin release factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobal-glucose oxidase-diaminobenzidine method. **J Comp Neurol.**, v. 260, p. 256-298, 1987.
- SALCHNER, P.; SINGEWALD, N. Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. **Neuropharmacol.**, v. 43, p. 1238-1248, 2002.
- SALCHNER, P.; SINGEWALD, N. 5-HT receptor subtypes involved in the anxiogenic-like action and associated Fos response of acute fluoxetine treatment in rats. **Psychopharmacology**, v. 185, n. 3, p. 282-288, 2006.
- SALY, V.; ANDREW, R.D. CA3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolality. **J Neurophysiol.**, v. 69, n. 6, p. 2200-2208, 1993.
- SANTOS, C.J. et al. Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus. **Behav Pharmacol.**, v. 19, n. 4, p. 357-360, 2008.
- SARA, S.J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nature**, v. 10, p. 211-223, 2009.
- SATO, M.A. et al. Antagonismo f clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. **Braz J Biol Med Res.**, v. 29, p. 1663-1666, 1996.
- SAYER, R.J. et al. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: response to transmitters. **Am J Physiol.**, v. 247, p. 374-379, 1984.
- SCHRAMM, N.L. et al. The α 2A-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. **J Neurosci.**, v. 21, n. 13, p. 4875-4882, 2001.
- SEEN, V. et al. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, v. 81, p. 428-437, 2014.
- SHARIF-NAENI, R. et al. An N-terminal variant channel is required for osmosensory transduction. **Nat Neurosci.**, v. 9, n. 1, p. 93-98, 2006.
- SHEARD, M.H.; FLYNN, J.P. Facilitation of attack behavior by stimulation of the midbrain of cats. **Brain Res.**, v. 4, p. 324-333, 1967.
- SHIN, J.W. et al. Inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. **J Comp Neurol.**, v. 511, p. 628-657, 2008.
- SHIRREFFS, S.M. et al. The effects of fluid restriction on hydration status and subjective feelings in man. **British J Nutri.**, v. 91, p. 951-958, 2004.
- SHISHKINA, G.T. et al. Effects of antisense to the α 2A-adrenoreceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats. **J Neurosci.**, v. 21, n. 2, p. 726-731, 2001.

- SILVA, P. Farmacologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2009.
- SILVEIRA, M.C.L. et al. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus maze. **Beh Brain Res.**, v. 56, p. 115-118, 1993.
- SINGEWALD, N.; SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by FOS immunocytochemistry. **Neuroscience.**, v. 98, n. 4, p. 759-770, 2000.
- SMELLIE, W.S.A. et al. Best practice in primary care pathology: review 11. **J Clin Pathol.**, v. 61, p. 410-418, 2007.
- SMITH, P.M. et al. Subfornical organ stimulation elicits drinking. **Brain Res Bull.**, v. 38, n. 3, p. 209-213, 1995.
- SOARES, V.P.; ZANGROSSI Jr, H. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Res Bull.**, v. 64, p. 161-168, 2004.
- SOARES, V.P.; ZANGROSSI Jr., H. Stimulation of 5-HT1A or 5-HT2 in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-effect in rats. **Behav Brain Res.**, v. 197, p. 178-185, 2009.
- SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspective from the field. **J Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.
- SON, D.J. et al. Antiplatelet activity of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai*-derived component against platelet aggregation. **J Microbiol Biotech.**, v. 15, p. 425-7, 2005.
- SOUTHWICK, S.M. et al. Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 266-274, 1993.
- SOUTHWICK, S.M. et al. Noradrenergic and serotonergic function in posttraumatic stress disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, n. 8, p. 749-758, 1997.
- STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advan in Physiol Edu.**, v. 28, p. 155-159, 2004.
- STRATFORD, T.R.; KELLEY, A.E. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. **J Neurosci.**, v. 17, n. 11, p. 4434-4440, 1997.
- STRATFORD, T.R.; WIRTSHAFTER, D. Opposite effects on the ingestion of ethanol and sucrose solutions after injections of muscimol into the nucleus accumbens shell. **Behav Brain Res.**, v. 216, n. 2, p. 514-518, 2011.
- STRICKER, E.M. et al. Rats with area postrema lesions have lengthy eating and drinking bouts when fed ad libitum: implications for feedback inhibition of ingestive behavior. **Behav Neurosci.**, v. 111, n. 3, p. 623-632, 1997.
- STRICKER E.M.; SVED A.F. Thirst. **Nutrition**, v. 16, n. 10, 821-826, 2000.
- STRICKER, E.M.; HOFFMANN, M.L. Presystemic signals in the control of thirst, salt appetite, and vasopressin secretion. **Physiol Behav.**, v. 91, p. 404-412, 2007.
- STROTMANN, R. et al. TRPC4, a non selective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. **Nat Cell Biol.**, v. 2, n. 1, p. 695-702, 2000.
- STUTZMANN, G.E. et al. Serotonin modulation of sensory inputs to the lateral amygdala: dependency on corticosterone. **J Neurosci.**, v. 18, n. 22, p. 9529-9538, 1998.

- SUGAWARA, A.M. et al. Noradrenaline and mixed α 2-adrenoreceptor / imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. **Brain Res.**, v. 839, p. 227-234, 1999.
- TANAKA, J. et al. Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Res Bull.**, v. 45, n. 3, p. 315-318, 1998.
- TANAKA, J. et al. Activation of serotonergic pathways from the midbrain raphe system to the subfornical organ by hemorrhage in the rat. **Exp Neurol.**, v. 169, n. 1, p. 156-162, 2001.
- TANAKA, J. et al. Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. **Neurosci Lett.**, v. 357, n. 1, p. 41-44, 2004.
- TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, n. 4, p. 1352-64, 2006.
- TERZIAN, A.L.B. et al. Modulation of anxiety-like behaviour by transient receptor potential vallinoid type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal grey. **Eur Neuropsychopharmacol.**, v. 19, p. 188-195, 2009.
- THILFFORS, M. et al. Cerebral blood flow in subjects with social phobia during stressful speaking tasks: a PET study. **Am J Psychi.**, v. 158, n. 8, p. 1220-1226, 2001.
- THRASHER, T.N. et al. Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism?. **Am J Physiol.**, v. 238, n. 5, p. 333-339, 1980.
- THRASHER, T.N. et al. Lesions of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically-induced drinking and vasopressin secretion in the dog. **Endocrinology**, v. 110, n. 5, p. 1837-1839, 1982.
- THRASHER, T.N. Role of forebrain circumventricular organs in body fluid balance. *Acta Physiol. Scand.* v. 136, p. 141-150, 1989.
- THRONTON, S.N. et al. Mineralocorticoid modulation of central angiotensin-induced neuronal activity, water intake and sodium appetite. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, n. 5, p. 699-705, 2007.
- THUNHORST, R.L. et al. Angiotensin converting enzyme in subfornical organ mediates captopril-induced drinking. **Behav Neurosci.**, v. 103, p. 1302-1310, 1989.
- THUNHORST, R.L. et al. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am J Physiol.**, v. 274, n. 6, p. 1807-1814, 1998.
- TÓTH, A. et al. Expression and distribution of vallinoid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Mol Brain Res.**, v. 135, p. 162-168, 2005.
- TRABACE, L. et al. Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats. **Toxic App Pharmac.**, v. 255, p. 169-175, 2011.
- TREIT, D. et al. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. **Pharmacol Bioch Behav.**, v. 44, p. 463-469, 1993.
- TREIT, D. et al. Does the bed nucleus of stria terminalis mediate fear behaviors? **Behav Neurosci.**, v. 112, p. 379-386, 1998.
- TULLY, K.; BOLSHAKOV, V.Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Mol Brain**, v. 3, p. 15, 2010.

- TURK, E.E. et al. Fatal hyponatremia after using salt as an emetic: report of three autopsy cases. **Leg Med.**, v. 7, p. 47-50, 2005.
- TYE, K.M. et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 471, p. 358-362, 2011.
- ULTEE, A. et al. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environm Microb**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.
- UPADHYAY, A. et al. Incidence and prevalence of hyponatremia. **Am J Med.**, v. 119, n. 7A, p. s30-s35, 2006.
- UROZ, V. et al. Chemical anatomy of human paraventricular thalamic nucleus. **Synapse**, v. 51, p. 173-185, 2004.
- VAN DER WEE, N.J. et al. Increased serotonin and dopamine transporter binding in psychotropic medication – naïve patients with generalized social anxiety disorder shown by 123IB-(4-Iodofenyl)-Trophane SPECT. **J Nucl Med.**, v. 49, p. 757-763, 2008.
- VAN DIJK, A. et al. Deep brain stimulation affects conditioned and unconditioned anxiety in different brain areas. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e289, 2013.
- VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **J Comp Neurol.**, v. 428, p. 191-212, 2000.
- VENTURA-SILVA, A.P. et al. Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. **Front Behav Neurosci.**, v. 7, p. 32, 2013.
- VERTES, R.P.; HOOVER, W.B. Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 508, p. 212-237, 2008.
- VERTES, R.P. et al. Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat. **Brain Struct Funct.**, v. 215, p. 1-28, 2010.
- VIVAS, L. et al. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. **Brain Res.**, v. 519, p. 294-300, 1990.
- VOGT-EISELE, A.K. et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. **Bri J Pharmac.**, v. 151, p. 530-540, 2007.
- VORONOVA, I.P. et al. Thermosensitive TRP channels gene expression in hypothalamus of normal rats and rats adapted to cold. **Russ Fiziol Zh IM Sechenova**, v. 98, n. 9, p. 1101-1110, 2012.
- WAGNER, H. et al. In vitro inhibition of prostaglandin biosynthesis by essential oils and phenolic compounds. **Planta Med.**, v. 52, p. 184-7, 1986.
- WAINWRIGHT, A. et al. Discrete expression of TRPV2 within the Hypothalamo-Neurohypophysial system: implications for regulatory activity within the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **J Comp Neurol.**, v. 474, p.24-42, 2004.
- WAISE, R.A. Dopamine, learning and motivation. **Behav Neurosci.**, v. 5, p. 1-12, 2004.
- WAKERLEY, J.B. et al. Comparisons of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurons during progressive dehydration. **Brain Res.**, v. 148, n. 2, p. 425-440, 1978.

- WALKER, D.L.; DAVIS, M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in the startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. **J Neurosci.**, v. 17, p. 9375-9383, 1997.
- WALL, P.M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety like behavior. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 25, p. 275-286, 2001.
- WANG, D.V. et al. Neurons in the amygdala with response selectivity for anxiety in two ethologically based tests. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. :e18739, 2011.
- WANG, L. et al. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. **Brain Res.**, v. 1415, p. 34-46, 2011.
- WEBB, A.K. et al. Iatrogenic nondiabetic hyperosmolar states. **J of Royal Soci of Med.**, v. 72, p. 578-586, 1976.
- WEISINGER, R.S. et al. Neurobiology of sodium appetite; em “Neurobiology of food and fluid intake”, 2nd ed, Kluwer Academic, **Plenum Publishers**, v. 14, p. 545-585, 2004.
- WELLMAN, C.L. et al. Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knockout mice. **J Neurosci.**, v. 27, n. 3, p. 684-691, 2007.
- WERME, M. et al. FosB regulates wheel running. **J Neurosci.**, v. 21, n. 18, p. 8133-8138, 2002.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.
- WIRTSHAFTER, D. et al. Effects of muscimol in the nucleus accumbens shell on salt appetite and sucrose intake: a microstructural study with a comment on the sensitization of salt intake. **Behav Neurosci.**, v. 126, n. 5, p. 699-709, 2012.
- WOLF, G. Sodium appetite elicited by aldosterone. **Psycon Sci.**, v. 1, p. 211-212, 1964.
- WRIGHT, S.K; SCHROETER, S. Hyponatremia as a complication of selective serotonin reuptake inhibitors. **J Am Acad Nurs Practi.**, v. 20, p. 47-51, 2008.
- XU, Z.; HERBERT, J. Regional suppression by water intake of c-fos expression induced by intraventricular infusions of angiotensin II. **Brain Res.**, v. 659, p. 157-168, 1994.
- XU, Z.; XINGHONG, J. Drinking and FOS-immunoreactivity in rat brain induced by local injection of angiotensin I into the subfornical organ. **Brains Res.**, v. 817, p. 67-74, 1999.
- XU, H. et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. **Nature**, v. 418, p. 181-186, 2002.
- XU, H. et al. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activates specific TRP channels. **Nature**, v. 9, n. 5, p. 628-635, 2006.
- YADA, M.M. et al. Central alpha-adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 57, n. 1-2, p. 137-43, 1997.
- YERKES, R.M.; DODSON, J.D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit formation. **J Comp Neurol Psychol.**, v. 18, p. 459-482, 1908.

YU, H. et al. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e33584.

ZARDETTO-SMITH, A.M. et al. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Res.**, v. 645, p. 123-134, 1994.

ZHAO, J. et al. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnol Adv.**, Jun; v. 23, n. 4, p. 283-333, 2005.

ZOTTI, M. et al. Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. **Molecules**, v. 18, p. 6161-6172, 2013.