

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Paola Fernandes

**SUBSTRATOS NEURAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DA INTERAÇÃO SOCIAL  
SOBRE A SINCRONIZAÇÃO FÓTICA DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO E  
SEUS EFERENTES DE CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte – MG  
2022

Paola Fernandes

**SUBSTRATOS NEURAI ENVOLVIDOS NO EFEITO DA INTERAÇÃO SOCIAL  
SOBRE A SINCRONIZAÇÃO FÓTICA DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO E  
SEUS EFERENTES DE CAMUNDONGOS**

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte – MG  
2022

043

Fernandes, Paola.

Substratos neurais envolvidos no efeito da interação social sobre a sincronização fótica do núcleo supraquiasmático e seus eferentes de camundongos [manuscrito] / Paola Fernandes. – 2022.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Sistema Nervoso Central. 3. Ritmo Circadiano. 4. Relações Interpessoais. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 355 DE PAOLA FERNANDES**

Às 09:00 horas do dia **15 do mês de fevereiro de 2022**, transmitida por webconferência pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Paola Fernandes**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. José Cipolla Neto**, Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. John Fontenele Araújo**, DFS/Universidade Federal do Rio Grande do Norte, **Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Substratos Neurais Envolvidos No Efeito da Interação Social Sobre A Sincronização Fótica do Núcleo Supraquiasmático e Seus Eferentes de Camundongos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 15 de fevereiro de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 18/02/2022, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **John Fontenele Araujo, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Cipolla Neto, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1232501** e o código CRC **CCF3222C**.

## AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de iniciar este texto agradecendo aos meus pais, Aluísio e Elizabete, por todo apoio, amor incondicional, carinho, paciência e dedicação que sempre tiveram comigo. Espero um dia poder retribuir tudo o que vocês já fizeram por mim.

Apesar de não ser uma pessoa muito religiosa, sinto que sou abençoada por Deus. Por isso agradeço a Ele por sempre colocar no meu caminho pessoas incríveis, e me dar forças sempre que eu achei que não a tinha mais.

Agradeço ao meu irmão Igor, minha alma gêmea, por todos os momentos de amizade, conselhos, risadas, e por me acalmar em momentos de pânico. Você é meu orgulho!

Agradeço à minha orientadora, Maristela, a qual eu tenho muito carinho e admiração. Você é uma das mulheres mais fortes que já tive a honra de conhecer, e eu sou muito grata por você ter me aceitado como sua aluna, lá em 2015. Obrigada por todo o conhecimento, paciência, generosidade, carinho, preocupação e presença. Eu espero que nós continuemos trabalhando juntas, e que a amizade que foi construída ao longo desses anos só se fortaleça.

Aos maiores tesouros que a pós-graduação me deu: Nayara, Thaís e Fernando. Com vocês eu dei as minhas melhores risadas, chorei, desabafei, aconselhei, recebi conselhos e tirei fotos maravilhosas no ICB (graças ao Fernando). Vocês fizeram a minha jornada acadêmica mais leve. Agradeço especialmente à Nayara e Thaís pelos quase sete anos de amizade, por todos os dias e noites passadas no ICB fazendo experimento, rindo e comendo besteiras. Nayara é a minha voz da razão e Thaís a do coração. Vocês me completam! Ao Fernando, eu agradeço por todas as vezes que você me enalteceu quando eu me sentia pra baixo, que não foram poucas. Você é uma pessoa admirável, profissionalmente e como ser humano, e eu tenho muita sorte em poder te chamar de amigo!

Agradeço à Flavinha, vulgo benzinho, pela alegria sempre contagiante e por toda a ajuda ao longo de todos esses anos. Você é um ser de luz que merece todo o amor e sucesso do mundo!

Ao aluno de mestrado Tito, que está conosco desde a iniciação científica. Obrigada pela convivência e por estar sempre disposto a ajudar.

A todos os membros do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, desde os alunos aos professores, que sempre estiveram presentes ao longo desses anos contribuindo pro meu

crescimento profissional e pessoal. Agradecimento especial às alunas Paloma, Kaoma, Patrícia, Mariana, Roberta e Tamires que neste último ano foram refúgio e aconchego.

Agradeço aos alunos (as) do Laboratório de Hipertensão, Sthéfanie, Filipe, Cristiane e Héric, que junto comigo, Nayara, Thaís e Bruna formaram o “rolê” mais doido que Ribeirão Preto já viu. Vocês são pessoas incríveis que também fizeram dos meus últimos anos de doutorado muito felizes.

Agradeço imensamente à minha psicóloga, Ana Luiza, por estar comigo neste último ano, e, apesar do pouco tempo, já ter feito uma grande mudança na minha vida, me empoderando como mulher e como profissional.

Aos membros do Laboratório de Neurobiologia do ICB-USP, especialmente a Maria Nathália pela troca de conhecimento e colaboração. Você é uma mulher brilhante e que eu admiro muito.

Também agradeço a toda minha família pelo amor e carinho ao longo dos meus 29 anos.

Ao bioterista Sílvio que nunca mediu esforços pra me ajudar a conseguir caixas e garrafinhas pra começar meus experimentos, e por cuidar tão bem dos nossos animais.

Ao secretário Tiago pela presteza.

A todos os professores do PGFisfar por todo conhecimento compartilhado.

A banca examinadora por cederem seu tempo valioso para avaliar o meu trabalho e compartilhar conhecimento.

A CAPES e CNPq pelo financiamento, e a CAPES pela bolsa de estudos.

Ao povo brasileiro que financia a pesquisa no Brasil.

## RESUMO

A interação social está entre as pistas temporais não fônicas capazes de alterar a atividade neuronal do núcleo supraquiasmático (SCN) levando a alteração nos ritmos de atividade e temperatura arrastados ao ciclo claro e escuro. O presente estudo teve como objetivo central identificar os substratos neurais envolvidos com o efeito da interação social sobre a sincronização fônica do SCN de camundongos, bem como sobre os eferentes do SCN envolvidos com a termorregulação, e concomitantemente com o estado de alerta, controle do estresse e processamento da recompensa. Para isso, camundongos C57Bl6/J adultos na presença da interação social entre seus co-específicos foram mantidos por 28 dias em grupos de 3-4 animais por caixa (Grouped-housed ou GH) ou na ausência desta pista temporal, isolados em suas caixas (Single-housed ou SH) sob ciclo de 12 h de fase de claro e 12 h de fase de escuro (CEUA/UFMG nº 11/2018). Ao final deste protocolo, os animais foram perfundidos transcardialmente para fixação do cérebro, o qual foi processado para identificação de neurônios imunorreativos para c-FOS (proteína indicadora de atividade neuronal), para a enzima tirosina-hidroxilase (marcadora de neurônios catecolaminérgico), para vasopressina (AVP) e para o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) por imunohistoquímica. Um outro grupo de animais GH ou SH foi eutanasiado por decapitação. Destes animais, os cérebros foram obtidos para microdissecção do SCN e do núcleo accumbens (NAcc), onde foram mensurados serotonina (5-HT), dopamina (DA) e seus metabólitos, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), respectivamente, por HPLC. Animais SH apresentaram uma diminuição na percentagem de neurônios vasopressinérgicos que expressam c-Fos no SCN no *zeitgeber time* (ZT) 2, enquanto, a expressão de VIP foi similar àquela dos animais GH, indicando que a interação social ativa seletivamente neurônios vasopressinérgicos no início da fase de luz. O número de neurônios imunorreativos (ir) para c-Fos na área pré-óptica (POA) foi similar entre os animais GH e SH, apesar de os animais SH ganharem menos peso corporal ao longo do protocolo de isolamento, sugerindo que esta região cerebral não participa deste fenótipo observado. Por outro lado, o isolamento social foi capaz de reduzir o número de neurônios vasopressinérgicos que expressam c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em ambos os horários estudados, ZT2 e ZT14. Somado ao resultado que os animais SH apresentaram redução no número de neurônios positivos para TH que expressam c-Fos no locus coeruleus (LC), podemos inferir que a interação social ativa circuitos envolvidos com os estados de alerta/vigília e de respostas ao estresse (PVN-LC). Além disso, observamos um aumento da razão 5-HIAA/5HT e DOPAC/DA no SCN de animais SH no ZT2, sugerindo um *turnover*

aumentado de 5-HT e DA no início da fase de luz. Já no NAcc, estas razões mostraram-se elevadas nos animais SH no ZT14, o que possivelmente esteja envolvido com o aumento do estado de alerta do início da fase escura. Concluimos que os neurônios vasopressinérgicos do SCN participam do efeito da interação social em manter a atividade neuronal do SCN no início da fase de luz. Uma redução desta atividade observada durante o isolamento social parece comprometer a atividade de regiões eferentes do SCN que têm relação com a regulação do estado de alerta, com o comportamento social, recompensa e as repostas ao estresse. Além disso, a presença da interação social garante um tônus serotoninérgico e dopaminérgico adequado no SCN, que pode estar envolvido com a resposta fótica deste núcleo durante o arrasamento ao ciclo claro e escuro. Portanto, o estabelecimento e a manutenção de vínculos sociais são importantes não apenas para a manutenção da saúde, qualidade de vida e sobrevivência, mas também para sustentar o funcionamento apropriado do relógio central.

**Palavras chaves:** pistas não-fóticas, interação social, marcapasso central, fotoarrastamento

## ABSTRACT

Social interaction is among the non-photic temporal cues capable of altering the neuronal activity of the suprachiasmatic nucleus (SCN), which leads to changes in activity and temperature light and dark (LD)-entrained rhythms. The present study aimed to identify the neural substrates involved with the effect of social interaction on the SCN photic synchronization, as well as on the SCN-efferents involved with thermoregulation and alertness. For this, adult C57Bl6/J mice in the presence of social interaction among their conspecifics were kept in groups of 3-4 animals (Grouped-housed or GH) or in the absence of this temporal cue, isolated in their boxes (Single-housed or SH) for 28 days under 12:12 h LD cycle (CEUA/UFGM n° 11/2018). At the end of this protocol, animals were transcardially perfused for fixation of the brains, which were processed to identify neurons labeled for c-FOS (protein indicator of neuronal activity), for the enzyme tyrosine-hydroxylase (marker of catecholaminergic neurons), for vasopressin (AVP) and for the vasoactive-intestinal polypeptide (VIP) by immunohistochemistry. Another group of GH or SH animals was euthanized by decapitation. From these animals, brains were obtained for microdissection of the SCN and nucleus accumbens (NAcc), where serotonin (5-HT) and dopamine (DA) and their metabolites, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), respectively, were measured by HPLC. SH animals showed a decrease in the percentage of vasopressinergic neurons expressing c-Fos in the SCN at zeitgeber time (ZT) 2, while the expression of VIP was similar to that observed in GH animals, indicating that social interaction selectively activates vasopressinergic neurons at the beginning of the light phase. The number of c-Fos immunoreactive (ir) neurons in the preoptic area (POA) was similar in GH and SH animals. On the other hand, social isolation was able to reduce the number of vasopressinergic neurons that express c-Fos in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) at both times studied, ZT2 and ZT14. Added to the result that SH animals showed a reduction in the number of TH positive neurons that express c-Fos in the locus coeruleus (LC), we can infer that social interaction activates circuits involved with alertness/wakefulness and stress responses (PVN-LC). Furthermore, we observed an increase in the 5-HIAA/5HT and DOPAC/DA ratio in the SCN of SH animals in the ZT2, suggesting an increased turnover of 5-HT and DA at the beginning of the light phase. In NAcc, these ratios were high in SH animals in ZT14, which is possibly involved with the increase in alertness at the beginning of the dark phase. We conclude that vasopressinergic neurons in the SCN participate in the effect of social interaction in maintaining SCN neuronal activity at the beginning of the light phase. A reduction

in this activity observed during social isolation seems to compromise the activity of SCN efferents involved with alertness; social behavior; reward and stress. Furthermore, the presence of social interaction ensures adequate serotonergic and dopaminergic tone in the SCN, which may be involved with the photic response of this nucleus during synchronization to the light and dark cycle. Therefore, the establishment and maintenance of social bonds are important not only for the maintenance of health, quality of life and survival, but also for sustaining the proper functioning of the central clock.

**Key words:** non-photic cues, social interaction, central pacemaker, photoentrainment

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Principais características de ritmos biológicos.</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> <i>Representação das curvas fase resposta fótica e não fótica.</i> .....	19
<b>Figura 3:</b> <i>Luz e a interação social atuam em conjunto para garantir a ativação dos neurônios do d-SCN e a sincroniza de fase entre os ritmos diários de SLA e Tc</i> .....	28
<b>Figura 4:</b> <i>Possíveis substratos neurais envolvidos no efeito da interação social sobre a sincronização fótica do SCN de camundongos..</i> .....	35
<b>Figura 5:</b> <i>Representação esquemática do delineamento descrito em 5.1.</i> .....	41
<b>Figura 6:</b> <i>Representação esquemática do delineamento descrito em 5.2.</i> .....	42
<b>Figura 7:</b> <i>O isolamento social reduz a atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN no ZT2</i> .....	44
<b>Figura 8:</b> <i>O isolamento social não altera a VIP-IOD no SCN em ciclo claro e escuro de 12:12h.</i> .....	45
<b>Figura 9:</b> <i>O isolamento social não altera a atividade neuronal da POA em ciclo claro e escuro 12:12h,</i> .....	46
<b>Figura 10:</b> <i>O isolamento social reduz a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN no ZT2 e ZT14.</i> .....	48
<b>Figura 11:</b> <i>O isolamento social reduz o número de neurônios TH-ir que expressam c-Fos-ir no LC no ZT2</i> .....	49
<b>Figura 12:</b> <i>O isolamento social aumenta a atividade dos terminais serotoninérgicos no SCN no ZT2.</i> .....	51
<b>Figura 13:</b> <i>O isolamento social aumenta a atividade dos terminais dopaminérgicos no SCN no ZT2</i> .....	52
<b>Figura 14:</b> <i>O isolamento social aumenta a atividade dos terminais serotoninérgicos e dopaminérgicos no NAcc no ZT14</i> .....	53
<b>Figura 15:</b> <i>O isolamento social aumenta a atividade dos terminais serotoninérgicos e dopaminérgicos no NAcc no ZT14</i> .....	54
<b>Figura 16:</b> <i>O isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h altera a atividade neuronal de áreas relacionadas ao estado de alerta e comportamento social (PVN e LC), além de aumentar a atividade de terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos no marcapasso central (SCN) e no principal centro de recompensa do cérebro (NAcc), de maneira horário dependente.</i> .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

3V – terceiro ventrículo

5-HIAA – ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT – 5-hidroxitriptamina ou serotonina

AMPC - adenosina monofosfato cíclico

ARC – núcleo arqueado

AVP – arginina-vasopressina

BAT – tecido adiposo marrom

BMAL1 - *Brain and muscle Arnt-like protein 1*

CLOCK - *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPC

CRF – fator de liberação de corticotrofina

CRY1 – *Cryptochrome1*

CRY2 – *Cryptochrome 2*

CT – *circadian time*

DA – dopamina

DMH – hipotálamo dorsomedial

DOPAC - Ácido 3,4-di-hidroxiifenilacético

DRN – núcleo dorsal da rafe

d-SCN – porção dorsal do SCN

FAA - comportamento antecipatório à comida

GABA - ácido gama-aminobutírico

GH – *group-housed*

HPA – hipotálamo – pituitária – hipófise

IEGs – genes de expressão imediata

IOD - densidade óptica integrada

ipRGCs - células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina

ir – imunorreatividade

LC – locus coeruleus

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno p42/44

MnPO – núcleo pré-óptico mediano

MRN – núcleo mediano da rafe

NA – noradrenalina

NAcc – núcleo accumbens

NREM - movimento não rápido dos olhos

OPNS-5 - neuropsina sensível a violeta

OT – ocitocina

PACAP - peptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário

PER1 – *Period 1*

PER2 - *Period 2*

PK2 - *prokinectina 2*

POA - área pré-óptica

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

qo – quiasma óptico

REV-ERB $\alpha$  - *orphan nuclear receptor*

ROR – *Retinoic acid -related orphan receptor*

SCN – núcleo supraquiasmático

SH – single-housed

SLA – atividade locomotora espontânea

SPVZ - zona sub-paraventricular

Tc – temperatura corporal

TH – tirosina hidroxilase

TRH – Trato retinohipotalâmico

UCP1 - proteína desacopladora-1

VIP – polipeptídeo vasointestinal

v-SCN – porção ventral do SCN

VTA – área tegmental ventral

ZT – *Zeitgeber time*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1. Funcionamento do sistema circadiano .....	16
2.2. Relógio circadiano central: núcleo supraquiasmático (SCN) .....	21
2.3. Papel da interação social na sincronização do sistema circadiano.....	25
2.4. Substrato neural envolvidos na termorregulação e gasto energético .....	29
2.5. Substratos neurais envolvidos no estado de alerta e processamento de recompensa 29	
2.6. Substratos neurais envolvidos na transmissão do estímulo não fótico e sensibilidade do NSQ à luz .....	32
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	36
3.1. Objetivos específicos .....	36
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1. Animais .....	37
4.2. Perfusão transcardíaca e preparação dos cérebros para imunohistoquímica .....	37
4.3. Imunohistoquímica .....	38
4.4. Obtenção das imagens e contagem de células .....	39
4.5. Microdissecção das regiões onde se localizam o SCN e NAcc .....	39
4.6. HPLC e detecção eletroquímica.....	40
4.7. Análise dos dados .....	40
<b>5. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	41
5.1. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios na POA, de neurônios vasopressinérgicos no SCN e PVN e noradrenérgicos no LC, bem como sobre VIP-IOD no SCN em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h.....	41
5.2. Efeitos do isolamento social sobre os níveis de 5-HT, DA e seus metabólitos no SCN e NAcc em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h .....	41

<b>6. RESULTADOS</b> .....	43
6.1. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN em ciclo claro e escuro de 12:12h .....	43
6.2. Efeitos do isolamento social sobre VIP-IOD no SCN em ciclo claro e escuro de 12:12h.....	45
6.3. Efeitos do isolamento social sobre a atividade neuronal da POA em ciclo claro e escuro de 12:12h.....	46
6.4. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN e de neurônios noradrenérgicos no LC em ciclo claro e escuro de 12:12h....	47
6.5. Efeito do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN.....	49
6.6. Efeito do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no NAcc.....	52
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	55
7.1. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos e VIP-IOD no SCN .....	55
7.2. Efeitos do isolamento social sobre a atividade neuronal da POA no ZT2 e ZT14	57
7.3. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN no ZT2 e ZT14 .....	58
7.4. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios noradrenérgicos no LC no ZT2.....	61
7.5. Efeitos do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN e no NAcc no ZT2 e ZT14 .....	63
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	70
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	72

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A interação social diária é considerada uma pista temporal com função de arrastamento<sup>1</sup> e mascaramento<sup>2</sup> do sistema temporal circadiano. Na natureza indivíduos precisam se adaptar aos ritmos de atividade e repouso de seus parceiros sexuais, presas, predadores e familiares, permitindo a formação de grupos, sucesso na busca de alimentos e na reprodução, o que contribui para a evolução das espécies. (BLOCH et al., 2013; FAVREAU et al., 2009; REGAL; CONNOLLY, 1980). Portanto, a manutenção de vínculos sociais é de extrema importância para a sobrevivência de espécies sociais.

Isso se aplica também em seres humanos, uma vez que a manutenção de contatos sociais é de extrema importância para a saúde física e mental. Prova disso é que interações sociais e estímulos sociais positivos são considerados estímulos de recompensa social, uma vez que são capazes de ativar circuitos e regiões cerebrais envolvidos no processamento da recompensa, tanto em humanos quanto em roedores (GUNAYDIN et al., 2014; RADEMACHER et al., 2017). Por outro lado, o isolamento social (ou rejeição social) que leva ao sentimento de solidão é considerado um estado emocional aversivo em humanos e roedores, sendo frequentemente usado como forma de punição. Interessantemente, a solidão é considerada por especialistas como um desafio para a homeostase fisiológica, sendo comparada a outros estados motivacionais, como por exemplo, fome e sede (LEE; CHEN; TYE, 2021; TOMOVA et al., 2020).

A importância da interação social para a saúde e bem-estar fica clara quando estudamos os efeitos do isolamento social. Em seres humanos, por exemplo, o isolamento social e o sentimento de solidão estão associados a diversos problemas de saúde, tais como surgimento de sintomas depressivos e problemas cognitivos, prejuízo nas respostas inflamatórias, aumento na probabilidade de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, além de estar associado ao aumento no risco de mortalidade

---

<sup>1</sup> Capacidade do sistema circadiano se **sincronizar** a um estímulo ambiental em direção ao horário em que esse estímulo está sendo exposto ao organismo, sendo um evento que envolve a participação do marcapasso central (SCN), que recebe projeções diretas da retina permitindo o arrastamento fótico do sistema circadiano (ex: arrastamento ao ciclo claro e escuro) (LIU; LEWIS; KAY, 2007).

<sup>2</sup> Evento em que uma variável ambiental afeta um ritmo comportamental ou fisiológico de forma a não levar a um arrastamento, através de uma via que não envolve o marcapasso central (MROSOVSKY, 1999).

(DOMÈNECH-ABELLA et al., 2017; GE et al., 2017; STEPTOE et al., 2013; YANG et al., 2016).

Atualmente, devido as medidas de isolamento e distanciamento social recomendada pelos órgãos de saúde como alternativa de contenção da disseminação do novo coronavírus (SARS-Cov2) deixou evidente o quão é importante e vital o estabelecimento de vínculos sociais. Estudos recentes mostram que, além do isolamento social *per se*, o *lockdown* tem como consequência a limitação e desorganização da exposição a pistas temporais de arrastamento do sistema circadiano, como por exemplo, a exposição à luz solar e rotinas sociais, tendo como resultado o aumento de relato de sintomas depressivos e do sentimento de solidão, aumento do uso de dispositivos eletrônicos noite, mudanças no ciclo sono e vigília e redução na qualidade do sono (CELLINI et al., 2020; LEONE; SIGMAN; GOLOMBEK, 2020; MAJUMDAR; BISWAS; SAHU, 2020).

Mostramos recentemente que o isolamento social em camundongos leva a uma redução na atividade dos neurônios do relógio circadiano central (o núcleo supraquiasmático - SCN) no início da fase de claro, além de provocar alterações significativas em parâmetros circadianos do ritmo diário de temperatura interna (Tc) e alteração de fase entre os ritmos de atividade locomotora espontânea (SLA) e temperatura interna (FERNANDES et al., 2021). Portanto, a interação social garante a ativação apropriada dos neurônios do SCN na fase de claro, e mantêm a relação de fase apropriada entre os ritmos diários de SLA e Tc, controlados pelo relógio circadiano central (FERNANDES et al., 2021).

Frente ao exposto, faz-se importante investigar a fundo os efeitos da privação social sobre o funcionamento do sistema circadiano, uma vez que é bem estabelecida a importância da interação social para a sobrevivência e saúde, e de que existe uma relação íntima entre a perturbação do funcionamento do sistema circadiano e o surgimento de diversas doenças. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar os possíveis substratos neurais envolvidos no efeito da interação social sobre a atividade dos neurônios do SCN.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Funcionamento do sistema circadiano

Frente às variações de luminosidade do ambiente que caracteriza os dias e as noites, gerados pelo movimento da Terra em torno do seu próprio eixo, a maioria dos seres vivos evoluíram um sistema temporal circadiano (*circa diem*, cerca de um dia) capaz de gerar oscilação de aproximadamente 24 h em parâmetros fisiológicos e comportamentais. A principal função do sistema circadiano é antecipar e coordenar nosso organismo e comportamento de acordo com as mudanças ambientais de ciclo claro e escuro, disponibilidade de alimentos, interação social, temperatura ambiente, dentre outros estímulos ambientais periódicos, otimizando as respostas a estes estímulos (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; KALSBECK; FLIERS, 2013; VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001).

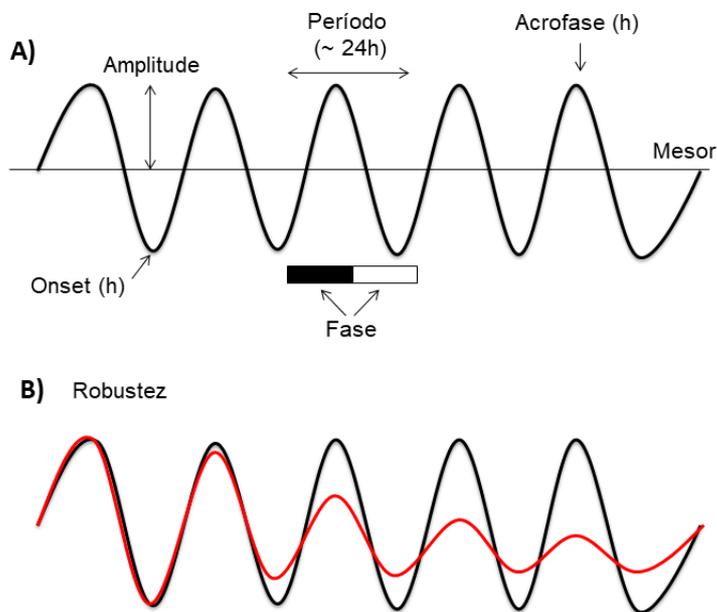
A luz ambiental é o principal agente de arrastamento do sistema temporal circadiano de mamíferos, também conhecido como *zeitgeber* fótico. Deste modo, os ritmos circadianos são arrastados ao ciclo claro e escuro diariamente, mas podem ser observados na ausência completa de luz, em condições de escuro constante, onde se observa um ritmo endógeno denominado o ritmo em livre curso ou *free-running* (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010). De acordo com a linha do tempo demonstrada por Roenneberg e Mellow (2005), um experimento simples realizado por Jacques d'Ortous De Mairan em 1729 foi o pioneiro a evidenciar que esses ritmos não são apenas uma mera resposta às mudanças periódicas do ambiente. Observando a abertura e fechamento das folhas da planta *Mimosa pudica*, De Mairan demonstrou que mesmo na ausência de um ciclo claro e escuro, o fenômeno de abertura e fechamento das folhas continuou ocorrendo de maneira diária (ROENNEBERG; MERROW, 2005). É importante mencionar que, em condições de escuro constante, chama-se de dia subjetivo a fase do período de aproximadamente 24 h em que o indivíduo está em repouso, e noite subjetiva a fase em que o indivíduo apresenta aumento da atividade, no caso de espécies noturnas (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

De modo geral, o sistema temporal circadiano funciona de forma hierárquica, com a presença de um relógio (ou marcapasso) circadiano central localizado no núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo em mamíferos, e os relógios periféricos localizados em cada célula do organismo fora do marcapasso. O SCN é arrastado

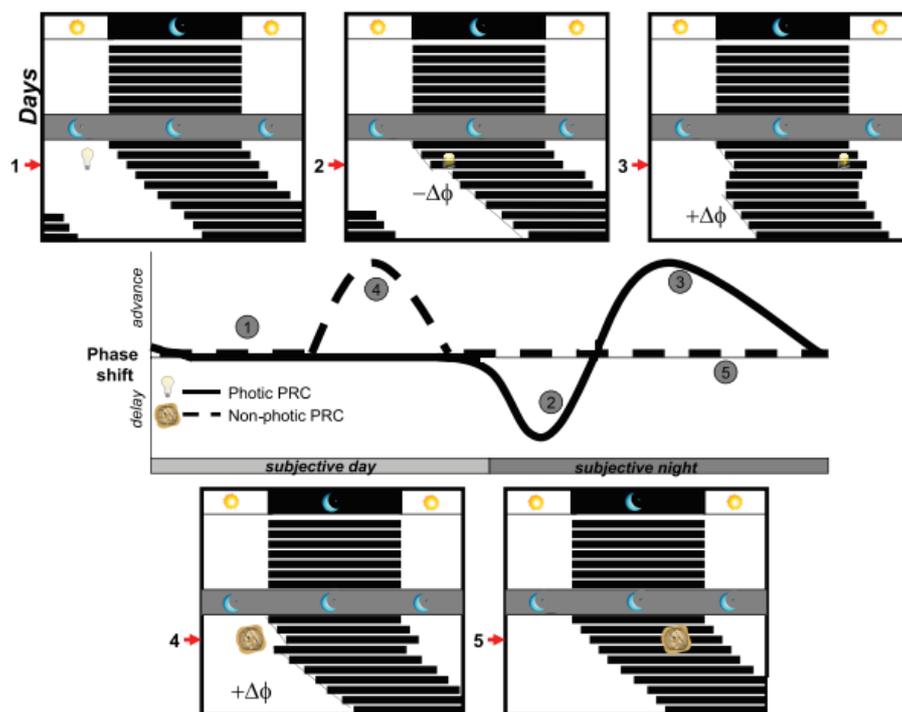
principalmente pelo ciclo claro e escuro, mas mantêm sua função de marcapasso em escuro constante, tendo a função de arrastar os ritmos circadianos fisiológicos e comportamentais frente ao ciclo claro e escuro ambiental. No entanto, outras pistas ambientais e endógenas contribuem para este fenômeno. Os chamados *zeitgebers* não fóticos, presentes no ambiente tais como: horário da alimentação, interação social, temperatura e atividade física. Há ainda *zeitgebers* não fóticos endógenos como os hormônios glicocorticoides e melatonina, os quais atuam como agentes reforçadores do arrastamento pela luz e são fundamentais para manter a sincronia de fase entre os múltiplos relógios periféricos (MISTLBERGER; ANTLE, 2011; MISTLBERGER; SKENE, 2004). Dentre eles, o papel da interação social ainda precisa ser mais bem esclarecido.

Num ritmo circadiano, o período equivale à duração de um ciclo completo de aproximadamente 24 h; a fase equivale à um instante do ciclo ou uma unidade temporal; o *onset* corresponde ao horário do ciclo em que uma variável rítmica começa a aumentar a partir dos seus níveis basais; e a acrofase caracteriza o horário do ciclo onde ocorre o máximo de uma variável (Figura 1A) (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997). Um estímulo será considerado um *zeitgeber* ou pista temporal se tiver a capacidade de alterar o período e a fase do oscilador (DAAN; PITTENDRIGH, 1976). Para isso, a pista temporal precisa arrastar a fase dos ritmos circadianos, em outras palavras, alterar a fase daquele ritmo nos dias subsequentes à sua exposição, sendo que a direção desta mudança de fase depende do *zeitgeber* a ser avaliado (fótico ou não-fótico) e do horário em que essa pista será apresentada. Por exemplo, roedores noturnos expostos a um pulso de luz no início ou no final da noite subjetiva, apresentam atraso ou avanço de fase do ritmo circadiano de atividade locomotora, respectivamente (Figura 2). No entanto, se esse mesmo pulso de luz é oferecido durante o dia subjetivo, não se observa nenhuma mudança de fase. Já no caso da exposição a um *zeitgeber* não fótico (como a atividade locomotora na roda, por exemplo) no meio ou final do dia subjetivo, se observa um avanço de fase do ritmo de atividade locomotora, e nenhuma alteração é observada quando a exposição a esse *zeitgeber* ocorre na noite subjetiva (Figura 2). Esse fenômeno de mudança de fase pode ser quantificado por meio da avaliação do *onset* do ritmo de atividade locomotora. Por exemplo, o *onset* será antecipado no caso de um avanço de fase ou adiado no caso de um atraso de fase,

permitindo a construção de uma curva de respostas dependentes das fases (Figura 2) (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MISTLBERGER; ANTLE, 2011).



**Figura 1: Principais características de ritmos biológicos.** (A) Mesor: estatística da estimativa da linha média do ritmo; amplitude: distância entre o mesor e o ponto máximo do ritmo; Período: tempo no qual um ritmo completa o seu ciclo; *Onset*: horário do dia em que uma variável começa a aumentar a partir dos seus níveis basais; Fase: equivale à posição dentro do ciclo, ou seja, a fase de repouso ou de atividade; Acrofase: horário do dia onde ocorre o pico de uma variável (B) Robustez: maior razão da variância observada em um período específico comparada com a variância total. Representa a estabilidade de uma variável oscilatória. A linha vermelha representa um ritmo com baixa robustez que é atenuada após alguns ciclos (Adaptado de KORF; VON GALL, 2016).



**Figura 2: Representação das curvas de respostas dependentes das fases fótica e não fótica.** Nos painéis superiores, estão representados actogramas de roedores noturnos que receberam pulso de no dia subjetivo (1), no início da noite subjetiva (2) e no final da noite subjetiva (3). Nos painéis inferiores, estão representados actogramas de roedores noturnos que foram submetidos à exposição à roda de atividade no dia subjetivo (4) e na noite subjetiva (5). A resposta à exposição ao pulso de luz ou a roda de atividade estão representados na curva fase resposta (painel do meio) onde a linha contínua representa a curva fase resposta fótica, e a linha pontilhada representa a curva fase resposta não fótica (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

Existem alguns exemplos práticos de como a alteração da exposição a um *zeitgeber* pode alterar a fase e o *onset* de um ritmo circadiano. Dentre os mais clássicos estão às experiências de *jetlag* e dos turnos de trabalho durante à noite, ou *shift work*. O *jetlag* ocorre em viagens transmeridionais, com dois ou mais fusos horários de diferença, e é caracterizado por um desalinhamento entre o sistema circadiano interno e o ciclo claro e escuro, acarretando em uma alteração brusca do ciclo sono e vigília. Ou seja, numa situação de *jetlag*, após um determinado período de tempo, o sistema circadiano do indivíduo precisa se arrastar ao novo ciclo claro e escuro, de jejum e alimentação e de interação social, por exemplo. Já numa situação de trabalho por turnos, em determinados dias da semana, o indivíduo trabalha na sua fase biológica de repouso (durante a noite), e tem o seu período de descanso durante a sua fase biológica de atividade (durante o dia). Portanto, essa inconstância no horário de dormir e acordar impede que o indivíduo se

arraste aos novos ciclo claro e escuro, de alimentação e jejum e interação social, causando uma perturbação no sistema circadiano, tendo como consequências a longo prazo alterações metabólicas cardiovasculares e mentais (KECKLUND; AXELSSON, 2016; REID; ABBOTT, 2015).

Além dos parâmetros circadianos já citados, existem outros que também podem ser avaliados quando se estuda uma variável rítmica dependendo do método de análise a ser utilizado. Dentre eles estão: a robustez, que equivale a uma análise estatística que avalia a estabilidade de uma variável oscilatória; o *mesor* que corresponde ao ponto médio entre os valores mais altos e mais baixos da curva coseno ajustada aos valores mensurados temporalmente; e a amplitude que corresponde à distância entre o *mesor* e o ponto máximo de uma variável oscilatória (Figura 1A e B) (REFINETTI, 2010).

Outro fenômeno que pode influenciar um ritmo circadiano é o mascaramento, que ocorre quando uma variável ambiental afeta um ritmo circadiano de forma direta, sem o envolvimento do marcapasso central (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MROSOVSKY, 1999). Um exemplo clássico é o mascaramento negativo causado pela exposição à luz na fase de escuro ou noite subjetiva em roedores noturnos em que o animal apresenta uma redução significativa da atividade locomotora durante o período de exposição à luz. Com o apagamento das luzes, o roedor volta a apresentar níveis de atividade compatíveis com aquele horário e seu cronotipo (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010). Também é possível observar o mascaramento frente à exposição de variáveis que aumentem a atividade locomotora, como por exemplo, à exposição à roda de atividade, interação social com coespecífico ou mudança de caixa (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MROSOVSKY, 1988). A exposição a qualquer uma destas variáveis durante a fase de claro ou dia subjetivo de um roedor noturno provoca aumento da atividade locomotora, conhecido como mascaramento positivo.

O mascaramento, assim como a capacidade de arrastamento do sistema circadiano frente às mudanças temporais do ambiente, pode ser considerado um componente evolutivo importante, uma vez que ambos conferem uma característica de plasticidade e adaptação temporal aos indivíduos na natureza (MARQUES; WATERHOUSE, 1994). Por exemplo, a interação social de *hamsters* machos com fêmeas no proestro, provoca mudança de fase do ritmo de atividade locomotora, ou seja, atua como um *zeitgeber* arrastando o sistema circadiano àquele estímulo (HONRADO; MROSOVSKY, 1991; MARQUES;

WATERHOUSE, 1994). Por outro lado, a exposição de grilos fêmea (*Teleognullus commodus*) a sinais sonoros de estridulação por 3h no mesmo horário do dia induz uma resposta direta na atividade locomotora, mas não provoca alteração nos dias subsequentes no ritmo de atividade em *free-running*, portanto, caracterizando uma resposta de mascaramento (LOHER, 2004; MARQUES; WATERHOUSE, 1994). Pensando num contexto evolutivo em que a reprodução é extremamente necessária para a perpetuação de uma espécie, nos dois exemplos citados os sinais sexuais provocaram um aumento do estado de alerta, e, possivelmente, um aumento da possibilidade de reprodução (MARQUES; WATERHOUSE, 1994).

Do ponto de vista celular, o sistema circadiano é codificado geneticamente pelas chamadas proteínas de relógio. Estas proteínas são autorreguladas por alças de retroalimentação positiva e negativa, e este processo de transcrição e tradução tem uma duração de aproximadamente 24 h. Algumas delas são: CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), BMAL1 (*Brain and muscle Arnt-like protein 1*), PER(*Period*) 1 e PER2, CRY(*Cryptochrome*) 1 e CRY2, REV-ERB $\alpha$  (*orphan nuclear receptor*) e ROR (*RAR-related orphan receptor*). A alça positiva é formada pelo heterodímero CLOCK e BMAL1, que se ligam a região regulatória E-box dos genes *Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2* ativando sua transcrição. Já a alça negativa, as proteínas CRY e PER saem do núcleo em direção ao citoplasma onde formam um heterodímeros, os quais inibem a sua própria transcrição através da inibição de CLOCK/BMAL1 no núcleo celular. As proteínas REV-ERB $\alpha$  e ROR constituem alças regulatórias, cuja transcrição é ativada pelo complexo CLOCK/BMAL1. As proteínas REV-ERB $\alpha$  e ROR, por sua vez, competem pelo sítio de ligação RORE de *Bmal1*, podendo reprimir ou ativar a transcrição de *Bmal1*, respectivamente (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

## **2.2. Relógio circadiano central: núcleo supraquiasmático (SCN)**

O SCN é considerado o relógio (ou marcapasso) circadiano central em mamíferos (STEPHAN; ZUCKER, 1972; VOGELBAUM; MENAKER, 1992), o qual recebe informações sobre a fotoperiodicidade ambiental através de projeções diretas vindas da retina pelo trato retino hipotalâmico (TRH) (MARKWELL; FEIGL; ZELE, 2010; MOORE; LENN, 1972; PANDA et al., 2003). As células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (ipRGCs) são um conjunto de células que compõem o TRH caracterizadas pela expressão do pigmento melanopsina. Resumidamente, a luz ativa a

melanopsina e desencadeia a despolarização da membrana das ipRGCs que transmite a informação fótica para o SCN através do neurotransmissor glutamato ou peptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário (PACAP), que por sua vez irão despolarizar neurônios da porção retinorecipientes do SCN (DO, 2019). Portanto, essa comunicação retina-SCN mantém um aumento da atividade dos neurônios do SCN durante a fase de claro - ou em resposta a um pulso de luz na fase de escuro - sendo responsável pelo arrastamento fótico.

Uma vez que o relógio central estiver arrastado ao fotoperíodo, os ritmos controlados por ele também serão arrastados, tais como os ritmos de liberação de hormônios como cortisol e melatonina, os ritmos diários de atividade locomotora espontânea (SLA) e temperatura corporal ( $T_c$ ), ciclo sono e vigília, e variações de memória e cognição, por exemplo (GREEN; GILLETTE, 1982; GROOS; HENDRIKS, 1982; PIGGINS; GUILDING, 2011; S et al., 1998).

Anatomicamente, o SCN de roedores está localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo (3V), medial e ventralmente, acima do quiasma óptico (qo), e contém aproximadamente 20000 neurônios que oscilam de maneira robusta e independente, o que confere a ele sua função de marcapasso e uma plasticidade que é fundamental para se adaptar às variações ambientais (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Os neurônios do SCN são heterogêneos em termos de síntese de neurotransmissores/neuropeptídeos. São identificadas duas porções distintas na região medial do núcleo: a porção ventral (v-SCN), caracterizada por neurônios que sintetizam polipeptídeo vasointestinal (VIP), e a porção dorsal (d-SCN) caracterizada por neurônios que sintetizam arginina vasopressina (AVP). O v-SCN recebe a informação luminosa pelo TRH, enquanto que do d-SCN partem as principais projeções do SCN para outras áreas cerebrais no hipotálamo e tronco encefálico (ABRAHAMSON; MOORE, 2001). Através de sinais neuroquímicos e junções comunicantes, v-SCN e d-SCN se comunicam e mantêm a sincronização entre os neurônios do marcapasso. Além de AVP e VIP, os neurônios do SCN sintetizam em sua maioria o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), além de calbidina, calretinina, peptídeo liberador de gastrina, neurotensina e prokinectina 2 (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; CHENG et al., 2002).

Os neurônios do SCN podem manter uma oscilação autônoma de taxa de disparo espontânea, concentração intracelular de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e expressão de genes de relógio,

quando isolados em cultura. No entanto, se a comunicação entre eles é mantida como no caso de culturas de fatias organotípicas, estes neurônios oscilam em sincronia (HASTINGS; MAYWOOD; BRANCACCIO, 2018), mostrando um acoplamento mútuo, gerando um período numa faixa mais estreita em torno de 24 h. Apesar disso, cada neurônio do SCN apresenta um período específico que varia entre 22h e 30h, o que confere ao SCN uma plasticidade que é fundamental para o sistema circadiano se sincronizar frente às mudanças ambientais, como no caso de alterações no ciclo claro e escuro, por exemplo (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012).

Além de provocar um aumento da frequência de disparos, como dito anteriormente, a luz provoca um aumento na expressão de c-Fos (GREEN; GILLETTE, 1982; GROOS; HENDRIKS, 1982; HUGHES et al., 2004). A proteína c-Fos é um fator de transcrição que faz parte da família de proteínas de expressão imediata (IEG), e é amplamente utilizada como marcador de atividade neuronal (SHENG; GREENBERG, 1990). Quando forma um heterodímero com um membro da família Jun de fatores de transcrição, c-Fos participa da regulação de genes de resposta tardia que contêm sítios de ligação AP-1 em suas regiões regulatórias, como por exemplo, a proteína de relógio PER1 (COX; TAKAHASHI, 2019; GINTY et al., 1993; RANSONE et al., 1989).

Portanto, considera-se que a proteína c-Fos tem uma importante função na cascata de sinalização que leva ao arrastamento induzido pela luz do SCN, e, em última análise, dos ritmos circadianos. Outra evidência que corrobora essa afirmação é de que pulso de luz no CT19, horário do ciclo circadiano em escuro constante que corresponde a 19 horas depois do início da fase de atividade em roedores de hábitos noturnos, provocou aumento da forma fosforilada da proteína de ligação ao elemento de resposta à adenosina monofato cíclico (AMPC), também conhecida como CREB. Esta proteína é um fator de transcrição que induz a expressão de c-Fos frente a estímulos que aumentam concentrações intracelulares de AMPC e  $Ca^{2+}$  (GINTY et al., 1993). Outra via de sinalização que participa da expressão de c-Fos é a via da proteína quinase ativada por mitógeno p42/44, ou via MAPK. Camundongos que tiveram essa via inibida farmacologicamente e receberam pulso de luz no ZT15 (3 horas após o início da fase de escuro, portanto, 3 horas após o início da fase de atividade de roedores noturnos) apresentaram uma redução significativa na expressão de c-Fos e outros IEGs induzida pela luz no SCN, indicando que a via MAPK tenha um papel indireto na transcrição de

IEGs e, conseqüentemente, na mudança de fase induzida pela luz do ritmo circadiano (DZIEMA et al., 2003).

A expressão de c-Fos também apresenta uma variação temporal no SCN. Por exemplo, em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h, o número de neurônios imunorreativos para c-Fos (c-Fos-ir) no SCN de roedores é significativamente maior na fase de claro em relação à fase de escuro, apresentando uma clara variação temporal (COLWELL; FOSTER, 1992; HUGHES et al., 2004; SCHWARTZ et al., 1994). Já em condições de escuro constante, existem trabalhos que mostram uma variação circadiana da c-Fos-ir no SCN (DUY et al., 2020), no entanto, quando o animal é mantido em escuro constante por muitos dias, essa variação é perdida e a c-Fos-ir é significativamente reduzida (COLWELL; FOSTER, 1992; FERNANDES et al., 2021).

Dessa forma, a rota luz > retina > TRH > ativação de cFos/Per1 no SCN arrasta o sistema circadiano. Já os *zeitgebers* não fóticos como por exemplo, a alimentação e a temperatura corporal/ambiente arrastam os relógios periféricos por vias que parecem não depender diretamente do SCN, tendo pouco ou nenhum efeito sobre o marcapasso central (BROWN et al., 2002; GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MORAN-RAMOS et al., 2016).

O horário da alimentação tem sido amplamente estudado pelo seu papel no arrastamento da expressão de genes metabólicos e de relógio em órgãos importantes para o metabolismo energético (MORAN-RAMOS et al., 2016). O protocolo de alimentação restrita à fase de repouso em roedores noturnos, por exemplo, induz mudança de fase na expressão de genes de relógio em órgãos periféricos, além de arrastamento o ritmo de atividade locomotora ao horário da alimentação. As evidências sugerem, no entanto, que este protocolo tem pouco ou nenhum efeito sobre o marcapasso central (DAMIOLA et al., 2000; MORAN-RAMOS et al., 2016). Por outro lado, a lesão bilateral do SCN de ratos com alimentação restrita à 2 h no meio da fase de claro (entre ZT6 e ZT8), causa comportamento antecipatório à comida (FAA - aumento da atividade locomotora pelo menos 1h antes da comida ser oferecida) e do ritmo de Tc, além de aumento no número de neurônios c-Fos-ir e PER1-ir no hipotálamo dorsomedial e no núcleo arqueado, dois importantes centros do controle alimentar, sugerindo um papel destes núcleos no arrastamento pela alimentação (ANGELES-CASTELLANOS et al., 2010). Quanto a temperatura ambiente, embora haja estudos mostrando que leve ao arrastamento de

relógios periféricos (BROWN et al., 2002; SAINI et al., 2012), não está estabelecida as vias neurais envolvidas.

Em relação a interação social, demonstramos recentemente que a interação social apresenta um efeito de mascaramento sobre a atividade dos neurônios do d-SCN, e atua em conjunto com a luz para manter a atividade dos neurônios do d-SCN no início da fase de claro e manter a sincronia de fase dos ritmos diários de SLA e Tc (FERNANDES et al., 2021). Nossos resultados apontam que, diferentemente das outras pistas não-fólicas, a interação social modula o sistema circadiano possivelmente através do controle da atividade do SCN no início da fase de claro. Este tópico será discutido a seguir com mais detalhes.

### **2.3. Papel da interação social na arrasamento do sistema circadiano**

O papel da interação social como *zeitgeber* não fólico já foi investigado através da avaliação da sua curva de respostas dependentes de fases. Hamsters noturnos da espécie *Mesocricetus auratus* foram isolados e expostos a 30 minutos de interação social com um coespecífico do mesmo sexo em diferentes horários ao longo de 24 h, e foi observada uma curva resposta típica de um *zeitgeber* não fólico: a interação social causou avanço de fase do ritmo de atividade locomotora no CT6 (6h após o início da fase de repouso), não provocou mudança de fase nos CT14 e CT18 (2h e 6h após o início da fase de atividade, respectivamente), no entanto, foi observado um atraso de fase no CT22 (10 h após o início da noite subjetiva) e CT2 (2 h após o início do dia subjetivo) (MROSOVSKY, 1988). Este mesmo trabalho demonstrou uma curva fase resposta semelhante para o estímulo de mudança de caixas, sugerindo que a resposta de mudança de fase causada pela interação social seja causada por aumento na atividade locomotora e/ou do estado de alerta (MROSOVSKY, 1988).

Recentemente foi demonstrado que existe uma diferença na curva fase resposta da interação social entre camundongos machos e fêmeas que interagiram por 30 minutos com o sexo oposto (SONKER; SINGARAVEL, 2021). Essa diferença foi observada especialmente no CT15, onde machos que interagiram com fêmeas apresentaram avanço de fase do ritmo de atividade locomotora, o que não foi observado nas fêmeas que interagiram com machos neste horário. Interessantemente, os autores discutem que o avanço de fase observado nos machos no CT15 pode ser interessante no sentido de aumentar o tempo de forrageamento do roedor na natureza, e na fêmea, a falta de resposta seria positiva para manter uma estabilidade no seu sistema circadiano e aumentar as

chances de sobrevivência. Além disso, foi aventado frente aos resultados deste trabalho, que o bulbo olfatório apresenta um papel importante na transmissão do estímulo social para o SCN no CT15, através da ativação de outra estrutura responsiva ao odor, como o córtex piriforme, por exemplo, e partir dele a informação seria transmitida ao SCN, direta ou indiretamente, estimulando a expressão de PER-1 (SONKER; SINGARAVEL, 2021).

Além da capacidade da interação social induzir mudança de fase dos ritmos circadianos, também foi demonstrado que, em condições de claro e escuro de 12:12h, a coabitação de ratos Wistar com coespecífico do mesmo sexo aumenta a estabilidade e a amplitude do ritmo diário de Tc em relação aos ratos do mesmo sexo mantidos em isolamento. Quando estes animais são colocados em condições de luz constante, o que provoca arritmicidade e enfraquecimento dos ritmos circadianos, não foi observado diferença na estabilidade do ritmo diário de Tc entre agrupados e isolados, no entanto, machos apresentaram uma maior estabilidade em relação às fêmeas (CAMBRAS; CASTEJÓN; DÍEZ-NOGUERA, 2011). Interessantemente, a coabitação de um rato arritmico (“ritmo instável”) com um rato rítmico (“ritmo estável”) mantidos em condições de luz constante, provoca um aumento da estabilidade do ritmo de atividade locomotora e Tc no rato arritmico, indicando que, neste caso, a interação social de um rato com um sistema circadiano mais estável influencia diretamente a ritmicidade de um rato que apresenta um sistema circadiano instável (CAMBRAS; CASTEJÓN; DÍEZ-NOGUERA, 2012). Um protocolo útil que foi utilizado nos dois trabalhos citados neste parágrafo para se estudar a importância da interação social para o sistema circadiano é o isolamento social, onde a espécie a ser estudada é mantida privada de contato tátil – e, em alguns casos, de outros sentidos - dos seus coespecíficos.

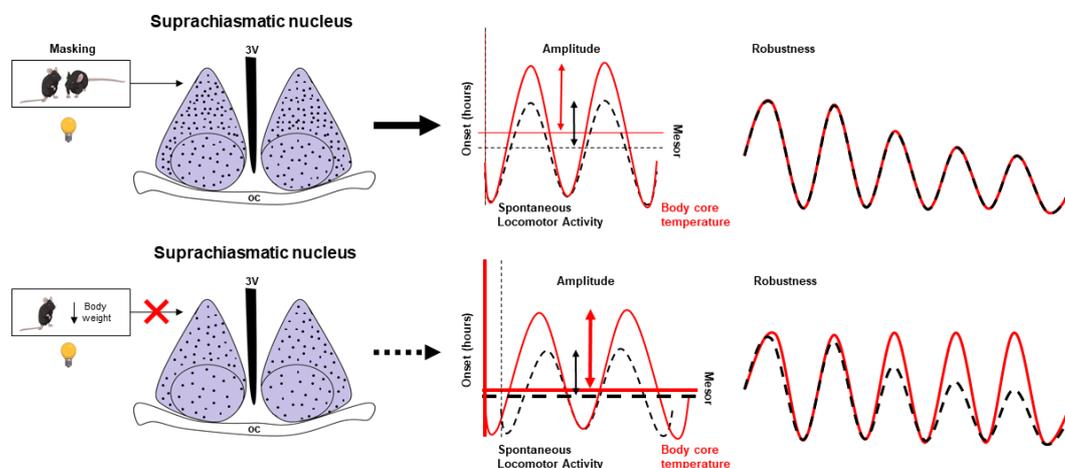
Recentemente, demonstramos o efeito do isolamento social de camundongos machos adultos da linhagem C57Bl6/J sobre a atividade dos neurônios do d-SCN e v-SCN, bem como sobre parâmetros dos ritmos diários e circadianos de SLA e Tc controlados pelo marcapasso central (FERNANDES et al., 2021). Para isso, camundongos foram socialmente isolados (Single-housed mice - SH) ou mantidos em grupos de 3 a 4 por caixa (Group-housed mice - GH) durante 28 dias sob ciclo claro e escuro de 12:12h ou escuro constante. Camundongos GH apresentaram um número de neurônios c-Fos-ir no d-SCN maior no ZT2 (duas horas após o início da fase de claro) em relação ao ZT14 (duas horas após o início da fase de escuro). Interessantemente, o número de neurônios c-Fos-ir no d-SCN dos camundongos SH foi significativamente reduzido no ZT2 em relação aos

camundongos GH, sem diferenças observadas entre ZT2 e ZT14. Portanto, o isolamento social aboliu a variação temporal de atividade neuronal no d-SCN. Em relação ao v-SCN, não foi observada diferença no número de neurônios c-Fos-ir entre camundongos GH e SH, bem como entre os ZTs nos diferentes grupos (FERNANDES et al., 2021).

Em relação ao efeito do isolamento social sobre os ritmos diários de SLA e Tc, foi observado que camundongos SH apresentaram alterações tais como redução da SLA total e do mesor do ritmo diário de SLA; redução nos níveis de Tc na fase de claro; redução do mesor e aumento da amplitude e robustez do ritmo diário de Tc; além de um desacoplamento entre os ritmos diários de Tc e SLA (FERNANDES et al., 2021). Portanto, além de reduzir a atividade neuronal no d-SCN no início da fase de claro, o isolamento social afetou especialmente o ritmo diário de Tc. Curiosamente, após 28 dias de isolamento ou agrupamento social, sendo 21 deles em condições de escuro constante, não observamos diferença entre os grupos no número de neurônios c-Fos-ir no d- ou v-SCN, tampouco nos níveis de Tc e SLA total, bem como no mesor, amplitude, e robustez dos ritmos circadianos de Tc e SLA (FERNANDES et al., 2021). Frente a este conjunto de resultados, concluímos que a interação social atua em conjunto com a luz para garantir a ativação do d-SCN, e que a pista social tem um efeito de mascaramento sobre o ritmo diário de Tc, possivelmente através do recrutamento do d-SCN (Figura 3) (FERNANDES et al., 2021).

Além de todos os parâmetros citados acima, também caracterizamos este protocolo de isolamento social em relação ao ganho de peso e ingesta alimentar. Vimos que os camundongos SH mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12h apresentam uma redução do ganho de peso em relação ao grupo GH, sem que a ingesta alimentar total fosse alterada. Já em condições de escuro constante, não observamos diferença entre camundongos GH e SH em relação ao ganho de peso e ingesta alimentar (FERNANDES et al., 2021). Uma possível explicação para este resultado observado em ciclo claro e escuro de 12:12h seria o fato de que o isolamento social provocou um aumento da termogênese e do gasto energético, visto que os animais SH são privados de um componente termoregulatório importante que é a própria interação social (NAGASHIMA et al., 2000) e que este grupo apresentou baixos níveis de Tc na fase de claro. Somado a isso, um aumento do gasto energético também ajudaria a explicar estes resultados, uma vez que não houve diferença na ingesta alimentar entre GH e SH. Portanto, possivelmente animais SH aumentam sua termogênese a fim de atingir os mesmos níveis de Tc dos

animais GH na fase de escuro. Deste modo, o efeito de mascaramento da interação social somado ao papel de arrastamento da luz é importante para a manutenção dos níveis basais de Tc e do ganho de peso (FERNANDES et al., 2021)



**Figura 3: Luz e a interação social atuam em conjunto para garantir a ativação dos neurônios do d-SCN e a sincronia de fase entre os ritmos diários de SLA e Tc.** O painel à esquerda ilustra os resultados observados sobre a atividade dos neurônios do v- e d-SCN, e sobre os parâmetros dos ritmos circadianos de Tc e SLA em condições escuro constante. O painel à direita ilustra os resultados observados sobre a atividade dos neurônios do v- e d-SCN, e sobre os parâmetros dos ritmos diários de Tc e SLA em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h (FERNANDES et al., 2021).

Frente aos resultados observados por Fernandes et al. (2021) em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h, aventamos que, possivelmente, a interação social como agente mascarador do sistema circadiano recruta substratos neurais envolvidos em diferentes controles fisiológicos afetados pelo isolamento social, como por exemplo, substratos envolvidos na termorregulação e gasto energético. Além disso, como a interação social, assim como outros *zeitgebers* não-fóticos, tem como característica o aumento do estado de alerta (MISTLBERGER; ANTLE, 2011; MROSOVSKY, 1988), e que o protocolo de isolamento social utilizado no presente trabalho provoca aumento da busca pela recompensa da sacarose (dados não publicados), propomos que substratos neurais envolvidos no controle do estado de alerta e processamento da recompensa sejam recrutados pela interação social. Propomos também que substratos neurais envolvidos na transmissão do estímulo não-fótico e no controle da sensibilidade do SCN à luz sejam recrutados pela interação social. Por fim, como foi observada uma redução na atividade neuronal do d-SCN em camundongos SH, propomos que o isolamento social cause uma

redução no número de neurônios AVP-ir que expressam c-Fos, e uma vez que tanto projeções vasopressinérgicas quanto VIPérgicas se projetam para os diferentes substratos neurais avaliados, também investigamos VIP-ir no SCN em camundongos GH e SH.

#### **2.4. Substrato neural envolvidos na termorregulação e gasto energético**

Uma das estratégias comportamentais para manutenção da Tc em roedores é o comportamento de se amontoar (*huddling*, em inglês) uns aos outros (TAN; KNIGHT, 2018), portanto, o isolamento social remove do ambiente este componente termoregulatório. Somado à descoberta de que o isolamento social reduz os níveis de Tc na fase de claro, uma possível explicação para a redução no ganho de peso observado em camundongos SH sob ciclo claro escuro de 12:12h (FERNANDES et al., 2021) seria um aumento da termogênese como consequência do isolamento social. A área pré-óptica (POA) é uma região do hipotálamo sabidamente envolvida no processo de termorregulação e gasto energético por meio da sua ação sobre o tecido adiposo marrom (BAT) via atividade do sistema nervoso simpático (TAN; KNIGHT, 2018). Interessantemente, Zhang et al. (2020) demonstraram que a ativação dos neurônios que expressam a neuropsina sensível a violeta (OPS-5) na POA provoca uma supressão da atividade do BAT provocando redução na Tc (ZHANG et al., 2020).

A POA é uma região do hipotálamo que recebe aferências tanto da porção v-SCN quanto da porção d-SCN (ABRAHAMSON; MOORE, 2001). Frente ao exposto, avaliamos a atividade neuronal da POA em camundongos GH e SH mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12h.

#### **2.5. Substratos neurais envolvidos no estado de alerta e processamento de recompensa**

A interação social, assim como outros *zeitgebers* não-fóticos tais como a atividade locomotora e a alimentação, tem uma maior ocorrência na fase de atividade, além da característica de aumentar o estado de alerta. Por outro lado, o sistema circadiano é mais sensível a eles na fase de repouso e sua curva fase resposta é oposta à da luz (MISTLBERGER; ANTLE, 2011; MROSOVSKY, 1988). Além disso, sabe-se que circuitos neurais envolvidos com o processamento de estímulos de recompensa participam do processamento de estímulos sociais (RADEMACHER et al., 2017). Dados prévios mostram que nosso protocolo de isolamento social causa um aumento da

preferência à sacarose sobre a água durante a fase de escuro (dados não publicados), corroborando a tese de que o isolamento social afeta o processamento da recompensa. Dessa forma, propomos que regiões cerebrais sabidamente envolvidas com estado de alerta e recompensa são recrutadas pela pista social.

Uma região do hipotálamo que recebe tanto projeções VIPérgicas quanto vasopressinérgicas é o núcleo paraventricular (PVN). O PVN é dividido em porção magnocelular e parvocelular, e seus neurônios sintetizam diferentes tipos de neurotransmissores e neuropeptídios, tais como: AVP, ocitocina (OT), fator de liberação de corticotropina (CRF), dopamina, glutamato, GABA, dentre outros (PYNER, 2009). A região ventral do PVN recebe projeções vasopressinérgicas que cruzam neurônios magnocelulares (também vasopressinérgicos), se estendendo até a subdivisão dorsal parvocelular, que por sua vez também recebe projeções VIPérgicas que se sobrepõem às fibras vasopressinérgicas provenientes do d-SCN (ABRAHAMSON; MOORE, 2001).

Dentre as funções fisiológicas clássicas do PVN estão o controle autonômico e neuroendócrino, como por exemplo, o controle da Tc, da pressão arterial e da manutenção da homeostase através do controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em situações de exposição ao estresse (KALSBECK; FLIERS, 2013; PYNER, 2009). No entanto, já foi demonstrado que essa região também apresenta um papel no controle do estado de vigília em camundongos (LIU et al., 2020; ONO et al., 2020). Ono et al. (2020) demonstraram que o PVN controla indiretamente o estado de vigília, através de uma via que envolve a inativação de neurônios GABAérgicos do SCN na noite subjetiva, aumentando assim a atividade de neurônios CRF no PVN, que por sua vez ativa neurônios orexinérgicos no hipotálamo lateral para aumentar o estado de alerta (ONO et al., 2020). Além disso, neurônios ocitocinérgicos do PVN têm sido associados à indução do comportamento de busca social em camundongos, sendo que o estímulo social (caracterizada pela exposição a um coespecífico) aumenta a atividade destes neurônios no PVN (RESENDEZ et al., 2020).

Sabe-se que o isolamento social pode ser considerado um tipo de estresse suave, sendo que o seu efeito varia conforme a espécie, idade e tempo de isolamento. A resposta do isolamento social sobre a atividade do eixo HPA é conflitante na literatura, especialmente em roedores adultos (GRECO et al., 1992; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; LOPEZ; LABER, 2015; PERELLÓ et al., 2006). A AVP presente nos neurônios parvocelulares

do PVN que também expressam CRF participa da liberação de ACTH, sendo secretada nos capilares portais da hipófise a partir de terminais axonais na zona externa da eminência mediana, além de ser responsiva ao estresse e às alterações plasmáticas de glicocorticoides (AGUILERA; RABADAN-DIEHL, 2000). Além disso, a redução na expressão de AVP através da microinjeção de uma mistura contendo toxinas celulares e um anticorpo específico para AVP diretamente no SCN provocou redução nos níveis de AVP na porção parvocelular do PVN e aumento nas concentrações de ACTH plasmáticas, sendo esta resposta acompanhada por um aumento na expressão de CRF no PVN. Esses resultados indicam que a AVP do d-SCN participa do eixo HPA inibindo este eixo em condições basais (GOMEZ et al., 1997).

Fibras VIPérgicas e vasopressinérgicas também se projetam para outras regiões hipotalâmicas, como a zona subparaventricular (SPVZ) e hipotálamo dorsomedial (DMH), que funcionam como uma região que retransmite sinais provenientes do SCN para outras áreas cerebrais (ABRAHAMSON; MOORE, 2001). Uma destas regiões é o locus coeruleus (LC), região sabidamente envolvida no controle do estado de alerta em roedores, portanto, o SCN participa do controle do ciclo sono e vigília indiretamente através do circuito SCN – DMH – LC (ASTON-JONES et al., 2001; BERRIDGE; SCHMEICHEL; ESPAÑA, 2012; CARTER et al., 2010; GONZÁLEZ; ASTON-JONES, 2006). Este controle ocorre especialmente pela atividade de neurônios noradrenérgicos, que possuem uma maior atividade durante a fase de vigília e redução durante a fase de repouso do ciclo sono e vigília (ASTON-JONES; BLOOM, 1981; POLETINI et al., 2007). Trabalhos mostram que a inibição da atividade destes neurônios reduz o estado de alerta e aumenta o sono durante o período de atividade, sendo que o oposto é observado em casos de estimulação destes neurônios (CARTER et al., 2010; GONZÁLEZ; ASTON-JONES, 2006). Além do seu papel no controle do estado de alerta, os neurônios noradrenérgicos do LC também estão intimamente ligados às respostas ao estresse. Assim, como os neurônios do PVN, os neurônios do LC são prontamente ativados em resposta ao estresse, e a implicação destes núcleos parece importante para coordenar respostas cognitivas e endócrinas em resposta ao estresse (VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2008).

A interação social é considerada um estímulo de recompensa em espécies sociáveis (KRACH et al., 2010; RADEMACHER et al., 2017). É bem estabelecido na literatura que a via mesolímbica composta por projeções dopaminérgicas da VTA para o núcleo

accumbens (NAcc) participa do controle do comportamento motivacional de busca à recompensa (BAIK, 2013; RADEMACHER et al., 2017). Além disso, a ativação optogenética desta via dopaminérgica, bem como da via serotoninérgica proveniente do núcleo dorsal da rafe (DRN) para o NAcc estão envolvidos no aumento da sociabilidade, caracterizado por um aumento na busca por interação social com um coespecífico (GUNAYDIN et al., 2014; WALSH et al., 2018), sendo a via serotoninérgica associada também à recompensa provocada pela interação social (DÖLEN et al., 2013). Portanto, tais evidências colocam essas áreas e neurotransmissores como primordiais no processamento do estímulo social. Somado a isso, a via mesolímbica dopaminérgica também tem sido associada ao controle do estado de alerta, uma vez que a estimulação optogenética deste circuito aumenta o tempo do estado de alerta (EBAN-ROTHSCHILD et al., 2016) e esta resposta ocorre via receptor D1 de dopamina no NAcc (LUO et al., 2018).

Frente ao exposto, e sabendo que o isolamento social reduz a atividade de neurônios no d-SCN, investigamos os efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN e PVN; e de neurônios noradrenérgicos no LC, bem como sobre a imunorreatividade de VIP no SCN, uma vez que fibras VIPérgicas também se comunicam diretamente com o PVN e indiretamente com o LC. Além disso, avaliaremos os efeitos do isolamento social sobre a atividade dopaminérgica e serotoninérgica no NAcc.

## **2.6. Substratos neurais envolvidos na transmissão do estímulo não fótico e sensibilidade do NSQ à luz**

O SCN de roedores recebe projeções de várias regiões do sistema nervoso central. Dentre elas, destacam-se as projeções provenientes do núcleo mediano da raphe (MRN) e indiretas do núcleo dorsal da raphe (DRN). O v-SCN de roedores recebe projeções diretas MRN e indiretas do DRN (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; BANG et al., 2012; GLASS; DINARDO; EHLEN, 2000; MUZERELLE et al., 2016). A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) proveniente destes dois núcleos é considerada um neurotransmissor importante para a regulação do sistema circadiano (MISTLBERGER et al., 2000). Seus níveis no sistema nervoso central variam ao longo do dia, estando diretamente relacionado com o estado de alerta e atividade. Além disso, a estimulação do estado de alerta durante a fase de repouso está relacionada a um aumento nos níveis de 5-

HT no SCN (ANTLE et al. 2003); assim como a estimulação elétrica do DRN e MRN e o tratamento farmacológico com agonistas de determinados receptores serotoninérgicos durante a fase de repouso, provocam um efeito semelhante de mudança de fase (MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999; GLASS; DiNARDO; EHLEN, 2000; SHELTON et al., 2015; HORIKAWA et al., 2000; MISTLBERGER; ANTLE; MILLER, 2000). Portanto, devido a associação entre o estado comportamental, a atividade serotoninérgica e a redefinição da fase circadiana, acredita-se que a 5-HT desempenhe um papel na regulação não fótica do relógio circadiano (GLASS, DiNARDO, EHLEN; 2000).

Sabe-se que pulsos de luz durante a noite subjetiva e/ou fase de escuro provocam um aumento significativo no número de neurônios c-Fos-ir no SCN de roedores. Este aumento é drasticamente reduzido após a estimulação elétrica do MRN ou DRN de hamsters prévia ao pulso de luz de 10 minutos no ZT14 (MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999). Além disso, o tratamento com agonista do receptor 5-HT subtipo1B, o qual é expresso principalmente nos terminais dos axônios das ipRGCs, inibe a mudança de fase e a expressão de c-Fos no SCN após pulso de luz a noite (PICKARD; REA, 1997). Portanto, além de um possível papel no arrastamento por estímulo não fótico, a transmissão serotoninérgica também está envolvida na responsividade à luz do SCN (CUESTA et al., 2009).

Outra sinalização que se destaca no controle da resposta do sistema circadiano frente à exposição fótica é a dopaminérgica. Fibras positivas para dopamina- $\beta$ -hidroxilase e tirosina-hidroxilase (TH) são encontradas na porção d-SCN de camundongo (ABRAHAMSON; MOORE, 2001), e já foi demonstrado através da técnica de traçado retrógrado, que esta projeção dopaminérgica é proveniente da VTA (GRIPPO et al., 2017). Grippo et al (2017) mostraram que a ativação quimiogénica do receptor D1 no SCN causa efeitos de mudança de fase semelhantes àquelas induzidas por pulso de luz. Além disso, a funcionalidade deste receptor no SCN é importante para o arrastamento apropriado do ritmo atividade locomotora frente a um protocolo de *jetlag*. Camundongos nocautes para o receptor D1 (Drd1-KO) submetidos a um avanço de fase de 6h nos horários de acender e apagar as luzes apresenta uma taxa de arrastamento mais lento em relação aos camundongos WT, ao passo que a restauração deste receptor no SCN normaliza esse comportamento. Por outro lado, a ativação dos neurônios dopaminérgicos na VTA acelera essa taxa de arrastamento em relação aos animais do grupo controle

(GRIPPO et al., 2017). Por fim, a sinalização dopaminérgica via receptor D1 também parece importante para atividade apropriada dos neurônios do SCN, uma vez que a incubação de fatias cerebrais de animais WT com agonista de receptor D1 reduz a taxa de disparo de neurônios do SCN na fase de claro e na fase de escuro (GRIPPO et al., 2020). Portanto, a dopamina, especificamente via receptor D1 no SCN desempenha um papel importante na resposta de arrastamento fótico, e parece participar do controle da atividade dos neurônios do SCN (GRIPPO et al., 2017, 2020).

Dados na literatura mostram que o isolamento social em roedores altera parâmetros dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico, tais como mudanças significativas no ritmo circadiano de 5-HT no hipotálamo em ratos (GRECO et al., 1989, 1990), redução e aumento na atividade dos neurônios serotoninérgicos no DRN e dopaminérgicos na VTA, respectivamente (FABRICIUS et al., 2010; SARGIN; OLIVER; LAMBE, 2016). Além disso, ocorre uma redução na densidade de receptores serotoninérgicos em diversas regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo (DUDLEY; DINARDO; GLASS, 1998; MISTLBERGER; ANTLE, 2011) e redução na expressão de receptor D2 de DA no NAcc e córtex pré frontal (HALL et al., 1998; ZHANG et al., 2021) após o isolamento social. Portanto, é possível especular que o isolamento social provoque uma alteração na transmissão serotoninérgica e/ou dopaminérgica ao SCN, podendo ser a causa da atenuação da atividade dos neurônios do d-SCN no início da fase de claro (FERNANDES et al., 2021).

Embora seja sabido que a interação social modula o fotoarrastamento dos ritmos circadianos em várias espécies (CAMBRAS; CASTEJÓN; DÍEZ-NOGUERA, 2011, 2012; FERNANDES et al., 2021; MELO et al., 2013; MISTLBERGER; SKENE, 2004), não estão esclarecidos na literatura os mecanismos neurais por trás dessa modulação. Portanto, diante de todo o conteúdo exposto, no presente estudo levantamos a hipótese de que áreas e sistemas de neurotransmissores envolvidos concomitantemente com o estado de alerta, processamento da recompensa, interação social, e modulação do estímulo fótico e não fótico para o SCN sejam afetados pelo isolamento social. Além disso, avaliamos o fenótipo dos neurônios que apresentaram redução na c-Fos-ir no d-SCN provocado pelo isolamento social, além de avaliarmos a VIP-ir, uma vez tanto fibras vasopressinérgicas quanto VIPérgicas enviam projeções para as regiões cerebrais analisadas no presente trabalho.



### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos e VIP-ir, além de mapear áreas cerebrais e sistemas de neurotransmissores envolvidos no efeito da interação social sobre a sincronização fótica do SCN e seus eferentes em camundongos.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- 1) Avaliar o efeito do isolamento social sobre o número de neurônios AVP-ir que expressam c-Fos no SCN no ZT2 e ZT14;
- 2) Avaliar o efeito do isolamento social sobre a VIP-ir no SCN no ZT2 e ZT14;
- 3) Avaliar o efeito do isolamento social sobre o número de neurônios c-Fos-ir na POA no ZT2 e ZT14;
- 4) Avaliar o efeito do isolamento social sobre o número de neurônios AVP-ir que expressam c-Fos-ir no PVN no ZT2 e ZT14;
- 5) Avaliar o efeito do isolamento social sobre o número de neurônios TH-ir que expressam c-Fos no LC no ZT2 e ZT14;
- 6) Avaliar os níveis de 5-HT, DA e seus metabólitos no SCN no ZT2 e ZT14;
- 7) Avaliar os níveis de 5-HT, DA e seus metabólitos no NAcc no ZT2 e ZT14.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL6/J machos de 7-8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12 h, onde as luzes do biotério acendiam às 7h e apagavam às 19h. Durante as 12h de fase de claro, a intensidade de luz sobre as caixas foi de aproximadamente 300 lux, e durante a fase de escuro <1 lux. A temperatura ambiente foi mantida constante em aproximadamente 25°C. O período de habituação ao ambiente foi de uma semana. Após esse período, os animais foram divididos em dois grupos: 1) GH (*group-housed*) ou grupo controle com 3 a 4 animais/caixa, e 2) SH (*single-housed*) contendo 1 animal/caixa, sendo ambos acomodados em caixas padrão de polipropileno com 41x34x16 cm<sup>3</sup> de dimensão. Foi utilizado um protocolo de 28 dias de isolamento ou agrupamento social. Durante os experimentos realizados na fase de escuro, a luz vermelha com intensidade <1 lux foi utilizada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº 11/2018).

### 4.2. Perfusão transcardíaca e preparação dos cérebros para imunohistoquímica

Após 28 ou 29 dias de agrupamento ou isolamento social, animais foram anestesiados i.p. com uma sobredosagem de solução anestésica (ketamina (80 mg/kg) e xilasina (16 mg/kg), e perfundidos com 20 mL de tampão fosfato salina (PBS) 0,01M, e em seguida, com 20 mL de paraformaldeído (PFA) 4% através de uma bomba peristáltica de perfusão. As perfusões foram realizadas no ZT2 ou ZT14. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e imediatamente pós-fixados em PFA 4% por aproximadamente 2 h à 4°C. Em seguida, foram armazenados em solução de sacarose 30% até a saturação. Após a saturação, os cérebros foram rapidamente congelados, mantidos por 1 minuto a -45° C em isopentano 99%, e imediatamente armazenados a -80° C.

Os cérebros foram posteriormente fatiados em três séries de secções coronais de 40 µm, da extensão rostrocaudal do SCN (bregma: -0.22 a -0.82 mm), PVN (bregma: -0.58 a -1.22 mm) e LC (bregma: -5.34 a -5.8 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001) com o criostato mantido a -20°C. As fatias foram mantidas em solução

crioprotetora (PBS, sacarose 30%, etilenoglicol 30%, PVP 1%) até serem utilizadas para imunohistoquímica.

### 4.3. Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica foi utilizado o método *free-floating* para a imunomarcação de c-Fos, AVP, VIP e TH. As secções foram lavadas com PBS 0,01M entre todas as etapas do protocolo. Após a lavagem com PBS para a remoção da solução crioprotetora, as secções foram inicialmente incubadas com glicina 0,1M com a finalidade de expor os sítios antigênicos que podem ser mascarados pela fixação com PFA 4%. Em seguida, as secções foram incubadas em Triton X-100 (TX-100) 0,4% para permeabilização da membrana celular facilitando a posterior difusão dos anticorpos. Posteriormente, foi realizada a incubação das secções em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% com a finalidade de bloquear peroxidases endógenas, e, em seguida, a incubação em albumina bovina (BSA 3%) foi realizada para reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primários e secundários. Para marcação simples de c-Fos e VIP, foi utilizado o anticorpo primário anti-VIP (1:10000, ImmunoStar, 20077, anticorpo policlonal produzido em coelho) ou o anticorpo primário anti-c-Fos (1:7500, Santa Cruz Biotechnology, sc-253 anticorpo policlonal produzido em coelho). Para a dupla marcação de c-Fos/AVP e c-Fos/TH, primeiramente as secções foram incubadas com o anticorpo anti-c-Fos (1:7500, Santa Cruz Biotechnology, sc-253 anticorpo policlonal produzido em coelho). Após 48 horas de incubação no anticorpo primário a 4°C, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (1:2000, Vector Laboratories, biotilado anti-coelho, anti-IgG) durante 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos em PBS+ (solução contendo TX-100 0,3% e BSA 1%). As secções foram posteriormente incubadas em avidina-biotina peroxidase (1:500 em PBS, Vector Laboratories) durante 1 hora em temperatura ambiente. A revelação da imunomarcação de c-Fos foi realizada em solução contendo 3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,083 µL/mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em Tris-HCL 0,05 M (pH 7,6), deixadas em imersão por aproximadamente 20 minutos. As secções previamente imunomarcadas para c-Fos foram incubadas com os anticorpos primários anti-TH (1:20000, Santa Cruz Biotechnology F-11, sc-25269, anticorpo monoclonal produzido em camundongo) ou anti-AVP (1:10000, ImmunoStar, 20069, anticorpo policlonal produzido em coelho), e, após 48h, foram incubadas por 2 h em seus respectivos anticorpos secundários: anti-camundongo (1:2000, Vector Laboratories, biotilado anti-

camundongo, anti-IgG, rat adsorbed) ou anti-coelho (1:2000, Vector Laboratories, biotinilado anti-coelho, anti-IgG). A posterior incubação em avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories) foi realizada nas concentrações de 1:500 (para anti-TH) ou 1:100 (para anti-AVP) em PBS. As fatias foram reveladas em solução contendo DAB 0,2 mg/mL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,083 µL/mL em Tris-HCL 0,05 M (pH 7,6) e deixadas em imersão por cerca de 20 minutos. Ao final, as secções foram posicionadas em lâminas gelatinizadas, e após a secagem por aproximadamente 24 h, foram desidratadas em álcool e xilol e cobertas com lamínulas fixadas com entellan (Merck).

#### 4.4. Obtenção das imagens e contagem de células

Foi utilizada a objetiva de 20x para obtenção das fotomicrografias bilaterais do SCN, POA, PVN e LC no microscópio óptico. Foram utilizadas secções correspondentes à extensão rostrocaudal do SCN (bregma: -0.22 a -0.82 mm), POA (bregma: +0.74 a -0.58 mm), PVN (bregma: -0.58 a -1.22 mm), LC (bregma: -5.34 a -5.8 mm) de acordo com o atlas Paxinos e Franklin (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Os neurônios c-Fos-ir, c-Fos/AVP-ir e c-Fos/TH-ir foram contados manualmente através do software *ImageJ*. A quantificação da imunomarcção de VIP foi feita através da medida da densidade óptica integrada (IOD) de VIP. Os IODs foram calculados e subtraídos pelos seus respectivos *backgrounds* através do software *ImageJ*. Foram consideradas células c-Fos-ir aquelas apresentando o núcleo corado em preto, e células imunomarcadas para TH e AVP aquelas que apresentaram o citoplasma corado em marrom. O número de células foi normalizado pelo número de secções por animal.

#### 4.5. Microdissecção das regiões onde se localizam o SCN e NAcc

Para a análise da atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN e NAcc, foi realizada o corte de 4 fatias de 300 µm na região onde se localiza o NAcc (bregma: 1,94 a 0,74 mm) e o corte de 2 fatias de 300 µm da região onde se localiza o SCN (bregma: -0,22 a -0,82 mm) em criostato na temperatura de -18°C. Para a microdissecção de ambas as áreas foi utilizada a agulha de 1,2 mm. Para o NAcc, a agulha foi posicionada em cima da comissura anterior, bilateralmente, e para o SCN, a mesma agulha foi posicionada acima do quiasma óptico e do terceiro ventrículo (3V). As amostras foram imediatamente armazenadas em tubo eppendorf e congeladas a -80°C. Entre cada área e animal, os instrumentais foram lavados com álcool e água Mili-Q.

#### 4.6. HPLC e detecção eletroquímica

As microdissecções do SCN e NAcc foram homogeneizadas, respectivamente, em 150  $\mu$ L e 400  $\mu$ L de ácido perclórico (PCA) 0,15 M contendo 0,1 mM de EDTA e 57 nM de 3,4-diidroxibenzilamina (DHBA; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), utilizado como padrão interno. Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas na mesma análise e a mesma solução de diluição foi utilizada para todas elas. As amostras em solução foram sonicadas até completa homogeneização e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min, 4 °C. O pellet foi direcionado à dosagem proteica por Bradford e o sobrenadante foi removido para avaliação das concentrações de 5-HT, 5-HIAA, DA e DOPAC como previamente descrito (AQUINO et al., 2017; RABELO et al., 2015; SZAWKA et al., 2010). A fase móvel do sistema foi constituída de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,38 mM, em água MiliQ e metanol 10%; pH 3,5 ajustado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. O fluxo da bomba do HPLC foi ajustado para 1,0 mL/min e o potencial do detector eletroquímico 0,4 V (Decade II, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden). Vinte microlitros de amostra foram injetadas no HPLC com o auxílio de um auto injetor (SIL-10A autosampler, Shimadzu Corporation). As catecolaminas foram separadas em coluna de fase reversa (Purospher Star, 5  $\mu$ m, 250 x 4 mm; Merck) precedida de pré-coluna C18 (Lichrospher 5  $\mu$ m, 4 x 4 mm; Merck). A temperatura do forno foi mantida constante a 40 °C. Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão). A 5-HT, 5-HIAA, DA e o DOPAC foram identificados de acordo com seu tempo de eluição e quantificados utilizando-se curvas de calibração pelo método do padrão interno (DHBA). Os níveis de 5-HT e DA foram considerados estimativa do estoque desse neurotransmissor nas vesículas sinápticas. Os níveis de 5-HIAA e DOPAC foram usados como estimativa da liberação dos respectivos neurotransmissores (Lookingland *et al.* 1987). A razão 5-HIAA/5-HT e DOPAC/DA foi utilizada como índice do *turnover* serotoninérgico e dopaminérgico, respectivamente.

#### 4.7. Análise dos dados

O número de neurônios c-Fos/TH-ir, c-Fos/AVP-ir, VIP IOD e c-Fos-ir assim como a variação temporal nos níveis de 5-HT, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, DA, DOPAC e DOPAC/DA, foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido de pós-teste *Sidak*. As análises estatísticas foram realizadas no programa Graph Pad Prism 8.0. O valor de

$p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk.

## 5. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.1. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios na POA, de neurônios vasopressinérgicos no SCN e PVN e noradrenérgicos no LC, bem como sobre VIP-IOD no SCN em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h

Após 1 semana de habituação ao ambiente em ciclo claro e escuro de 12:12h, os animais foram aleatoriamente divididos em camundongos GH e SH (dia 0). Os animais foram mantidos sob ciclo claro e escuro de 12:12h durante todo o protocolo experimental. No 28º ou 29º de agrupamento ou isolamento social, os animais foram perfundidos transcardialmente no ZT2 ou ZT14, correspondente a duas horas após o acendimento ou apagamento das luzes, respectivamente. Os cérebros foram coletados para posterior análise imunohistoquímica.



**Figura 5:** Representação esquemática do delineamento descrito em 5.1.

### 5.2. Efeitos do isolamento social sobre os níveis de 5-HT, DA e seus metabólitos no SCN e NAcc em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h

Após 1 semana de habituação ao ambiente em ciclo claro e escuro de 12:12h, os animais foram aleatoriamente divididos em camundongos GH e SH (dia 0). Os animais foram mantidos sob ciclo claro e escuro de 12:12h durante todo o protocolo experimental. No 28º de agrupamento ou isolamento social, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no ZT2 ou ZT14, correspondente a duas horas após o acendimento ou apagamento das luzes, respectivamente. Os cérebros foram coletados a fresco e

imediatamente congelados para posterior microdissecção das regiões correspondentes ao SCN e NAcc e posterior análise por HPLC e detecção eletroquímica.



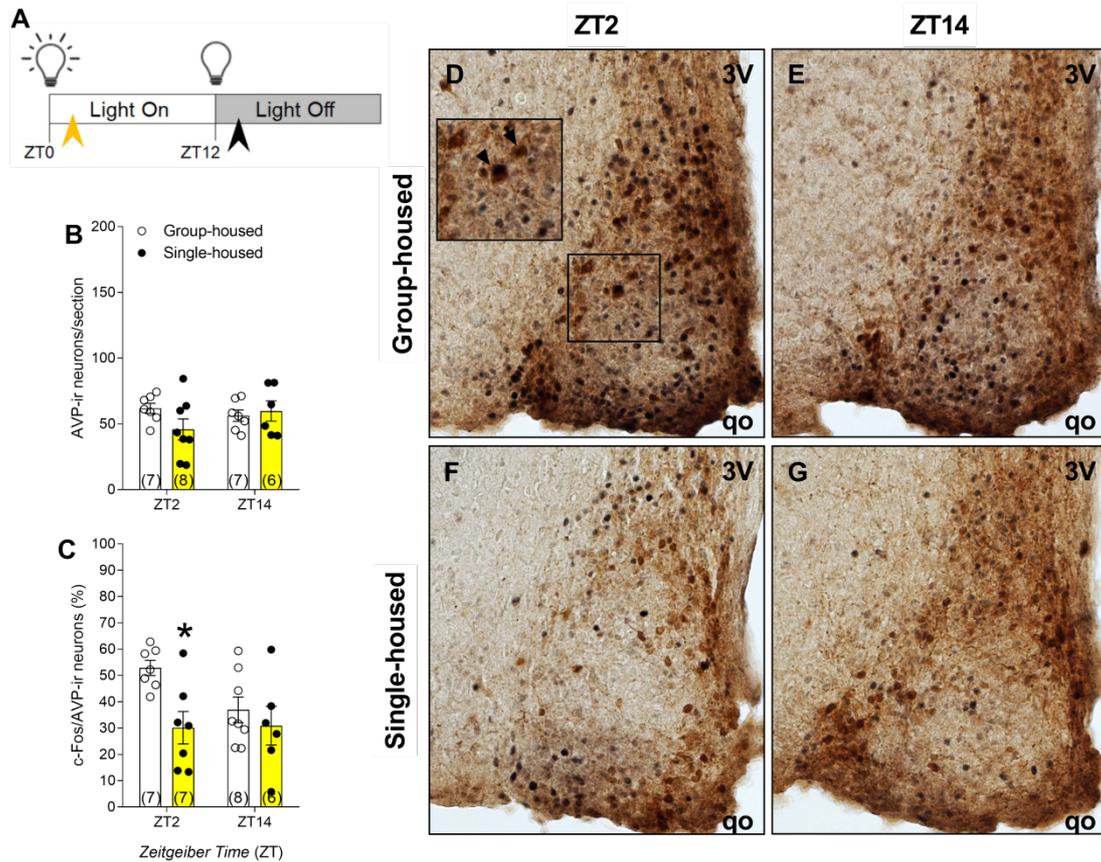
**Figura 6:** Representação esquemática do delineamento descrito em 5.2.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN em ciclo claro e escuro de 12:12h

A figura 7 mostra quatro fotomicrografias da região onde se localiza a porção medial do SCN, imunomarcadas para AVP e c-Fos (Figura 7D-G). A marcação de AVP é caracterizada pelo citoplasma corado em marrom. A contagem do número de neurônios AVP-ir mostrou que não houve efeito significativo da condição de habituação (GH ou SH) ( $F_{(1,24)} = 0.9733$ ,  $p = 0.3337$ ), do horário do dia (ZT) ( $F_{(1,24)} = 0.43$ ,  $p = 0.5201$ ), ou da interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{(1,24)} = 2.368$ ,  $p = 0.1369$ ). A análise do pós teste não demonstrou diferença no número de neurônios AVP-ir entre camundongos GH e SH, bem como não houve diferença entre o ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo (Figura 7B).

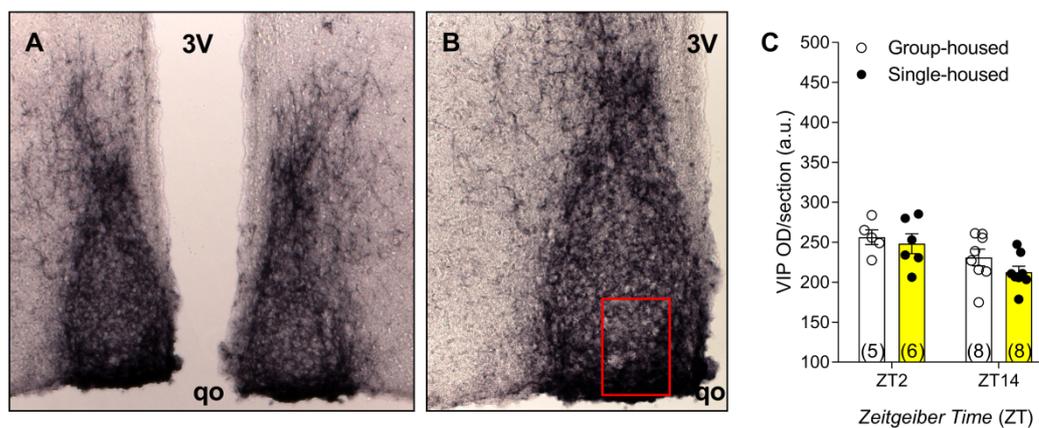
A análise da porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos mostrou um efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,24)} = 6.981$ ,  $p = 0.0143$ ). No entanto, não foi observado efeito significativo do ZT ( $F_{(1,24)} = 1.962$ ,  $p = 0.1741$ ) ou da interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,24)} = 2.361$ ,  $p = 0.1375$ ). A análise do pós teste demonstrou que houve uma redução significativa na porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos no grupo SH em relação ao grupo GH no ZT2, sem diferenças entre os grupos no ZT14 ou entre ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo (Figura 7C).



**Figura 7: O isolamento social reduz a atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN no ZT2.** (A) Diagrama do protocolo de ciclo claro e escuro: ZT (*zeitgeber time*), sendo ZT0 o horário em que as luzes acendem e ZT12 o horário em que as luzes apagam. As setas no diagrama representam o horário do dia onde os cérebros foram perfundidos transcardialmente. O número de neurônios imunorreativos para AVP (AVP-ir), e a porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH perfundidos após 28 ou 29 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h (B e C, respectivamente). Fotomicrografias (magnitude de 20x) de secções de camundongos do grupo GH e SH perfundidos no ZT2 (D e F, respectivamente) e no ZT14 (E e G, respectivamente). As cabeças de seta apontam para neurônios c-Fos/AVP-ir e as setas apontam para neurônios AVP-ir. Número de animais está entre parênteses. 3V, terceiro ventrículo; qo, quiasma óptico. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*)

### 6.3. Efeitos do isolamento social sobre VIP-IOD no SCN em ciclo claro e escuro de 12:12h

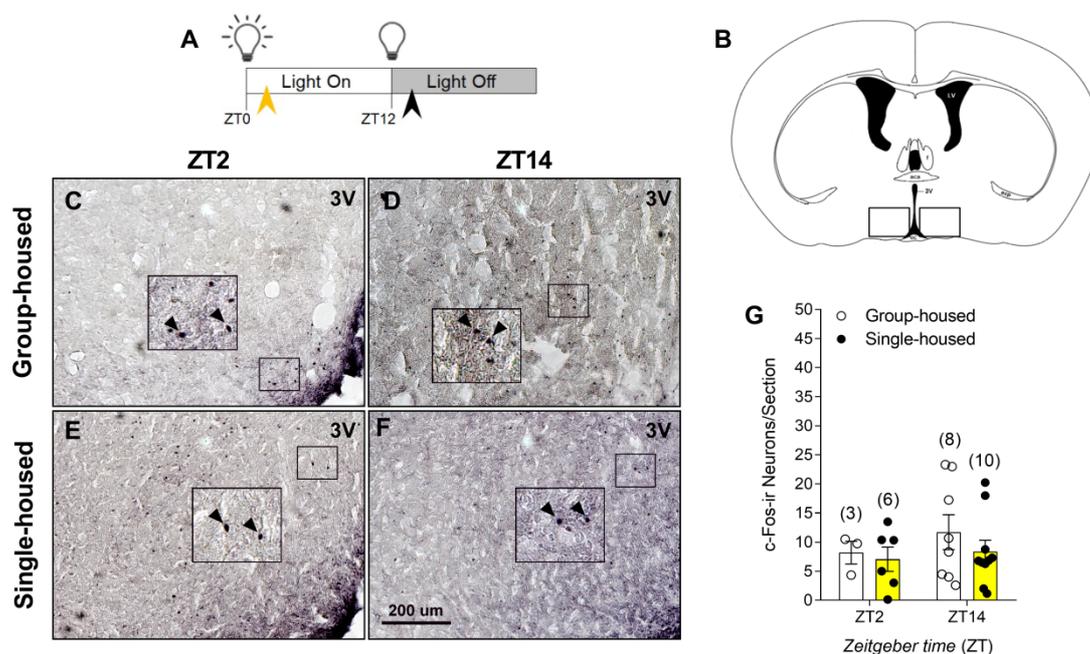
A figura 8 mostra fotomicrografias da região onde se localiza a porção medial do SCN na magnitude de 10x (Figura 8A) e 20x (Figura 8B), imunomarcadas para VIP. A quantificação da VIP-IOD demonstrou que não houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,23)} = 1.659$ ,  $p = 0.2105$ ), houve efeito significativo do ZT ( $F_{(1,23)} = 8.838$ ,  $p = 0.0068$ ), no entanto não foi observada interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{(1,23)} = 0.2485$ ,  $p = 0.6228$ ). A análise do pós teste demonstrou que não houve diferença significativa entre camundongos GH e SH, tampouco entre ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo (Figura 8C).



**Figura 8: O isolamento social não altera a VIP-IOD no SCN em ciclo claro e escuro de 12:12h.** (A) Imunomarcção de VIP na porção medial do SCN na magnitude de 10x (B) e 20x. (C) A imunorreatividade de VIP quantificada por densidade óptica são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH perfundidos após 28 ou 29 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. O retângulo vermelho (B) corresponde a área quantificada por densidade óptica. Número de animais está entre parênteses. 3V, terceiro ventrículo; qo, quiasma óptico.

### 6.5. Efeitos do isolamento social sobre a atividade neuronal da POA em ciclo claro e escuro de 12:12h

A Figura 9 mostra quatro fotomicrografias da região onde se localiza a POA, imunomarcadas por c-Fos (Figura 9C-F). A análise estatística do número de neurônios c-Fos-ir mostrou que não houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,23)} = 0.6335$ ,  $p = 0.4342$ ), do ZT ( $F_{(1,23)} = 0.7501$ ,  $p = 0.3954$ ), ou da interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{(1,23)} = 0.1523$ ,  $p = 0.6999$ ). A análise do pós teste mostrou que não houve diferença entre camundongos GH e SH, tampouco entre os ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo (Figura 9G).

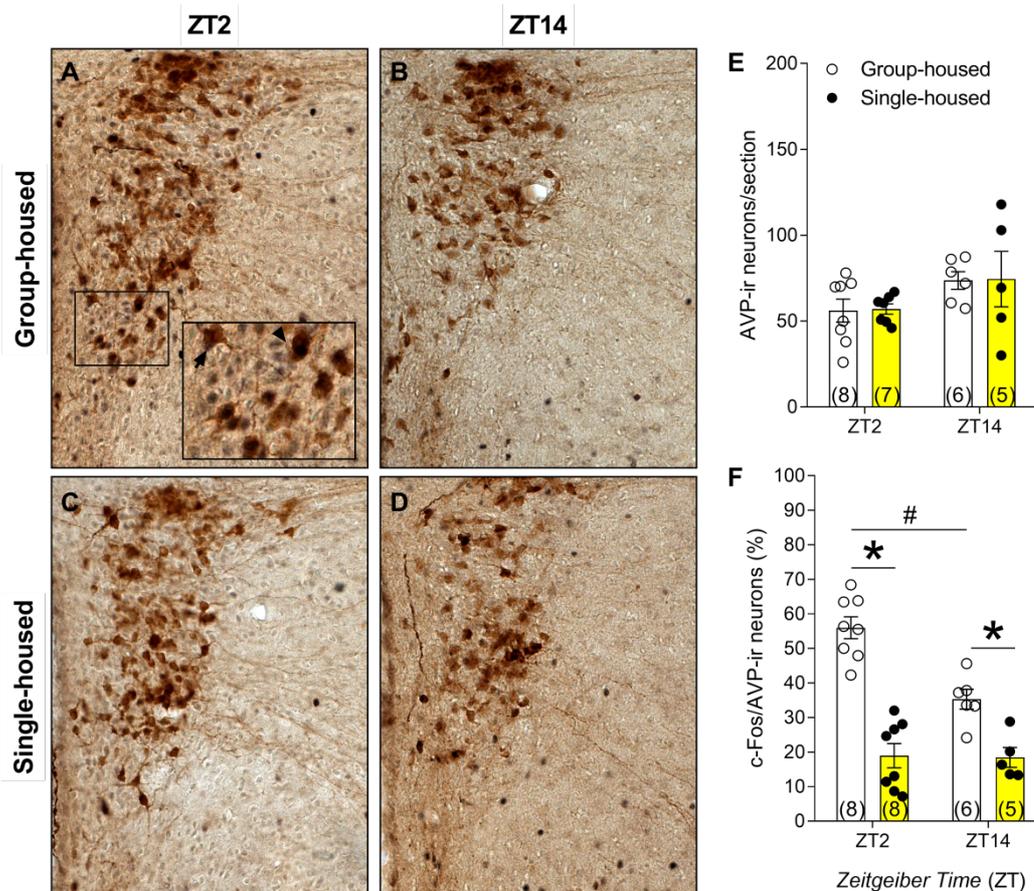


**Figura 9: O isolamento social não altera a atividade neuronal da POA em ciclo claro e escuro 12:12h.** (A) Diagrama do protocolo de ciclo claro e escuro de 12:12h: ZT (zeitgeber time), sendo ZT0 o horário em que as luzes acendem e ZT12 o horário em que as luzes apagam. As setas representam o horário do dia onde os cérebros foram perfundidos transcárdialmente. (B) Representação esquemática da região onde se localiza parte da POA (bregma -0.10) de acordo com Paxinos e Franklin (2001). Fotomicrografias (magnitude de 10x) de seções de camundongos do grupo GH e SH perfundidos no ZT2 (C e E) e no ZT14 (D e F), representando a região onde se localiza o POA. As cabeças de seta apontam para neurônios c-Fos-ir. (G) O número de neurônios imunorreativos para c-Fos (c-Fos-ir) são apresentados como média  $\pm$  EPM para GH e SH perfundidos após 28 ou 29 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. Número de animais está entre parênteses. 3V, terceiro ventrículo,

### **6.6. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN e de neurônios noradrenérgicos no LC em ciclo claro e escuro de 12:12h**

A figura 10 mostra quatro fotomicrografias da região onde se localiza o PVN, imunomarcadas por AVP e c-Fos (Figura 10A-D). A análise estatística demonstrou que não houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,22)} = 0.01109$ ,  $p = 0.9171$ ), houve efeito significativo do ZT ( $F_{(1,22)} = 4.748$ ,  $p = 0.0403$ ), mas não houve interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{(1,22)} = 2.201$ ,  $p = 0.9988$ ). O pós teste não demonstrou diferença entre camundongos GH e SH, tampouco entre os ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo no número de neurônios AVP-ir (Figura 10E).

Por outro lado, a análise da porcentagem do número de neurônios AVP que expressam c-Fos mostrou que houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,23)} = 65.55$ ,  $p < 0.0001$ ), do ZT ( $F_{(1,23)} = 10.15$ ,  $p = 0.0041$ ), e interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{(1,23)} = 9.211$ ,  $p = 0.0059$ ). Além disso, a análise do pós teste demonstrou que houve diferença significativa entre ZT2 e ZT14 no grupo GH (Figura 10F). Além disso, o isolamento social reduziu significativamente a porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos no ZT2 e ZT14 em relação ao grupo GH (Figura 10F).

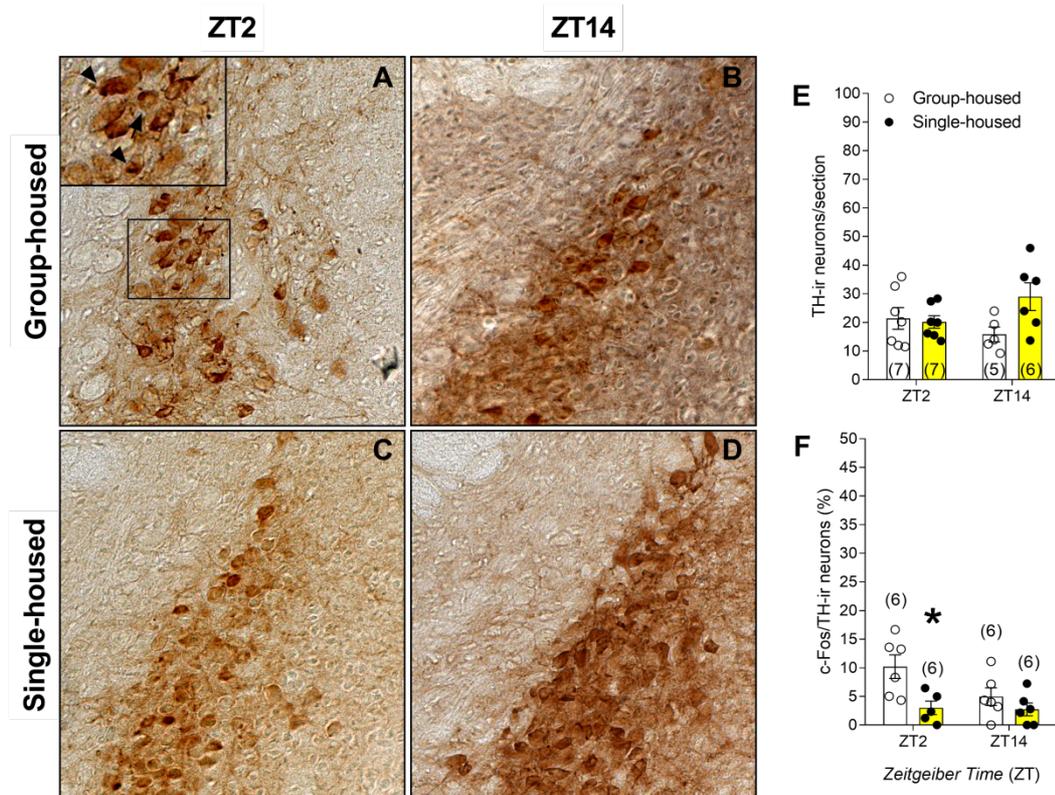


**Figura 10: O isolamento social reduz a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN no ZT2 e ZT14.** Fotomicrografias (magnitude de 20x) de secções de camundongos do grupo GH e SH perfundidos no ZT2 (A e C, respectivamente) e no ZT14 (B e D, respectivamente). (E) O número de neurônios AVP-ir (F) e a porcentagem de neurônios c-Fos/AVP-ir são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH perfundidos após 28 ou 29 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. As cabeças de seta apontam para neurônios c-Fos/AVP-ir e as setas apontam para neurônios AVP-ir. Número de animais está entre parênteses. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH; #,  $p < 0.05$  ZT2 versus ZT14 (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*).

A figura 11 mostra quatro fotomicrografias da região onde se localiza o LC, imunomarcadas por TH e c-Fos (Figura 11A-D). Não foi observado efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,21)} = 2.804$ ,  $p = 0.1089$ ), do ZT ( $F_{(1,21)} = 0.2087$ ,  $p = 0.6525$ ), ou da interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{(1,21)} = 4.083$ ,  $p = 0.0562$ ). A análise do pós teste não demonstrou diferença entre os grupos e entre os ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo no número de neurônios TH-ir, (Figura 11E).

No entanto, análise estatística demonstrou efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,19)} = 9.140$ ,  $p = 0.007$ ). No entanto, não foi observado efeito significativo do ZT ( $F_{(1,19)}$

= 3.117,  $p = 0.0935$ ), ou interação entre a condição de habituação e ZT ( $F_{1,19} = 2.520$ ,  $p = 0.1289$ ). Interessantemente, o pós teste demonstrou uma redução significativa na porcentagem de neurônios TH que expressam c-Fos no grupo SH em relação ao GH no ZT2, sem diferenças observadas entre ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo (Figura 11F).



**Figura 11: O isolamento social reduz o número de neurônios TH-ir que expressam c-Fos-ir no LC no ZT2.** Fotomicrografias (magnitude de 20x) de seções de camundongos do grupo GH e SH perfundidos no ZT2 (A e C, respectivamente) e no ZT14 (B e D, respectivamente). (E) O número de neurônios TH-ir (F) e a porcentagem de neurônios c-Fos/TH-ir são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH perfundidos após 28 ou 29 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. As cabeças de seta apontam para neurônios c-Fos/TH-ir e as setas apontam para neurônios TH-ir. Número de animais está entre parênteses. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*).

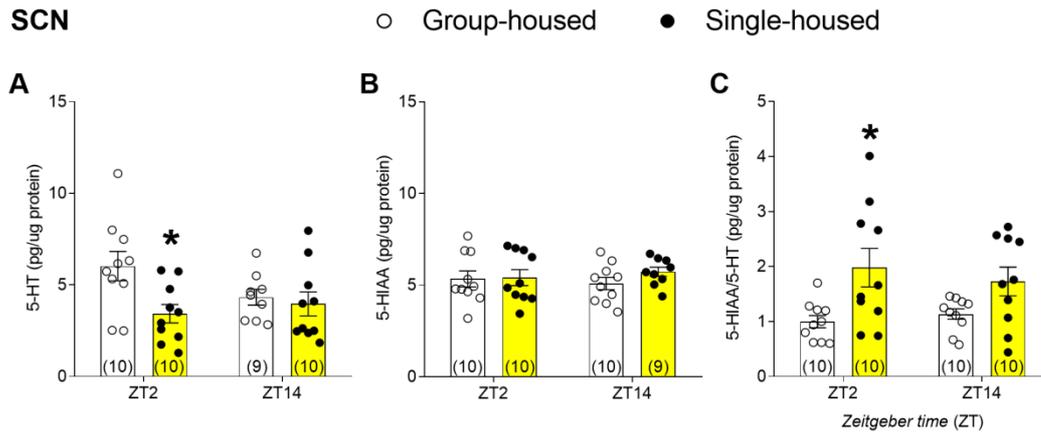
### 6.7. Efeito do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN

A análise estatística demonstrou que houve efeito significativo da condição de habituação para os níveis de 5-HT ( $F_{(1,35)} = 5.638$ ,  $p = 0.0232$ ). No entanto, não foi observado efeito significativo do ZT ( $F_{(1,35)} = 0.8767$ ,  $p = 0.3555$ ) e interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,35)} = 3.215$ ,  $p = 0.0816$ ) nos níveis de 5-HT. O pós teste demonstrou que houve

uma diminuição significativa nos níveis de 5-HT no grupo SH em relação ao GH, sem diferença observada entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos (Figura 12A).

Em relação os níveis de 5-HIAA, não houve um efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,35)} = 0.9105$ ,  $p = 0.3465$ ), do ZT ( $F_{(1,35)} = 0.0071$ ,  $p = 0.9329$ ) ou interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,35)} = 0.5697$ ,  $p = 0.4554$ ). Não foi observada diferença significativa entre os grupos nos níveis 5-HIAA ou entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos (Figura 12B).

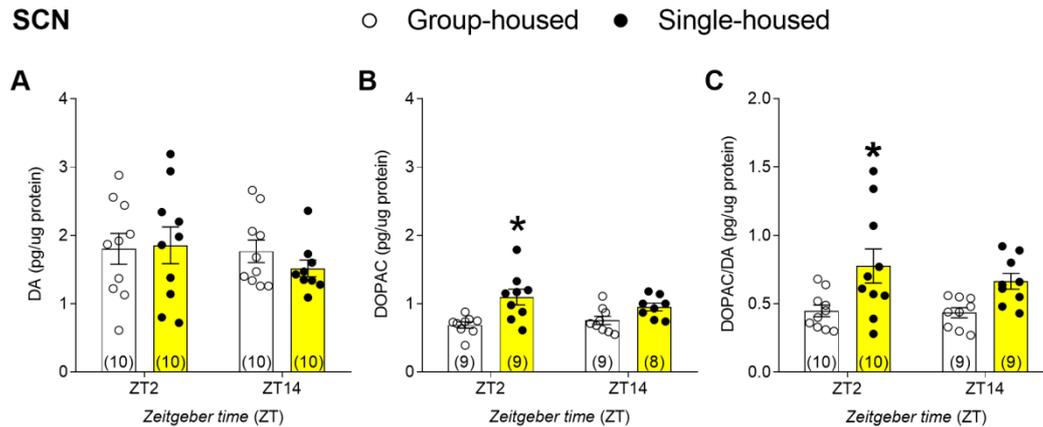
Já em relação a razão 5-HIAA/5-HT, a análise estatística demonstrou um efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,36)} = 11.68$ ,  $p = 0.0016$ ), mas não houve efeito significativo do ZT ( $F_{(1,36)} = 0.059$ ,  $p = 0.8080$ ) e interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,36)} = 0.7032$ ,  $p = 0.4072$ ). O pós teste demonstrou que houve um aumento significativo da razão 5-HIAA/5-HT no ZT2 em camundongos SH em relação aos GH, sem diferença observada entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos (Figura 12C).



**Figura 12: O isolamento social aumenta a atividade dos terminais serotoninérgicos no SCN no ZT2.** (A) Os níveis de 5-HT, (B) 5-HIAA e (C) e a razão 5-HIAA/5-HT no SCN são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH após 28 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. Número de animais está entre parênteses. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*).

Em relação aos níveis de DA no SCN, não foi observado efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,35)} = 0.2270$ ,  $p = 0.6368$ ), do ZT ( $F_{(1,35)} = 0.8123$ ,  $p = 0.3736$ ) ou interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,35)} = 0.5363$ ,  $p = 0.4689$ ). A análise do pós teste não mostrou diferença significativa entre os grupos nos níveis de DA, bem como entre ZT2 e ZT14 dentro de cada grupos (Figura 13A).

Por outro lado, a análise estatística demonstrou que houve efeito significativo da condição de habituação nos níveis de DOPAC ( $F_{(1,31)} = 15.89$ ,  $p = 0.0004$ ) e na razão DOPAC/DA ( $F_{(1,34)} = 13.16$ ,  $p = 0.0009$ ). No entanto, não houve efeito significativo do ZT nos níveis de DOPAC ( $F_{(1,31)} = 0.2610$ ,  $p = 0.6130$ ), na razão DOPAC/DA ( $F_{(1,34)} = 0.6617$ ,  $p = 0.4216$ ), tampouco houve interação entre condição de habituação e ZT nos níveis de DOPAC ( $F_{(1,31)} = 1.973$ ,  $p = 0.1701$ ) e na razão DOPAC/DA ( $F_{(1,34)} = 0.4060$ ,  $p = 0.5283$ ). A análise do pós teste mostrou que houve um aumento significativo nos níveis de DOPAC (Figura 13B) e a razão DOPAC/DA (Figura 13C) foram significativamente elevadas no ZT2 no grupo SH em relação ao grupo controle, sem diferenças entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos.

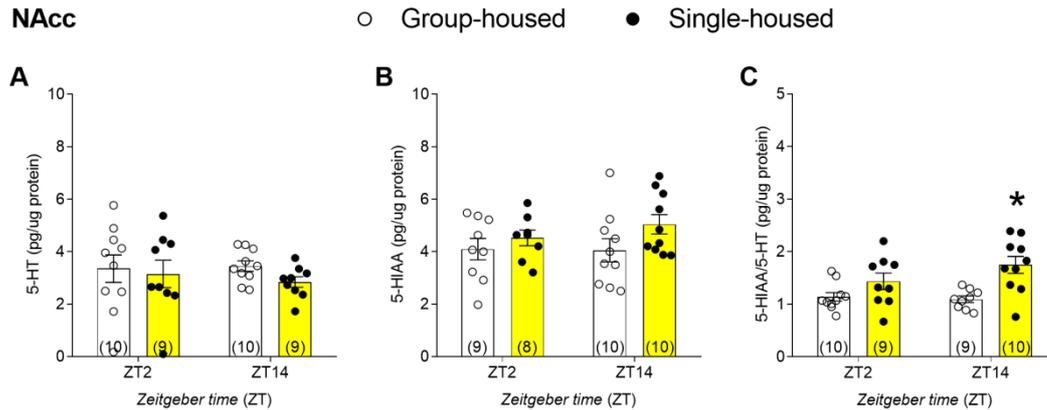


**Figura 13: O isolamento social aumenta a atividade dos terminais dopaminérgicos no SCN no ZT2.** (A) Os níveis de DA, (B) DOPAC e (C) e a razão DOPAC/DA no SCN são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH após 28 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. Número de animais está entre parênteses. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*).

### 6.8. Efeito do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no NAcc

No NAcc, a análise estatística não demonstrou efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,34)} = 1.039$ ,  $p = 0.3153$ ), do ZT ( $F_{(1,34)} = 0.068$ ,  $p = 0.7954$ ) e da interação da condição de habituação e ZT ( $F_{(1,34)} = 0.2583$ ,  $p = 0.6146$ ) nos níveis de 5-HT. Já para os níveis de 5-HIAA também não foi observado efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,33)} = 3.288$ ,  $p = 0.0789$ ), do ZT ( $F_{(1,33)} = 0.3563$ ,  $p = 0.5546$ ) e da interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,33)} = 0.5281$ ,  $p = 0.4725$ ). A análise do pós teste demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis de 5-HT (Figura 14A) e 5-HIAA (Figura 14B) nos diferentes ZTs, tampouco entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos.

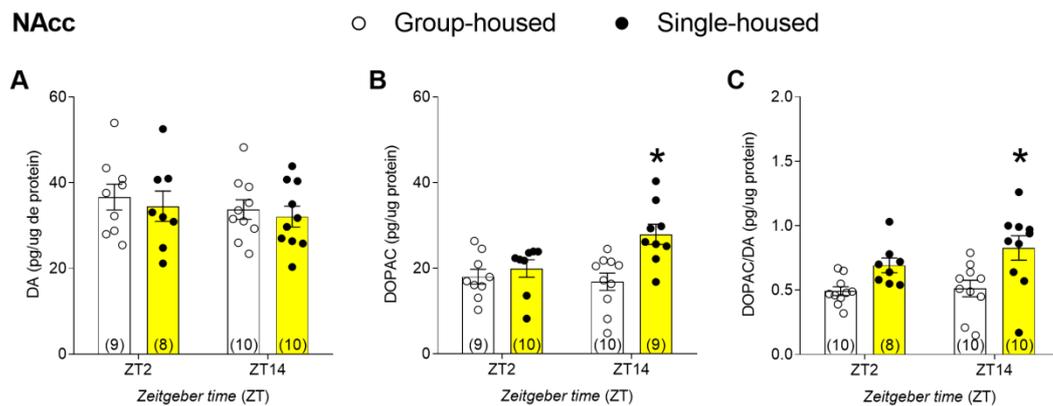
Por outro lado, a análise estatística demonstrou que houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,34)} = 14.43$ ,  $p = 0.0006$ ) na razão 5-HIAA/5-HT. No entanto, não houve efeito significativo do ZT ( $F_{(1,34)} = 1.147$ ,  $p = 0.2917$ ) ou interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,34)} = 2.110$ ,  $p = 0.1555$ ). O pós teste mostrou que houve um aumento significativo na razão 5-HIAA/5-HT no grupo SH em relação ao grupo controle no ZT14 (Figura 14C), sem diferença entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos.



**Figura 14: O isolamento social aumenta a atividade dos terminais serotoninérgicos e dopaminérgicos no NAcc no ZT14.** (A) Os níveis de 5-HT, (B) 5-HIAA e (C) a razão 5-HIAA/5-HT no NAcc são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH após 28 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. Número de animais está entre parênteses. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*).

Em relação aos níveis de DA no NAcc, a análise estatística demonstrou que não houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,33)} = 0.4544$ ,  $p = 0.5050$ ), do ZT ( $F_{(1,33)} = 0.9094$ ,  $p = 0.3472$ ), tampouco interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,33)} = 0.0078$ ,  $p = 0.9299$ ). O pós teste não mostrou diferença estatística entre os grupos nos níveis de DA nos diferentes ZTs ou diferença entre ZT2 e ZT14 dentro de cada grupo (Figura 15A).

Sobre os níveis de DOPAC, a análise estatística demonstrou que houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,32)} = 9.936$ ,  $p = 0.0035$ ), mas não houve efeito significativo do ZT ( $F_{(1,32)} = 2.742$ ,  $p = 0.1075$ ), tampouco interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,32)} = 4.919$ ,  $p = 0.0338$ ). Já em relação a razão DOPAC/DA, a análise estatística demonstrou que houve efeito significativo da condição de habituação ( $F_{(1,34)} = 14.55$ ,  $p = 0.0006$ ), no entanto, não houve efeito significativo do ZT ( $F_{(1,34)} = 1.318$ ,  $p = 0.2589$ ), tampouco interação entre condição de habituação e ZT ( $F_{(1,34)} = 0.7274$ ,  $p = 0.3997$ ). A análise do pós teste mostrou que houve um aumento significativo nos níveis de DOPAC (Figura 15B) e na razão DOPAC/DA (Figura 15C) no ZT14, sem diferença estatística entre ZT2 e ZT14 dentro dos grupos.



**Figura 15: O isolamento social aumenta a atividade dos terminais serotoninérgicos e dopaminérgicos no NAcc no ZT14.** (A) Os níveis de DA, (B) DOPAC e (C) e a razão DOPAC/DA no NAcc são apresentados como média  $\pm$  EPM para camundongos GH e SH após 28 dias de agrupamento ou isolamento social em ciclo claro e escuro de 12:12h. Número de animais está entre parênteses. \*,  $p < 0.05$  GH versus SH (ANOVA de duas vias, pós teste *Sidak*).

## 7. DISCUSSÃO

Demonstramos que a interação social recruta neurônios vasopressinérgicos do SCN para garantir a atividade neuronal do SCN no início da fase de luz. Dos possíveis substratos neurais envolvidos neste efeito da interação social sobre o SCN, mostramos que os alvos do SCN afetados pela interação social relacionam-se com as respostas ao estresse e de alerta, bem como à recompensa (PVN, LC e NAcc). Além disso, os sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e dopaminérgico ao SCN são modulados pela interação social, uma vez que o isolamento social provocou um aumento na atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN no ZT2.

### 7.1. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos e VIP-IOD no SCN

A fim de avaliar o fenótipo dos neurônios com redução na c-Fos-ir em camundongos SH, realizamos a dupla marcação por IHC de AVP e c-Fos no SCN. Demonstramos que, de fato, houve uma redução significativa da porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos no SCN de camundongos SH em relação aos GH. A liberação de AVP do SCN tem início no final da fase de escuro e atinge seu pico durante a fase de claro (KALSBECK et al., 1995). Já foi demonstrado que a comunicação vasopressinérgica do SCN com o núcleo arqueado (ARC) e núcleo pré óptico mediano (MnPO) está envolvida no controle da temperatura ao longo do dia (GUZMÁN-RUIZ et al., 2015). Gúzman-Ruiz et al. (2015) demonstraram que o aumento na liberação de AVP pelo SCN é responsável pela redução da Tc durante a fase de claro, uma vez que a AVP inibe a ação de neurônios  $\alpha$ -MSH do ARC - que possuem ação termogênica durante a fase de escuro - permitindo que a AVP liberada no MnPO exerça o seu efeito hipotérmico (GUZMÁN-RUIZ et al., 2015). Dessa forma, a ativação de neurônios vasopressinérgicos do SCN pela interação social pode contribuir para a manutenção da Tc nesta fase. De fato, mostramos que o isolamento social reduz significativamente os níveis de Tc durante a fase de claro (FERNANDES et al., 2021). Outras análises são necessárias para confirmar se a atividade aumentada de neurônios vasopressinérgicos se relacionam com a liberação de AVP nos núcleos envolvidos com termogênese.

Além disso, sabe-se que os neurônios vasopressinérgicos do SCN co-expressam GABA e prokinectina 2 (PK2) (MIEDA et al., 2015) A PK2, por sua vez, está relacionada à regulação do ritmo de SLA, provavelmente por meio da sua ação sobre a variação

circadiana da atividade dos neurônios do SCN (LI et al., 2006; REN et al., 2011). Camundongos com deleção de *Bmal1* - um dos genes de relógio que compõem a alça positiva da maquinaria do sistema circadiano - especificamente em neurônios vasopressinérgicos no SCN apresentam redução nos níveis de RNAm de *PK2* (MIEDA et al., 2015). Além disso, camundongos nocautes para *PK2* apresentam redução da atividade locomotora na roda, além de atenuação na Tc e no sono total na fase de repouso (LI et al., 2006). Uma redução significativa da SLA total, bem como do mesor do ritmo circadiano de SLA foi observada em camundongos SH mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12h, sem alterar o arrastamento do ritmo diário de SLA (FERNANDES et al., 2021). Portanto, é plausível propor que a redução da atividade dos neurônios vasopressinérgicos no SCN no ZT2 de animais isolados seja acompanhado de uma redução da *PK2*, e concomitante redução da SLA total.

No presente trabalho também avaliamos a imunorreatividade de VIP no SCN através da análise de densidade óptica integrada (IOD). Esta estratégia de análise foi utilizada porque não foi possível distinguir neurônios VIP-ir, dada a intensa marcação de VIP em neurônios e suas fibras. Não foi observado diferença entre camundongos SH e GH na VIP-IOD. Com esta técnica é possível inferir o efeito do isolamento social sobre a produção de VIP. Dessa forma, concluímos que a expressão deste polipeptídeo não está alterada em camundongos SH. Evidências na literatura mostram que VIP tem um papel importante na sincronização entre os neurônios do SCN o que permite que este núcleo exerça o seu papel de marcapasso (HERZOG et al., 2017). A perturbação da sinalização VIPérgica, além de seus efeitos de reduzir a atividade e a sincronia entre os neurônios do SCN, produz alterações no arrastamento do ritmo de atividade locomotora ao ciclo claro e escuro de 12:12h, abole este ritmo em escuro constante, e reduz a amplitude do ciclo sono e vigília (ATON et al., 2005; HARMAR et al., 2002; TODD et al., 2020). De fato, os ritmos de SLA e Tc mantêm-se arrastados ao ciclo claro e escuro de 12:12h (FERNANDES et al., 2021) nos animais isolados, corroborando com o fato de a interação social não ter interferido com a sinalização VIPérgica no SCN.

De la Iglesia et al. (2004) demonstraram elegantemente através de um protocolo de dessincronização forçada, que ratos expostos a um ciclo claro e escuro de 11:11h mostram uma separação entre as subdivisões v- e d-SCN em dois osciladores individuais (DE LA IGLESIA et al., 2004). Um oscilador é responsável pelo ritmo de atividade locomotora com período de 22 h, arrastado ao ciclo de iluminação ambiental e o outro pelo ritmo de

atividade locomotora com período de livre-curso de cerca de 24 h. O oscilador (ou relógio) responsável pelo período de 22 h está localizado na porção v-SCN, e o segundo responsável pelo ritmo de atividade com um período maior que 24 h, ou seja, não arrastado ao ciclo de iluminação, está associado ao relógio da porção d-SCN (DE LA IGLESIA et al., 2004). Interessantemente, foi demonstrado que sob este protocolo, a Tc oscila de acordo com o período maior que 24 h, aquele que não é arrastado ao ciclo de iluminação, ou seja, com a porção d-SCN (CAMBRAS et al., 2007). A redução na atividade de neurônios vasopressinérgicos no ZT2 mostrada no presente trabalho, somado ao fato de animais isolados mostrarem alterações significativas nos parâmetros do ritmo diário de Tc (FERNANDES et al., 2021), permitem concluir que a interação social promove um efeito de mascaramento sobre o ritmo diário de Tc via ativação de neurônios vasopressinérgicos do d-SCN.

## **7.2. Efeitos do isolamento social sobre a atividade neuronal da POA no ZT2 e ZT14**

Demonstramos anteriormente que o isolamento social provoca redução nos níveis de Tc na fase de claro, que foi acompanhado por uma redução no ganho peso em camundongos SH mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12h, sem alteração na ingesta alimentar (FERNANDES et al., 2021). Curiosamente, estas alterações não são observadas em camundongos SH mantidos em condições de escuro constante (FERNANDES et al., 2021). Frente a estes resultados, avaliamos a atividade neuronal da POA em condições de ciclo claro e escuro de 12:12h, região sabidamente envolvida na termogênese e gasto energético (TAN; KNIGHT, 2018).

Não foi observado efeito do isolamento social sobre o número de neurônios c-Fos-ir na POA, tampouco diferença entre os ZTs dentro dos diferentes grupos. Zhang et al. (2020) demonstraram que a ativação quimiogênica de neurônios que expressam OPN5 na POA abole a atividade do BAT e reduz a Tc (ZHANG et al., 2020), contradizente ao fenótipo previamente descrito em animais isolados e os dados do presente estudo. Portanto, a redução na Tc e no ganho de peso observada em camundongos SH mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12h não pode ser explicada por um aumento da atividade neuronal da POA global. Provavelmente, neurônios específicos sejam recrutados na POA na condição de agrupamento para a manutenção do ganho de peso e Tc ingesta alimentar e

atividade locomotora. Futuros experimentos são necessários para identificação destes neurônios.

Como mencionado anteriormente, o MnPO, participa do controle do ritmo diário de Tc, que depende da ação da AVP vinda do SCN sob neurônios GABAérgicos do MnPO e neurônios  $\alpha$ -MSH do ARC (GUZMÁN-RUIZ et al., 2015). Portanto, uma vez que não vimos alteração na atividade neuronal da POA global em camundongos SH, é possível especular que o isolamento social afete especificamente a atividade de neurônios GABAérgicos do MnPO e/ou de neurônios  $\alpha$ -MSH no ARC. Apesar de não termos observado aumento no número de neurônios vasopressinérgicos ativados no ZT2 comparado ao ZT14, ainda há a possibilidade de o isolamento social ter comprometido a liberação de AVP no MnPO na fase de claro, o que explicaria em partes a redução nos níveis de Tc nesta fase (FERNANDES et al., 2021). Outros experimentos são necessários para corroborar tais hipóteses. Portanto, nosso resultado aponta que a interação social não recruta a POA a fim de exercer seus efeitos sobre o ritmo diário de Tc e ganho de peso, no entanto, é possível que o MnPO seja a região da POA recrutada pela pista social.

### **7.3. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN no ZT2 e ZT14**

Avaliamos a seguir a atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN, região que recebe projeções VIPérgicas e vasopressinérgicas do SCN (ABRAHAMSON; MOORE, 2001). Demonstramos que o isolamento social reduziu significativamente a atividade de neurônios vasopressinérgicos do PVN no ZT2, mesmo horário em que se observou uma redução na atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN em camundongos SH. Interessantemente, essa redução da atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN também foi observada no ZT14 em camundongos SH em relação aos GH.

O protocolo de isolamento social também é utilizado como ferramenta para estudar os efeitos da solidão, especialmente em roedores recém-desmamados, estágio da vida em que os impactos do estresse são mais evidentes em relação a roedores adultos. Ratos machos socialmente isolados por sete semanas a partir do 21º dia pós-desmame não apresentam alteração no número de neurônios c-Fos-ir no PVN (TOTH et al., 2012). Além disso, ratos machos adultos socialmente isolados por 22 dias não apresentam diferença no número de neurônios c-Fos-ir no PVN em relação aos animais agrupados (WESTENBROEK; DEN BOER; TER HORST, 2003). Por outro, camundongos adultos

mantidos isolados e expostos ao protocolo de residente-intruso apresentam um aumento no número de c-Fos-ir no PVN (TOTH et al., 2012), corroborando a ideia de que a interação social recruta o PVN. Portanto, além da idade, os impactos do isolamento social também se diferem dependendo da espécie estudada.

No trabalho de Ieraci et al (2016) foi demonstrado que camundongos C57Bl6/J adultos machos, mesma espécie; linhagem e idade utilizados no presente trabalho, interessantemente apresentam uma redução nos níveis de corticosterona após 33 dias de isolamento social (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016). A AVP proveniente de neurônios da porção parvocelular do PVN, assim como CRF, está diretamente envolvida na regulação do eixo HPA (AGUILERA; RABADAN-DIEHL, 2000). Por outro lado, não observamos diferença na AVP-ir no PVN entre camundongos SH e GH, indicando que o isolamento social parece não alterar a regulação do eixo HPA.

A AVP está associada ao controle do comportamento social, no entanto, ainda não está claro de onde parte a fonte vasopressinérgica envolvida nesse controle (BACHNER-MELMAN; EBSTEIN, 2014). Nossos achados apontam para a importância dos neurônios vasopressinérgicos do PVN como uma possível fonte de vasopressina para o sistema nervoso central para a regulação do comportamento social. Recentemente, Rigney et al. (2021) demonstraram que a deleção de neurônios AVP no PVN aumenta a investigação social de co-específicos em fêmeas, mas não em machos. No entanto, em machos a deleção destes neurônios aumentou comportamentos relacionados à ansiedade não social. Portanto, os neurônios vasopressinérgicos no PVN parecem controlar interações sociais e o comportamento tipo-ansioso, porém, de uma maneira sexo-dependente (RIGNEY et al., 2021). Não podemos descartar a participação de neurônios ocitocinérgicos, uma vez que a ativação ou inibição quimiogénica de neurônios ocitocinérgicos no PVN aumenta ou reduz a investigação social, respectivamente, durante o teste de escolha social (RESENDEZ et al., 2020). Em animais recém-desmamados, duas semanas de isolamento social reduz o número de neurônios AVP-ir em machos e OT-ir em fêmeas na porção parvocelular do PVN, e estas respostas foram acompanhadas por dificuldade na tarefa de reconhecimento social (TANAKA; OSAKO; YURI, 2010).

A redução da atividade de neurônios vasopressinérgicos induzida pela privação social no ZT14 pode estar relacionada com o papel destes neurônios na manutenção do estado de alerta, visto que ocorre uma maior interação social na fase de escuro, quando também o

estado de alerta está aumentado. Portanto, a interação social parece recrutar neurônios vasopressinérgicos na fase de atividade, possivelmente como consequência dos próprios comportamentos sociais inatos do animal.

Por outro lado, vimos que a porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos é maior no ZT2 em camundongos GH em relação ao ZT14. Isso possivelmente se deve às projeções diretas do d-SCN para neurônios vasopressinérgicos do PVN, uma vez que os neurônios do d-SCN são ativados pela luz no início da fase de claro em camundongos GH (FERNANDES et al., 2021) e, apesar de não termos detectado uma diferença significativa na porcentagem de neurônios AVP que expressam c-Fos entre ZT2 e ZT14 em camundongos GH no SCN, houve uma tendência de uma maior atividade destes neurônios no ZT2.

Tem sido demonstrado que o PVN também possui um papel importante no controle do estado de alerta em roedores, especialmente via neurônios glutamatérgicos (LIU et al., 2020) e/ou neurônios que sintetizam CRF (ONO et al., 2020). Ono et al. (2020) demonstraram que neurônios CRF do PVN são mais ativos durante o estado de alerta e menos ativos durante o sono, assim como a ativação optogenética destes neurônios também induzem um estado de alerta. Este controle dos neurônios CRF do PVN ocorre através da ativação de neurônios orexinérgicos no hipotálamo lateral (LH), conhecidos pelo seu papel importante na manutenção da vigília (ONO et al., 2020). Interessantemente, foi demonstrado que a excitabilidade dos neurônios CRF do PVN é regulada por neurônios GABAérgicos provenientes do SCN. Portanto, durante a fase de escuro os neurônios GABAérgicos do SCN são inativados permitindo o aumento da atividade de neurônios CRF no PVN, e estes, por sua vez, ativam neurônios orexinérgicos no hipotálamo lateral (LH) levando a um aumento no estado de alerta. O contrário ocorre durante a fase de claro, quando neurônios GABAérgicos do SCN são ativados, ocorre uma inibição dos neurônios CRF no PVN e, conseqüentemente inibição dos neurônios orexinérgicos no LH (ONO et al., 2020).

A interação social é considerada um *zeitgeber* não fótico do sistema circadiano. É uma pista que ocorre com maior prevalência na fase de atividade, e que quando acontece na fase de repouso, provoca um aumento do estado de alerta (MISTLBERGER; ANTLE, 2011). Sabe-se através de evidências da literatura que CRF e AVP no PVN (AGUILERA; RABADAN-DIEHL, 2000), bem como GABA e AVP no SCN (ABRAHAMSON;

MOORE, 2001) são expressas nos mesmos neurônios. Portanto, a redução da atividade de neurônios vasopressinérgicos no PVN no ZT14 poderia refletir uma redução da atividade de neurônios CRF, o que indicaria uma perturbação provocada pelo isolamento social no estado de alerta. No entanto, não vimos aumento da atividade de neurônios vasopressinérgicos no SCN no ZT14. Portanto, nossos resultados nos permitem propor que a presença da pista social em conjunto com a luz é importante não só para a atividade de neurônios do SCN, mas também para a atividade de uma das suas principais regiões eferente envolvida no controle do estado de alerta, comportamento social, e regulação do eixo HPA.

#### **7.4. Efeitos do isolamento social sobre a atividade de neurônios noradrenérgicos no LC no ZT2**

Outra região importante envolvida no controle do ciclo sono e vigília é o LC, que recebe projeções indiretas, via DMH, do SCN. (ASTON-JONES et al., 2001; BERRIDGE; SCHMEICHEL; ESPAÑA, 2012; CARTER et al., 2010; GONZÁLEZ; ASTON-JONES, 2006, 2006). No presente trabalho, vimos que o isolamento social reduz a atividade de neurônios noradrenérgicos no LC no ZT2, sem alterar o número de neurônios TH-ir. Este último resultado vai de encontro com a literatura, onde foi observado que o isolamento social de ratos por 4 meses não altera o número de neurônios TH-ir no LC em relação ao grupo controle (HUANG et al., 2011). Por outro lado, o isolamento social de ratos por 6 semanas reduz os níveis de noradrenalina (NA) em regiões alvo do LC, como o córtex frontal e hipocampo, sem alterar a expressão do transportador de NA no LC (MITSUYA et al., 2015).

O SCN é importante na geração do ciclo sono e vigília, uma vez que dele partem projeções diretas e indiretas para diversas áreas envolvidas na promoção do sono ou vigília, tais como POA, (área que atua na promoção do sono) e HL; (área que atua na promoção do estado de alerta). Estas regiões, por sua vez, emitem projeções para centros monoaminérgicos relacionados com o estado de vigília no tronco cerebral, tais como LC, DRN, VTA e núcleo tuberomamilar (KORF; VON GALL, 2016). Os neurônios noradrenérgicos do LC de ratos machos e fêmeas apresentam atividade circadiana e arrastadas ao ciclo claro e escuro de 12:12h, sendo mais ativos na fase de atividade ou durante o estado de vigília, e menos ativos na fase de repouso ou durante o sono (ASTON-JONES et al., 2001; ASTON-JONES; BLOOM, 1981; POLETINI et al., 2007). Desta

forma, aventa-se que estes neurônios participem dos circuitos responsáveis pelo estado de alerta.

Em ratas fêmeas, o relógio central é necessário para a variação circadiana dos neurônios noradrenérgicos do LC (POLETINI et al., 2007). Já em camundongos C57Bl6/J, a lesão do SCN provoca um aumento na duração do sono NREM (movimento não rápido dos olhos) tanto em animais mantidos em ciclo claro e escuro de 12:12h quanto em condições de escuro constante, além de uma redução no estado de alerta na fase de escuro e noite subjetiva (EASTON et al., 2004). Além disso, a inibição optogenética dos neurônios do LC em camundongos reduz significativamente a duração de tempo acordado e aumenta a duração do sono NREM, por outro lado, a estimulação destes neurônios produz uma imediata transição do estado de sono para o estado de alerta (CARTER et al., 2010).

Demonstramos que o isolamento social reduziu a atividade de neurônios noradrenérgicos do LC. Sabe-se que fibras vasopressinérgicas provenientes do SCN se projetam para o DMH, que por sua vez, participa do controle do estado de alerta através de projeções enviadas para os neurônios noradrenérgicos do LC (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; ASTON-JONES et al., 2001; GONZÁLEZ; ASTON-JONES, 2006). Somado a isso, animais isolados mostram redução da SLA total (FERNANDES et al., 2021), indicando uma possível diminuição do estado de alerta. Interessantemente, a ativação tônica de neurônios do LC na fase repouso provoca aumento da atividade locomotora geral (CARTER et al., 2010). Assim aventamos que o isolamento social afete especialmente o estágio de sono e/ou a transição entre sono e vigília, sendo que esta perturbação possivelmente seja uma consequência da redução da atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC.

Assim como o PVN, os neurônios noradrenérgicos do LC são prontamente ativados frente a diversos tipos de estresse agudos, causando aumento na expressão do RNAm e das proteínas c-Fos e TH. Existe uma inervação recíproca entre o PVN e o LC, que participa das respostas ao estresse (KOVÁCS, 2013; VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2008). Dessa forma, a redução da atividade neuronal no PVN no ZT2 promovida pelo isolamento social, especialmente de neurônios vasopressinérgicos pode estar relacionada com a redução da atividade de neurônios noradrenérgicos no LC neste mesmo ZT. Outras análises são necessárias para confirmar esta hipótese, bem como para investigar os efeitos do isolamento social sobre a liberação de NA neste circuito.

Frente ao exposto, propomos que a interação social como pista do sistema circadiano, além do PVN, também recruta o LC. Sendo que a presença da interação social em conjunto com a luz é necessária para a manutenção da atividade do SCN e de suas regiões eferentes envolvidas no controle do estado de alerta, resposta ao estresse, comportamento social e regulação do eixo HPA.

### **7.5. Efeitos do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN e no NAcc no ZT2 e ZT14**

A seguir, avaliamos o efeito do isolamento social sobre a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no SCN e NAcc. Em relação à atividade serotoninérgica no SCN, demonstramos que o isolamento social provocou um aumento no *turnover* serotoninérgico no ZT2, avaliado através da razão 5-HIAA/5-HT. Já no NAcc, o aumento do *turnover* serotoninérgico ocorreu no ZT14. Apesar da 5-HT ser um neurotransmissor cuja liberação é aumentada na fase de atividade e em razão do estado de alerta (CHALLET, 2007), não vimos um aumento significativo nos níveis deste neurotransmissor no ZT14 em relação ao ZT2 tanto no SCN quanto no NAcc, assim como também não observamos este padrão no *turnover* serotoninérgico no SCN tanto em camundongos GH quanto SH.

Trabalhos têm demonstrado que a sinalização serotoninérgica apresenta um efeito marcante na c-Fos-ir frente à exposição à luz a noite (GLASS et al., 1995; MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999). A exposição a um pulso de luz durante a noite subjetiva ou fase de escuro, induz um aumento significativo no número de neurônios c-Fos-ir no SCN (DUY et al., 2020; MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999), e o SCN de roedores recebe projeções diretas da MRN e indiretas do DRN (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; BANG et al., 2012; MUZERELLE et al., 2016). Em hamsters, a estimulação elétrica do DRN e MRN, que possivelmente aumenta a liberação de 5-HT no SCN, seguida de um pulso de luz de 10 minutos no ZT14, provoca uma redução significativa no número de neurônios c-Fos-ir no SCN em relação aos animais que receberam pulso de luz mas não a estimulação elétrica na rafe. Esta redução foi observada nas duas porções do SCN, sendo mais proeminente na porção d-SCN (MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999). O mesmo resultado sobre o número de neurônios c-Fos-ir foi observado em hamsters que tiveram sua sinalização serotoninérgica aumentada no SCN pela injeção intraperitoneal de L-triptofano seguida de um pulso de luz de 30 minutos no CT19. Além disso, neste trabalho

também foi observado um aumento concomitante da sinalização serotoninérgica no SCN no ZT18.5 com a redução significativa da liberação de glutamato no SCN, neurotransmissor que participa da transmissão da informação fóptica do TRH para o SCN (GLASS et al., 1995).

Por outro lado, camundongos nocautes para o gene *Pet-1* que apresentam uma redução de até 70% no número de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos em animais adultos, não apresentaram diferença no número de neurônios *c-Fos-ir* no SCN em relação ao grupo WT, frente a um pulso de luz de 15 minutos no ZT16 (PAULUS; MINTZ, 2013). No presente trabalho, não foi avaliado o efeito do isolamento social sobre pulso de luz a noite. No entanto, vimos que o isolamento social aumenta a atividade serotoninérgica no início da fase de claro, no mesmo horário em que observamos redução da *c-Fos-ir* (FERNANDES et al., 2021), sugerindo que o aumento na liberação de 5-HT pelos terminais pré-sinápticos induzido pelo isolamento social tenha impactado a atividade neuronal do SCN no início da fase de claro.

As projeções serotoninérgicas provenientes do MRN chegam até a porção v-SCN (ABRAHAMSON; MOORE, 2001). Até o presente momento, não há indícios de comunicação direta entre neurônios serotoninérgicos provenientes da rafe e a porção d-SCN. Por outro lado, o isolamento social diminui a atividade neuronal do d-SCN e não do v-SCN (FERNANDES et al., 2021). Frente a este resultado, aventamos que o aumento na atividade serotoninérgica no SCN possivelmente afete a comunicação entre os neurônios das porções ventral e dorsal do SCN.

Existem pelo menos 14 subtipos de receptores serotoninérgicos, sendo vários deles encontrados no SCN (MISTLBERGER; ANTLE, 2011). O isolamento social de camundongos por 4 semanas é suficiente para reduzir a densidade do receptor 5-HT<sub>1A</sub> em várias regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo (SCHILLER et al., 2003). Este receptor é encontrado tanto no SCN quanto no mesencéfalo mediano e DRN onde atua como autoreceptor controlando a sinalização serotoninérgica (MISTLBERGER; ANTLE, 2011). Foi demonstrado que diferentes agonistas de 5-HT<sub>1A</sub> também provocam redução no número de neurônios *c-Fos-ir* no SCN após pulso de luz no final da fase de escuro, sugerindo que este receptor apresenta um papel importante na resposta à luz do SCN (GLASS; SELIM; REA, 1994).

Além do seu papel na modulação da resposta à luz do SCN, a sinalização serotoninérgica parece estar envolvida na transmissão do estímulo não fótico para o SCN, uma vez que tanto a estimulação elétrica da MRN e DRN, quanto o uso do agonista 5-HT<sub>1A/7</sub> provocam mudança de fase não-fótica do ritmo de atividade locomotora (CUESTA et al., 2009; GLASS; DINARDO; EHLEN, 2000; MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999; SHELTON et al., 2014). Portanto, o aumento da sinalização serotoninérgica aumenta o estado de vigília e, considerando que a interação é uma pista ambiental que causa este mesmo efeito, é possível aventar que a pista social recrute a região de onde parte as principais projeções serotoninérgicas do sistema nervoso central, o núcleo da rafe, especialmente a MRN e DRN.

A interação social, além de ser conhecida como uma pista do sistema circadiano (MROSOVSKY, 1988), e, como mostrado recentemente, um agente de mascaramento sobre a atividade do SCN e do ritmo diário de Tc (FERNANDES et al., 2021), também é considerada um estímulo de recompensa para roedores (DÖLEN et al., 2013; WALSH et al., 2018). Recentemente foi demonstrado que a estimulação da liberação de 5-HT no NAcc promove um aumento na sociabilidade via ativação do receptor 5-HT<sub>1B</sub>, sendo que interações sociais não agressivas, como a de acasalamento, por exemplo, aumenta a atividade de neurônios serotoninérgicos no DRN. Por outro lado, a inibição destes neurônios reduz a busca por interações sociais (WALSH et al., 2018). Além disso, também já foi demonstrado que a recompensa associada à interação social requer a atividade coordenada de OT e 5-HT no NAcc, de tal forma que a OT proveniente do PVN controla a liberação de 5-HT no NAcc através de seu receptor presente nos terminais serotoninérgicos derivados do DRN, sendo esta ação da 5-HT também via receptor 5-HT<sub>1B</sub> (DÖLEN et al., 2013). Sabe-se que interações sociais ocorrem com maior frequência na fase de atividade, especialmente na natureza ou em ambientes controlados de ciclo claro e escuro. No presente trabalho o aumento na atividade serotoninérgica no NAcc foi observada justamente no horário correspondente a fase de atividade, indicando que a privação social provoca um aumento nesta sinalização como um mecanismo de compensação à falta dessa fonte de recompensa.

Demonstramos que o isolamento social aumentou a atividade dopaminérgica avaliada através da razão DOPAC/DA no ZT2 no SCN. Já no NAcc, o isolamento social também aumentou a atividade dopaminérgica, porém no ZT14. A DA, assim como a 5-HT, apresenta seu pico de liberação durante a fase de atividade, e níveis mais baixos na fase

de repouso (FERRIS et al., 2014). No entanto, não vimos um aumento significativo nos níveis deste neurotransmissor no ZT14 em relação ao ZT2 no NAcc, assim como também não observamos este padrão no *turnover* dopaminérgico no SCN tanto em camundongos GH quanto SH.

O sistema dopaminérgico está envolvido na modulação de diversos comportamentos considerados *zeitgebers* não-fóticos, tais como comportamento alimentar, exercício físico e interação social (GRIPPO; GÜLER, 2019), ou seja, comportamentos que também estão relacionados ao estado de alerta. Sabe-se que neurônios dopaminérgicos da VTA estão envolvidos no controle do ciclo sono e vigília através do controle de comportamentos etologicamente relevantes (EBAN-ROTHSCHILD et al., 2016). Por exemplo, a exposição de um camundongo fêmea a um camundongo macho aumenta a atividade de neurônios dopaminérgicos da VTA nos machos, e esta interação sexual é conhecida por aumentar o estado de vigília. Por outro lado, durante a execução de um comportamento inato relacionado ao sono, a construção do ninho, observa-se uma redução na atividade destes neurônios. Curiosamente, quando essa exposição da fêmea ao macho é associada a uma inibição optogenética dos neurônios dopaminérgicos da VTA, observa-se uma redução do estado de alerta e aumento do sono NREM, além de um aumento do comportamento de construção do ninho. Já a ativação optogenética destes neurônios, aumenta o estado de alerta e inibe o comportamento de construção do ninho. Interessantemente, estes efeitos observados no sono e vigília parecem ser mediados pela comunicação dopaminérgica da VTA com o NAcc. Portanto, a via mesolímbica dopaminérgica, composta por projeções da VTA para o NAcc, além de participarem de processos motivacionais ligados a recompensa, também estão envolvidos no controle do estado de alerta relacionado à saliência adaptativa (EBAN-ROTHSCHILD et al., 2016).

Como já mencionado, a via mesolímbica dopaminérgica está envolvida com comportamentos motivacionais de busca a recompensa (BAIK, 2013; RADEMACHER et al., 2017). Dados do nosso grupo mostram que o protocolo de isolamento social utilizado no presente trabalho provoca um aumento da preferência à sacarose em relação à água durante da fase de escuro (dados não publicados), resultado que é corroborado por dados na literatura (BERRY et al., 2012; COUDEREAU et al., 1999). Assim como em camundongos machos adultos, também já foi observado aumento no consumo de sacarose em ratos machos isolados pós desmame (BRENES; FORNAGUERA, 2009) e em fêmeas isoladas na adolescência (HONG et al., 2012). Além disso, o isolamento social de

camundongos na adolescência aumentou o consumo de etanol na fase adulta (LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER; BECKER, 2011; LOPEZ; LABER, 2015). Em conjunto, estes resultados nos permite propor que o isolamento social provoque alterações nos mecanismos envolvidos na busca e processamento da recompensa.

A via mesolímbica dopaminérgica também tem sido associada ao controle do comportamento social. Gunaydin et al. (2014) demonstraram que a dinâmica de atividade dos neurônios dopaminérgicos da VTA que se projetam para o NAcc codifica e prediz a interação social, via receptor D1 localizados nos neurônios espinhosos médios do NAcc. Foi observado que a exposição a um co-específico do mesmo sexo aumenta a atividade da VTA e aumenta a expressão de c-Fos no NAcc, assim como a ativação ou inibição optogenética dos neurônios dopaminérgicos da VTA aumentam e diminuem a exploração social, respectivamente (GUNAYDIN et al., 2014). Interessantemente, este aumento na atividade de neurônios dopaminérgicos na VTA como consequência da interação social depende da liberação de OT a partir de terminais pré-sinápticos provenientes do PVN (HUNG et al., 2017).

O isolamento social de ratos pós desmame por 7 e 8 semanas provoca um aumento na liberação e recaptção de DA no NAcc (KARKHANIS et al., 2016; YORGASON et al., 2016), resultado semelhante ao observado no presente trabalho, em que observamos um aumento do *turnover* dopaminérgico nessa região. Interessantemente, em seres humanos, foi observado através de exames de imagem que o isolamento social por 10 h, além de aumentar o relato de desejo por interações sociais, provocou um aumento da atividade da região onde se localiza a VTA e a substância nigra (SN), resultado semelhante ao observado em indivíduos mantidos em jejum, o que aumenta o desejo por alimento. Portanto, a privação social causa um desejo por interações sociais, e ativa áreas envolvidas no processamento da recompensa de maneira similar ao que ocorre em uma situação de privação de alimento (TOMOVA et al., 2020). Além disso, estudos de imagem em humanos também mostraram que a interação social e estímulos sociais positivos, como por exemplo, um *feedback* positivo sobre si mesmo, ativa o estriado ventral, região onde se localiza o NAcc (RADEMACHER et al., 2017). Assim podemos propor que a privação social de camundongos machos adultos afete o funcionamento da via mesolímbica, aumentando a atividade dopaminérgica no NAcc.

Além do seu papel do estado de alerta, promoção da interação social e processamento da recompensa, a DA tem uma influência significativa na modulação da resposta à luz do sistema circadiano. Grippo et al. (2017) demonstraram que a DA que chega no SCN de camundongos é proveniente de projeções dopaminérgicas vindas da VTA, e investigaram o papel do receptor D1 no SCN sobre o arrastamento fótico do sistema circadiano. Foi demonstrado que o receptor D1 no SCN é importante para o arrastamento frente ao avanço ou atraso de fase de 6h do ciclo claro e escuro, conhecido como protocolo que mimetiza uma situação de *jetlag*. Camundongos nocautes para receptor D1 apresentam uma taxa de arrastamento mais lenta, ao passo que a restauração viral deste receptor no SCN reestabelece o arrastamento ao protocolo de *jetlag*. Além disso, a estimulação quimiogénica da VTA acelera a taxa de arrastamento ao protocolo de *jetlag* em relação ao controle (GRIPPO et al., 2017).

Dados prévios do nosso grupo já demonstraram que o isolamento social parece provocar uma aceleração sutil no arrastamento frente a um protocolo de *jetlag* (dados não publicados). Camundongos SH submetidos a 7 dias de avanço de fase de 6h seguido de 7 dias de atraso de fase de 6h do ciclo claro e escuro de 12:12h, apresentaram uma aceleração no arrastamento no segundo dia de avanço e atraso de fase, no entanto, a partir do terceiro dia nas duas condições de iluminação, o arrastamento foi semelhante a de animais GH (dados não publicados). Portanto, frente a estes resultados e aos apresentados no presente trabalho mostrando um aumento da atividade dopaminérgica no SCN no ZT2 em camundongos SH, propomos que, possivelmente o isolamento social afete a sinalização dopaminérgica no SCN via receptor D1, e que tal influência depende da presença de luz. Para confirmar esta hipótese, são necessários experimentos conduzidos em escuro constante.

Outro dado da literatura que contribui para corroborar esta hipótese é de que a incubação de fatias de SCN com agonista de receptor D1 reduz a taxa de disparo dos neurônios tanto na fase de claro quanto na fase de escuro (GRIPPO et al., 2020). Sabe-se que a porção d-SCN recebe projeções dopaminérgicas (ABRAHAMSON; MOORE, 2001), e vimos através da c-Fos-ir que o isolamento social reduz o número de neurônios AVP que expressam c-Fos no SCN no início da fase de claro. Com esta abordagem, não é possível analisar a excitabilidade destes neurônios, apenas quantificar o número de neurônios ativados naquele momento. No entanto, podemos aventar que, ao menos no ZT2, a atividade dopaminérgica aumentada em camundongos SH pode contribuir para a redução

no número de neurônios vasopressinérgicos em atividade no SCN, possivelmente envolvendo a ativação do receptor D1.

O papel da DA na transmissão do estímulo não-fótico ainda não está bem estabelecido. No entanto, uma vez que a DA está diretamente envolvida com o estado de alerta, comportamento social, arrastamento fótico e atividade dos neurônios do SCN; somados aos resultados expostos no presente trabalho, propomos que a pista social também possa utilizar o recrutamento da VTA, região de onde partem as principais projeções dopaminérgicas envolvidas nos processos descritos acima, para contribuir na arrastamento do SCN ao ciclo claro e escuro de 12:12h.

## 8. CONCLUSÃO

A Figura 17 ilustra os principais achados do presente trabalho, a saber o prejuízo na responsividade à luz causada pelo isolamento social nos neurônios vasopressinérgicos do SCN no ZT2, possivelmente afeta a atividade das suas regiões eferentes que têm relação com o estado de alerta, comportamento social e resposta ao estresse, tais como os neurônios vasopressinérgicos do PVN e noradrenérgicos do LC, mas não envolve o recrutamento da POA. Além disso, tal prejuízo na responsividade à luz dos neurônios vasopressinérgicos do SCN no início da fase de claro, possivelmente é uma consequência do efeito isolamento social em aumentar a atividade serotoninérgica e/ou dopaminérgica no SCN no ZT2.

Por fim, a perda da interação social aumenta a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no ZT2 no SCN, e ZT14 no NAcc, região envolvida no processamento da recompensa.

Em conjunto, estes dados permitem concluir que o estabelecimento e a manutenção de vínculos sociais se faz importante não apenas para a manutenção da saúde, qualidade de vida e sobrevivência, mas também para sustentar o funcionamento adequado do sistema circadiano.



## 9. REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, E. E.; MOORE, R. Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. **Brain Research**, v. 916, n. 1–2, p. 172–191, 19 out. 2001.
- AGUILERA, G.; RABADAN-DIEHL, C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. **Regulatory Peptides**, v. 96, n. 1–2, p. 23–29, 22 dez. 2000.
- ANGELES-CASTELLANOS, M. et al. The suprachiasmatic nucleus participates in food entrainment: a lesion study. **Neuroscience**, v. 165, n. 4, p. 1115–1126, 17 fev. 2010.
- AQUINO, N. S. S. et al.  $\alpha$ -Estrogen and Progesterone Receptors Modulate Kisspeptin Effects on Prolactin: Role in Estradiol-Induced Prolactin Surge in Female Rats. **Endocrinology**, v. 158, n. 6, p. 1812–1826, 1 jun. 2017.
- ASTON-JONES, G. et al. A neural circuit for circadian regulation of arousal. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 7, p. 732–738, jul. 2001.
- ASTON-JONES, G.; BLOOM, F. E. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. **Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 8, p. 876–886, 1 ago. 1981.
- ATON, S. J. et al. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 476–483, abr. 2005.
- BACHNER-MELMAN, R.; EBSTEIN, R. P. The role of oxytocin and vasopressin in emotional and social behaviors. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 124, p. 53–68, 2014.
- BAIK, J.-H. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013.
- BANG, S. J. et al. Projections and interconnections of genetically defined serotonin neurons in mice. **The European Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 85–96, jan. 2012.
- BERRIDGE, C. W.; SCHMEICHEL, B. E.; ESPAÑA, R. A. Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. **Sleep Medicine Reviews**, v. 16, n. 2, p. 187–197, abr. 2012.
- BERRY, A. et al. Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 6, p. 762–772, jun. 2012.
- BLOCH, G. et al. Socially synchronized circadian oscillators. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 280, n. 1765, p. 20130035, 22 ago. 2013.
- BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p. 199–205, 2 mar. 2009.

- BROWN, S. A. et al. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. **Current biology: CB**, v. 12, n. 18, p. 1574–1583, 17 set. 2002.
- CAMBRAS, T. et al. Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7634–7639, 1 maio 2007.
- CAMBRAS, T.; CASTEJÓN, L.; DÍEZ-NOGUERA, A. Social interaction and sex differences influence rat temperature circadian rhythm under LD cycles and constant light. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 3–4, p. 365–371, 1 jun. 2011.
- CAMBRAS, T.; CASTEJÓN, L.; DÍEZ-NOGUERA, A. Social interaction with a rhythmic rat enhances the circadian pattern of the motor activity and temperature of LL-induced arrhythmic rats. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 3, p. 835–840, 1 fev. 2012.
- CARTER, M. E. et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1526–1533, dez. 2010.
- CELLINI, N. et al. Changes in sleep pattern, sense of time and digital media use during COVID-19 lockdown in Italy. **Journal of Sleep Research**, v. 29, n. 4, p. e13074, ago. 2020.
- CHALLET, E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5648–5655, dez. 2007.
- CHENG, M. Y. et al. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 405–410, 23 maio 2002.
- COLWELL, C. S.; FOSTER, R. G. Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 324, n. 2, p. 135–142, 8 out. 1992.
- COUDEREAU, J. P. et al. Effect of social isolation on the metabolism of morphine and its passage through the blood-brain barrier and on consumption of sucrose solutions. **Psychopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 198–204, jun. 1999.
- COX, K. H.; TAKAHASHI, J. S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 63, n. 4, p. R93–R102, nov. 2019.
- CUESTA, M. et al. New light on the serotonergic paradox in the rat circadian system. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 1, p. 231–243, jul. 2009.
- DAAN, S.; PITTENDRIGH, C. S. A Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. **Journal of comparative physiology**, v. 106, n. 3, p. 253–266, 1 out. 1976.
- DAMIOLA, F. et al. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p. 2950–2961, 1 dez. 2000.
- DE LA IGLESIA, H. O. et al. Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. **Current biology: CB**, v. 14, n. 9, p. 796–800, 4 maio 2004.

- DO, M. T. H. Melanopsin and the Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: Biophysics to Behavior. **Neuron**, v. 104, n. 2, p. 205–226, 23 out. 2019.
- DÖLEN, G. et al. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. **Nature**, v. 501, n. 7466, p. 179–184, set. 2013.
- DOMÈNECH-ABELLA, J. et al. Loneliness and depression in the elderly: the role of social network. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 52, n. 4, p. 381–390, abr. 2017.
- DUY, P. Q. et al. Light Has Diverse Spatiotemporal Molecular Changes in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. **Journal of Biological Rhythms**, v. 35, n. 6, p. 576–587, dez. 2020.
- DZIEMA, H. et al. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1617–1627, 2003.
- EASTON, A. et al. The Suprachiasmatic Nucleus Regulates Sleep Timing and Amount in Mice. **Sleep**, v. 27, n. 7, p. 1307–1318, 1 out. 2004.
- EBAN-ROTHSCHILD, A. et al. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep–wake behaviors. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 1356–1366, out. 2016.
- FABRICIUS, K. et al. Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. **Neuroscience Letters**, v. 482, n. 2, p. 117–122, 27 set. 2010.
- FAVREAU, A. et al. Social influences on circadian behavioural rhythms in vertebrates. **Animal Behaviour**, v. 77, n. 5, p. 983–989, 2009.
- FERNANDES, P. et al. Social interaction masking contributes to changes in the activity of the suprachiasmatic nucleus and impacts on circadian rhythms. **Physiology & Behavior**, v. 237, p. 113420, 1 ago. 2021.
- FERRIS, M. J. et al. Dopamine transporters govern diurnal variation in extracellular dopamine tone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 26, p. E2751–2759, 1 jul. 2014.
- GE, L. et al. Social isolation, loneliness and their relationships with depressive symptoms: A population-based study. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0182145, 2017.
- GINTY, D. D. et al. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 238–241, 9 abr. 1993.
- GLASS, J. D. et al. Tryptophan loading modulates light-induced responses in the mammalian circadian system. **Journal of Biological Rhythms**, v. 10, n. 1, p. 80–90, mar. 1995.
- GLASS, J. D.; DINARDO, L. A.; EHLEN, J. C. Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin release and circadian phase-resetting. **Brain Research**, v. 859, n. 2, p. 224–232, 24 mar. 2000.

GLASS, J. D.; SELIM, M.; REA, M. A. Modulation of light-induced C-Fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists. **Brain Research**, v. 638, n. 1–2, p. 235–242, 28 fev. 1994.

GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of circadian entrainment. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1063–1102, jul. 2010.

GOMEZ, F. et al. Arginine vasopressin (AVP) depletion in neurons of the suprachiasmatic nuclei affects the AVP content of the paraventricular neurons and stimulates adrenocorticotrophic hormone release. **Journal of Neuroscience Research**, v. 50, n. 4, p. 565–574, 15 nov. 1997.

GONZÁLEZ, M. M. C.; ASTON-JONES, G. Circadian regulation of arousal: role of the noradrenergic locus coeruleus system and light exposure. **Sleep**, v. 29, n. 10, p. 1327–1336, out. 2006.

GRECO, A. M. et al. Circadian rhythms of hypothalamic norepinephrine and of some circulating substances in individually housed adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 52, n. 6, p. 1167–1172, dez. 1992.

GREEN, D. J.; GILLETTE, R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. **Brain Research**, v. 245, n. 1, p. 198–200, 5 ago. 1982.

GRIPPO, R. M. et al. Direct Midbrain Dopamine Input to the Suprachiasmatic Nucleus Accelerates Circadian Entrainment. **Current biology: CB**, v. 27, n. 16, p. 2465–2475.e3, 21 ago. 2017.

GRIPPO, R. M. et al. Dopamine Signaling in the Suprachiasmatic Nucleus Enables Weight Gain Associated with Hedonic Feeding. **Current biology: CB**, v. 30, n. 2, p. 196–208.e8, 20 2020.

GRIPPO, R. M.; GÜLER, A. D. Dopamine Signaling in Circadian Photoentrainment: Consequences of Desynchrony. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 2, p. 271–281, 2019.

GROOS, G.; HENDRIKS, J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 34, n. 3, p. 283–288, 31 dez. 1982.

GUNAYDIN, L. A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1535–1551, 19 jun. 2014.

GUZMÁN-RUIZ, M. A. et al. Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 46, p. 15419–15429, 18 nov. 2015.

HALL, F. S. et al. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 59, n. 4, p. 859–872, abr. 1998.

HARMAR, A. J. et al. The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. **Cell**, v. 109, n. 4, p. 497–508, 17 maio 2002.

- HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 453–469, ago. 2018.
- HERZOG, E. D. et al. Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 1, p. a027706, 1 jan. 2017.
- HONG, S. et al. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 2, p. 269–275, 18 jan. 2012.
- HONRADO, G. I.; MROSOVSKY, N. Interaction between periodic socio-sexual cues and light-dark cycles in controlling the phasing of activity rhythms in golden hamsters. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 221–231, 1 jul. 1991.
- HUANG, H.-J. et al. Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice. **Brain Research**, v. 1371, p. 150–160, 31 jan. 2011.
- HUGHES, A. T. et al. Aberrant gating of photic input to the suprachiasmatic circadian pacemaker of mice lacking the VPAC2 receptor. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 14, p. 3522–3526, 7 abr. 2004.
- HUNG, L. W. et al. Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1406–1411, 29 set. 2017.
- IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 6212983, 2016.
- KALSBECK, A. et al. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. **Brain Research**, v. 682, n. 1, p. 75–82, 5 jun. 1995.
- KALSBECK, A.; FLIERS, E. Daily regulation of hormone profiles. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 217, p. 185–226, 2013.
- KARKHANIS, A. N. et al. Early-Life Social Isolation Stress Increases Kappa Opioid Receptor Responsiveness and Downregulates the Dopamine System. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2263–2274, ago. 2016.
- KECKLUND, G.; AXELSSON, J. Health consequences of shift work and insufficient sleep. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 355, p. i5210, 1 nov. 2016.
- KORF, H.-W.; VON GALL, C. Circadian Physiology. In: PFAFF, D. W.; VOLKOW, N. D. (Eds.). **Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical**. New York, NY: Springer, 2016. p. 2203–2239.
- KOVÁCS, K. J. CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, The tale of a person and a peptide: Wylie W. Vale Jr. and the role of corticotropin-releasing factor in the stress response. v. 54, p. 25–33, 1 dez. 2013.

- KRACH, S. et al. The rewarding nature of social interactions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, p. 22, 2010.
- LEE, C. R.; CHEN, A.; TYE, K. M. The neural circuitry of social homeostasis: Consequences of acute versus chronic social isolation. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1500–1516, 18 mar. 2021.
- LEONE, M. J.; SIGMAN, M.; GOLOMBEK, D. A. Effects of lockdown on human sleep and chronotype during the COVID-19 pandemic. **Current biology: CB**, v. 30, n. 16, p. R930–R931, 17 2020.
- LI, J.-D. et al. Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 45, p. 11615–11623, 8 nov. 2006.
- LIU, Y. et al. Glutamatergic Neurons of the Paraventricular Nucleus are Critical for the Control of Wakefulness. **Neuroscience**, v. 446, p. 137–144, 15 2020.
- LIU, A. C.; LEWIS, W. G.; KAY, S. A. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. **Nature**, v. 3, n. 10, p. 630-639, out. 2007.
- LOHER, W. Circadian control of stridulation in the cricket *Teleogryllus commodus* Walker. **Journal of comparative physiology**, 2004.
- LOPEZ, M. F.; DOREMUS-FITZWATER, T. L.; BECKER, H. C. Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice. **Alcohol**, v. 45, n. 4, p. 355–364, 1 jun. 2011.
- LOPEZ, M. F.; LABER, K. Impact of social isolation and enriched environment during adolescence on voluntary ethanol intake and anxiety in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 148, p. 151–156, 1 set. 2015.
- LUO, Y.-J. et al. Nucleus accumbens controls wakefulness by a subpopulation of neurons expressing dopamine D1 receptors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1576, 20 2018.
- MAJUMDAR, P.; BISWAS, A.; SAHU, S. COVID-19 pandemic and lockdown: cause of sleep disruption, depression, somatic pain, and increased screen exposure of office workers and students of India. **Chronobiology International**, v. 37, n. 8, p. 1191–1200, ago. 2020.
- MARKWELL, E. L.; FEIGL, B.; ZELE, A. J. Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. **Clinical & Experimental Optometry**, v. 93, n. 3, p. 137–149, maio 2010.
- MARQUES, M. D.; WATERHOUSE, J. M. Masking and the evolution of circadian rhythmicity. **Chronobiology International**, v. 11, n. 3, p. 146–155, jun. 1994.
- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. S. Cronobiologia: princípios e aplicações. **Cronobiologia: princípios e aplicações**, p. 321–321, 1997.
- MELO, P. et al. Socially adjusted synchrony in the activity profiles of common marmosets in light-dark conditions. **Chronobiology International**, v. 30, n. 6, p. 818–827, jul. 2013.

- MEYER-BERNSTEIN, E. L.; MORIN, L. P. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 267–279, 1999.
- MIEDA, M. et al. Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. **Neuron**, v. 85, n. 5, p. 1103–1116, 4 mar. 2015.
- MISTLBERGER, R. E. et al. Behavioral and Serotonergic Regulation of Circadian Rhythms. **Biological Rhythm Research**, v. 31, n. 3, p. 240–283, 1 jul. 2000.
- MISTLBERGER, R. E.; ANTLE, M. C. Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food. **Essays in Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 119–136, 30 jun. 2011.
- MISTLBERGER, R. E.; SKENE, D. J. Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 79, n. 3, p. 533–556, ago. 2004.
- MITSUYA, H. et al. The co-occurrence of zinc deficiency and social isolation has the opposite effects on mood compared with either condition alone due to changes in the central norepinephrine system. **Behavioural Brain Research**, v. 284, p. 125–130, 1 maio 2015.
- MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, p. 445–462, 2012.
- MOORE, R. Y.; LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 146, n. 1, p. 1–14, set. 1972.
- MORAN-RAMOS, S. et al. When to eat? The influence of circadian rhythms on metabolic health: are animal studies providing the evidence? **Nutrition Research Reviews**, v. 29, n. 2, p. 180–193, dez. 2016.
- MROSOVSKY, N. Phase response curves for social entrainment. **Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 162, n. 1, p. 35–46, jan. 1988.
- MROSOVSKY, N. Masking: history, definitions, and measurement. **Chronobiology International**, v. 16, n. 4, p. 415–429, jul. 1999.
- MUZERELLE, A. et al. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. **Brain Structure & Function**, v. 221, n. 1, p. 535–561, jan. 2016.
- NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 18–25, 20 dez. 2000.
- ONO, D. et al. The mammalian circadian pacemaker regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Science Advances**, v. 6, n. 45, nov. 2020.
- PANDA, S. et al. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5632, p. 525–527, 25 jul. 2003.

PAULUS, E. V.; MINTZ, E. M. Photic and nonphotic responses of the circadian clock in serotonin-deficient Pet-1 knockout mice. **Chronobiology International**, v. 30, n. 10, p. 1251–1260, dez. 2013.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l.] Academic Press, 2001.

PERELLÓ, M. et al. Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 16, p. 1857–1862, 13 mar. 2006.

PIGGINS, H. D.; GUILDING, C. The neural circadian system of mammals. **Essays in Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 1–17, 30 jun. 2011.

POLETINI, M. O. et al. Knockdown of clock genes in the suprachiasmatic nucleus blocks prolactin surges and alters FRA expression in the locus coeruleus of female rats. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 5, p. E1325-1334, nov. 2007.

PYNER, S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 38, n. 3, p. 197–208, nov. 2009.

RABELO, P. C. R. et al. Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. **Brain Research Bulletin**, v. 112, p. 7–13, mar. 2015.

RADEMACHER, L. et al. Reward: From Basic Reinforcers to Anticipation of Social Cues. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 30, p. 207–221, 2017.

RANSONE, L. J. et al. Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. **Genes & Development**, v. 3, n. 6, p. 770–781, jun. 1989.

REFINETTI, R. The circadian rhythm of body temperature. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, v. 15, p. 564–594, 1 jan. 2010.

REGAL, P. J.; CONNOLLY, M. S. Social Influences on Biological Rhythms. **Behaviour**, v. 72, n. 3/4, p. 171–199, 1980.

REID, K. J.; ABBOTT, S. M. Jet Lag and Shift Work Disorder. **Sleep Medicine Clinics**, v. 10, n. 4, p. 523–535, dez. 2015.

REN, P. et al. Prokineticin 2 regulates the electrical activity of rat suprachiasmatic nuclei neurons. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20263, 2011.

RESENDEZ, S. L. et al. Social Stimuli Induce Activation of Oxytocin Neurons Within the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus to Promote Social Behavior in Male Mice. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 40, n. 11, p. 2282–2295, 11 2020.

RIGNEY, N. et al. Sex Differences in the Control of Social Investigation and Anxiety by Vasopressin Cells of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v. 111, n. 6, p. 521–535, 2021.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. Circadian clocks - the fall and rise of physiology. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 12, p. 965–971, dez. 2005.

S, Y. et al. **Rhythmic Properties of the Hamster Suprachiasmatic Nucleus in Vivo.**

Disponível em:

<[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9852606/?from\\_term=Yamazaki+et+al.%2C+1998+suprachiasmatic+nucleus&from\\_pos=1](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9852606/?from_term=Yamazaki+et+al.%2C+1998+suprachiasmatic+nucleus&from_pos=1)>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SAINI, C. et al. Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. **Genes & Development**, v. 26, n. 6, p. 567–580, 15 mar. 2012.

SARGIN, D.; OLIVER, D. K.; LAMBE, E. K. Chronic social isolation reduces 5-HT neuronal activity via upregulated SK3 calcium-activated potassium channels. **eLife**, v. 5, 22 2016.

SCHILLER, L. et al. Autoradiographic analyses of 5-HT1A and 5-HT2A receptors after social isolation in mice. **Brain Research**, v. 980, n. 2, p. 169–178, 8 ago. 2003.

SCHWARTZ, W. J. et al. Temporal regulation of light-induced Fos and Fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 58, n. 3, p. 573–583, fev. 1994.

SHELTON, J. et al. Selective pharmacological blockade of the 5-HT7 receptor attenuates light and 8-OH-DPAT induced phase shifts of mouse circadian wheel running activity. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 453, 2014.

SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, n. 4, p. 477–485, abr. 1990.

SONKER, P.; SINGARAVEL, M. Gender difference in circadian clock responses for social interaction with conspecific of the opposite-sex. **Chronobiology International**, v. 38, n. 2, p. 212–223, fev. 2021.

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 6, p. 1583–1586, jun. 1972.

STEPTOE, A. et al. Social isolation, loneliness, and all-cause mortality in older men and women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 15, p. 5797–5801, 9 abr. 2013.

SZAWKA, R. E. et al. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3247–3257, jul. 2010.

TAN, C. L.; KNIGHT, Z. A. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. **Neuron**, v. 98, n. 1, p. 31–48, 4 abr. 2018.

TANAKA, K.; OSAKO, Y.; YURI, K. Juvenile social experience regulates central neuropeptides relevant to emotional and social behaviors. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1036–1042, 14 abr. 2010.

- TODD, W. D. et al. Suprachiasmatic VIP neurons are required for normal circadian rhythmicity and comprised of molecularly distinct subpopulations. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4410, 2 set. 2020.
- TOMOVA, L. et al. Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 1597–1605, dez. 2020.
- TOTH, M. et al. The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 1, p. 120–129, 15 jul. 2012.
- VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 194–203, 7 abr. 2008.
- VITATERNA, M. H.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Overview of circadian rhythms. **Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 25, n. 2, p. 85–93, 2001.
- VOGELBAUM, M.; MENAKER, M. Temporal chimeras produced by hypothalamic transplants. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3619–3627, 1 set. 1992.
- WALSH, J. J. et al. 5-HT release in nucleus accumbens rescues social deficits in mouse autism model. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 589–594, ago. 2018.
- WESTENBROEK, C.; DEN BOER, J. A.; TER HORST, G. J. Gender-specific effects of social housing on chronic stress-induced limbic FOS expression. **Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 189–199, 26 set. 2003.
- YANG, Y. C. et al. Social relationships and physiological determinants of longevity across the human life span. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 3, p. 578–583, 19 jan. 2016.
- YORGASON, J. T. et al. Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 471–479, 1 fev. 2016.
- ZHANG, K. X. et al. Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. **Nature**, v. 585, n. 7825, p. 420–425, set. 2020.
- ZHANG, X. et al. Involvement of the dopamine system in the effect of chronic social isolation during adolescence on social behaviors in male C57 mice. **Brain Research**, v. 1765, p. 147497, 15 ago. 2021.