



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Beatriz Suzim Severino

**Efeitos do enriquecimento ambiental nos comportamentos emocionais e
cognitivos de ratos submetidos à estimulação osmótica**

Florianópolis

2026

Beatriz Suzim Severino

Efeitos do enriquecimento ambiental nos comportamentos emocionais e cognitivos
de ratos submetidos à estimulação osmótica

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

Orientador(a): Prof. Dr. Wagner Luis Reis

Florianópolis

2026

Severino, Beatriz Suzim

Efeitos do enriquecimento ambiental nos comportamentos emocionais e cognitivos de ratos submetidos à estimulação osmótica / Beatriz Suzim Severino ; orientador, Wagner Luis Reis, 2026.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. enriquecimento ambiental. I. Reis, Wagner Luis. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Beatriz Suzim Severino

Efeitos do enriquecimento ambiental nos comportamentos emocionais e cognitivos de ratos submetidos à estimulação osmótica

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

Florianópolis, 23 de junho de 2026.

Insira neste espaço
a assinatura

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Insira neste espaço
a assinatura

Prof. Wagner Luis Reis, Dr.

Orientador

Insira neste espaço
a assinatura

Profa. Manuella Pinto Kaster, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Insira neste espaço
a assinatura

Prof. Marcelo Farina, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2026.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Valdenir, por ser meu abraço quentinho nas horas difíceis, por ouvir meus desabafos e por celebrar cada boa nota como se fosse um prêmio mundial. Seu amor e cuidado tornaram tudo mais leve.

Ao meu pai, Jackson, pelo apoio silencioso e constante, por estar sempre pronto para ajudar no que fosse preciso e por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava. Ter você por perto foi meu porto seguro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wagner, que me acolheu com tanta paciência, dividiu comigo seu conhecimento e transformou minhas ideias confusas em um trabalho de verdade. Obrigada por guiar meus passos com tanto carinho e dedicação.

Aos meus amigos de sempre, guardiões da minha essência dentro e fora dos muros da universidade. Que souberam entender meus sumiços, respeitaram minha rotina maluca e nunca deixaram de torcer por mim e me puxar para descansar quando eu precisava. Ter vocês por perto foi a certeza de que eu nunca estive só.

Aos meus queridos colegas do Hormones and Behavior Integration Laboratory (HorBI Lab), por transformarem a rotina de experimentos, relatórios e prazos em momentos de muitas risadas e parceria. Obrigada pelos cafés compartilhados, pelo socorro nas bancadas, por comemorarem quando um protocolo chegava ao fim e, principalmente, por tornarem o "lab" um lugar mais acolhedor. Vocês são incríveis!

Aos meus colegas de graduação, por dividirem comigo os altos e baixos dessa jornada desde o primeiro dia, transformando as salas de aula e os corredores em um espaço de amizade e crescimento mútuo. Levo cada um de vocês no coração.

A todos que dividiram um sorriso, um conselho ou uma palavra de incentivo comigo ao longo desses anos, meu muito obrigada!

RESUMO

A privação hídrica é uma condição que impõe estresse osmótico ao organismo, resultando em diversas respostas significativas no sistema nervoso central, com destaque para a ativação de áreas do hipotálamo envolvidas na regulação dos parâmetros hidroeletrólíticos. A literatura relata múltiplos benefícios do enriquecimento ambiental (EA), cujos estímulos promovem alterações motivacionais positivas em animais experimentais. Além disso, o EA induz neuroplasticidade e neurogênese, mostrando ser eficaz frente a transtornos mentais. Dado o potencial impacto do estresse osmótico no desenvolvimento de comportamentos ansiosos e depressivos, este estudo investigou se o EA pode modular positivamente essas alterações comportamentais. Para isso, os animais foram alojados em caixas padrão ou em gaiolas de EA por 5 semanas e, posteriormente, submetidos a 24 ou 48 horas de privação hídrica.

A avaliação comportamental foi realizada pelo teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado, para observar parâmetros de locomoção e ansiedade, e reconhecimento de objetos, para avaliar memória e capacidade dos animais em distinguir estímulos familiares de estímulos novos. Os resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros comportamentais, indicando que a privação hídrica não promoveu alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade, exploração ou memória. Além disso, o EA pouco modificou as respostas comportamentais frente a PH ou em animais normohidratados. Concluindo que o protocolo de privação hídrica utilizado não foi capaz de induzir alterações comportamentais robustas, enquanto o enriquecimento ambiental não promoveu efeitos detectáveis sobre os desfechos comportamentais analisados. Esses achados contribuem para a compreensão das respostas adaptativas ao estresse osmótico e de sua interação com o enriquecimento ambiental.

Palavras-chave: enriquecimento ambiental, estresse osmótico, comportamentos cognitivos e emocionais.

ABSTRACT

Water deprivation is a condition that imposes osmotic stress on the organism, resulting in several significant responses within the central nervous system, particularly the activation of hypothalamic areas involved in the regulation of hydroelectrolytic balance. The literature reports multiple benefits of environmental enrichment (EE), whose stimuli promote positive motivational changes in experimental animals. In addition, EE induces neuroplasticity and neurogenesis and has been shown to be effective in different models of stress and neuropsychiatric disorders. Given the potential impact of osmotic stress on emotional and cognitive processes, this study investigated whether EE could positively modulate behavioral alterations induced by water deprivation. Furthermore, little is known about the effects of EE on water intake, representing a gap in the literature that this study sought to address. For this purpose, male Wistar rats were housed either in standard cages or in enriched environments for five weeks and subsequently subjected to 24 or 48 hours of water deprivation.

Behavioral assessment was performed using the open field test and the elevated plus maze to evaluate locomotor activity and anxiety-related parameters, as well as the novel object recognition test to assess memory and the animals' ability to discriminate between familiar and novel stimuli. The results did not reveal statistically significant differences in behavioral parameters, indicating that water deprivation did not induce alterations in anxiety-related behaviors, exploratory activity, or memory performance. In addition, EE produced minimal changes in behavioral responses either in water-deprived or normohydrated animals. These findings suggest that the water deprivation protocol employed was not sufficient to induce robust behavioral alterations, while environmental enrichment did not produce detectable effects on the behavioral outcomes analyzed. Overall, these results contribute to a better understanding of adaptive responses to osmotic stress and their interaction with environmental enrichment.

Keywords: environmental enrichment; osmotic stress; cognitive and emotional behaviors.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos gerais:.....	16
2.2 Objetivos específicos:.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Animais:.....	17
3.2. Alojamento:.....	17
3.3. Privação Hídrica:.....	18
3.4. Avaliação da Privação Hídrica:.....	18
3.5. Testes Comportamentais:.....	19
3.7. Eutanásia.....	22
3.8. Análise Estatística.....	22
3.9. Protocolo experimental:.....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Avaliação da privação hídrica.....	24
4.2. Campo Aberto.....	25
4.3. Labirinto em Cruz Elevado.....	28
4.4. Reconhecimento de Objetos.....	30
5. DISCUSSÃO.....	33
5.1. Avaliação da privação hídrica.....	33
5.2. Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.....	33
5.3. Reconhecimento de Objetos.....	36
6. CONCLUSÃO.....	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A manutenção da homeostase hídrica constitui um processo essencial para a sobrevivência dos organismos, uma vez que a água participa diretamente de praticamente todas as funções biológicas (Guyton; Hall, 2011). Alterações mesmo discretas no equilíbrio hidroeletrólítico podem comprometer a atividade celular, modificar a excitabilidade neuronal e desencadear respostas fisiológicas destinadas à restauração da estabilidade do meio interno (Antunes-Rodrigues et al., 2004). Entre os estímulos capazes de desafiar esse equilíbrio, a privação hídrica (PH) representa um dos mais potentes desencadeadores de estresse osmótico, induzindo alterações fisiológicas e comportamentais que se refletem em múltiplos sistemas de regulação interna (Smith et al., 2015). Em situações de baixa ingestão hídrica, osmorreceptores localizados no hipotálamo detectam o aumento da osmolaridade plasmática e acionam respostas imediatas, que incluem a ativação do eixo hipotálamo-neurohipofisário para liberação de vasopressina (AVP) e o estímulo da ingestão hídrica (Mecawi et al., 2015).

O estresse osmótico consiste em uma condição fisiológica caracterizada por alterações na osmolaridade dos líquidos corporais que impõem um desafio à manutenção da homeostase celular (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Bourque, 2008). Em mamíferos, a osmolaridade plasmática é mantida dentro de uma faixa bastante estreita, uma vez que pequenas variações na concentração de solutos são suficientes para promover o deslocamento de água através das membranas celulares por osmose, alterando o volume celular e comprometendo processos fisiológicos essenciais (Guyton; Hall, 2011; Mecawi et al., 2015). O aumento da osmolaridade do líquido extracelular, como ocorre em estados de desidratação, promove a saída de água das células, levando à retração celular e desencadeando mecanismos compensatórios destinados ao restabelecimento do equilíbrio hidroeletrólítico (Bourque, 2008; Mecawi et al., 2015). Em contrapartida, a redução da osmolaridade extracelular favorece o influxo de água para o meio intracelular, podendo resultar em edema celular e alterações da função tecidual (Guyton; Hall, 2011).

As alterações osmóticas são detectadas principalmente por neurônios osmossensíveis, os osmorreceptores, localizados nos órgãos circumventriculares do encéfalo, estruturas que apresentam capilares fenestrados e, conseqüentemente, maior acesso às alterações da composição do plasma (Bourque, 2008). Entre essas regiões destacam-se o órgão subfornical (SFO) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), que monitoram continuamente a osmolaridade plasmática e enviam informações para os núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo, centros responsáveis pela integração das respostas neuroendócrinas relacionadas ao controle da homeostase hidromineral (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Mecawi et al., 2015; McKinley et al., 2015). A ativação dessas vias permite o desencadeamento de respostas coordenadas destinadas à restauração do equilíbrio osmótico do organismo.

Entre as principais respostas fisiológicas induzidas pelo estresse osmótico, destacam-se a estimulação da sede, a secreção de arginina vasopressina (AVP) pelos neurônios magnocelulares do hipotálamo e a ativação do sistema renina-angiotensina (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Guyton et al., 2011; Mecawi et al., 2015). A vasopressina atua principalmente nos rins, promovendo aumento da reabsorção de água nos ductos coletores e contribuindo para a concentração da urina, enquanto a angiotensina II participa tanto da regulação da pressão arterial quanto da estimulação da ingestão de água, desempenhando papel fundamental na manutenção do volume e da osmolaridade dos líquidos corporais (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Gironacci et al., 2018). Essas respostas ocorrem de maneira integrada e representam mecanismos fisiológicos essenciais para a conservação da água corporal e para o restabelecimento da homeostase hidromineral.

Além da ativação da sede, a privação hídrica também estimula a liberação de AVP pelos neurônios magnocelulares do hipotálamo. A AVP, também conhecida como hormônio antidiurético (ADH), é fundamental para a conservação da água no organismo, atuando principalmente nos rins para aumentar a reabsorção de água e reduzir a produção de urina (Guyton et al., 2011). No entanto, a AVP não atua

apenas na regulação da homeostase hídrica. Evidências mostram que neurônios magnocelulares secretórios de AVP se projetam para áreas límbicas como hipocampo e amígdala, modulando comportamentos relacionados à ansiedade, agressividade e respostas motivacionais (Zhang et al., 2013; Hernández et al., 2015). Além da ativação da sede e da secreção de vasopressina, a hiperosmolaridade decorrente da privação hídrica promove a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), um importante sistema regulador do equilíbrio hidroeletrólítico e cardiovascular (Antunes-Rodrigues et al., 2004). Embora seja majoritariamente associado ao controle da pressão arterial e da homeostase hídrica, o SRA também exerce funções relevantes no sistema nervoso central, participando da modulação de respostas neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais (Gard, 2002; Antunes-Rodrigues et al., 2004).

A participação do SRA em processos emocionais e cognitivos tem sido demonstrada em diferentes modelos experimentais de estresse. Estudos indicam que a exposição prolongada a estímulos estressores pode promover alterações estruturais e funcionais em regiões límbicas, especialmente no hipocampo, incluindo prejuízos sinápticos, redução da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), remodelamento dendrítico e déficits em tarefas de memória espacial (Conrad, 2010; Ortiz; Conrad, 2018; Liu et al., 2019). Nesse contexto, níveis elevados de angiotensina II (ANG II), tanto na circulação periférica quanto em regiões hipotalâmicas, têm sido associados a modulação de comportamentos relacionados a ansiedade, depressão e prejuízo cognitivo (Saavedra; Benicky, 2007; Chung et al., 2019; Gironacci et al., 2018; Costa et al., 2020).

Considerando que a privação hídrica promove ativação simultânea dos sistemas vasopressinérgico e renina-angiotensina, ambos capazes de influenciar circuitos neurais envolvidos na regulação emocional e cognitiva, é relevante investigar se o estresse osmótico pode repercutir sobre parâmetros comportamentais além daqueles diretamente relacionados à busca por água e manutenção da homeostase hídrica.

Nesse cenário, o enriquecimento ambiental surge como uma estratégia experimental de interesse. Evidências recentes demonstram que animais expostos ao enriquecimento ambiental apresentam melhora do desempenho cognitivo, maior resistência aos efeitos do estresse e redução de alterações comportamentais associadas à ansiedade e à depressão (Nithianantharajah; Hannan, 2006; Baroncelli et al., 2010; Rojas-Carvajal et al., 2020). Adicionalmente, Costa et al. (2021) observaram redução da concentração hipotalâmica de ANG II em animais submetidos ao enriquecimento ambiental, acompanhada pela atenuação de comportamentos do tipo depressivo e pela preservação da memória. Entretanto, até o momento, não foram identificados estudos avaliando os efeitos do enriquecimento ambiental durante a privação hídrica. Dessa forma, permanece em aberto a possibilidade de que as adaptações induzidas pelo enriquecimento ambiental possam modular respostas comportamentais e fisiológicas associadas ao estresse osmótico, incluindo aspectos relacionados à ingestão de água e à manutenção da homeostase hídrica.

Assim, ganha destaque o papel do enriquecimento ambiental (EA) como modulador potencial contra respostas estressoras. O EA é caracterizado por modificações no ambiente que ampliam a complexidade sensorial, social e motora, promovendo estímulos contínuos que resultam em maior neuroplasticidade, neurogênese e alterações epigenéticas (Rojas-Carvajal et al., 2020; Zocher et al., 2021). A exposição a ambientes enriquecidos aumenta a expressão de BDNF e de outras proteínas neurotróficas. O BDNF é uma proteína que participa da sobrevivência neuronal, do fortalecimento sináptico e da consolidação da memória, sendo frequentemente associada aos benefícios cognitivos observados após exposição ao enriquecimento ambiental (Pham et al., 1999; Leger et al., 2014; Stephen et al., 2025). Outros estudos demonstram, por exemplo, que animais submetidos ao EA após acidente vascular cerebral apresentam recuperação funcional acelerada, efeito mediado pela plasticidade sináptica e pela ativação de genes relacionados à sobrevivência neuronal (Livingston-Thomas et al., 2016). Também há evidências de que o EA pode influenciar diretamente a atividade do SRA.

O impacto do enriquecimento ambiental não se limita à regulação do estresse ou à melhora de estados emocionais, mas também se estende à manutenção e ao aprimoramento da memória. Estudos recentes demonstraram que o EA, devido ao aumento da complexidade do ambiente, promove aumento dos níveis de BDNF e reorganização sináptica, o que significa reserva cognitiva aumentada e melhora da memória em modelos animais de envelhecimento (Stephen et al., 2025). Além disso, Lonetti et al. (2010) demonstraram que a introdução precoce do EA em camundongos mutantes para MeCP2 (modelo validado da síndrome de Rett, onde o desenvolvimento neurológico é afetado) foi capaz de restaurar déficits de memória espacial no labirinto aquático de Morris e normalizar padrões de ansiedade. Esses efeitos estiveram associados à elevação de níveis corticais de BDNF, evidenciando que a estimulação ambiental atua como potente modulador da plasticidade sináptica. A combinação desses achados sustenta a hipótese de que o EA exerce um forte papel neuroprotetor, garantindo não apenas a preservação da memória em condições fisiológicas, mas também a compensação dos déficits induzidos por estressores ou alterações genéticas.

Além disso, diversos estudos reforçam esse papel protetor do enriquecimento ambiental. Em modelos de estresse crônico imprevisível o enriquecimento foi associado a redução de comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão, além de prevenir déficits cognitivos observados em animais submetidos ao estresse prolongado (Dandi et al., 2023). De forma semelhante, Rojas-Carvajal et al. (2020) observaram que a exposição a ambientes enriquecidos foi capaz de modular respostas emocionais e comportamentais frente a desafios ambientais, enquanto Livingston-Thomas et al. (2016) demonstraram melhora funcional e cognitiva após lesões cerebrais experimentais. Em conjunto, esses achados sugerem que o enriquecimento ambiental atua como um importante fator promotor de resiliência neural e comportamental, justificando sua utilização em estudos que investigam os efeitos de diferentes tipos de estressores sobre o sistema nervoso central.

Entretanto, apesar da ampla literatura demonstrando os benefícios do enriquecimento ambiental em modelos de estresse emocional, social e inflamatório,

ainda são escassos os estudos que investigam especificamente seus efeitos diante de alterações provocadas pelo estresse osmótico. Essa lacuna torna-se particularmente relevante considerando que a privação hídrica desencadeia uma série de respostas neuroendócrinas capazes de influenciar diretamente estruturas cerebrais relacionadas à emoção e à memória. Assim, permanece pouco esclarecido se as adaptações neuroplásticas induzidas pelo enriquecimento ambiental são suficientes para atenuar as alterações comportamentais decorrentes da estimulação osmótica.

Assim, a avaliação comportamental constitui uma ferramenta fundamental para investigar os possíveis efeitos protetores do enriquecimento ambiental. Por meio de testes comportamentais validados, é possível analisar diferentes dimensões da resposta adaptativa dos animais, incluindo aspectos relacionados à atividade exploratória, ansiedade, aprendizagem e memória. A utilização de diversos testes experimentais permite uma compreensão mais abrangente dos efeitos provocados tanto pelo estresse osmótico quanto pelo enriquecimento ambiental.

Entre os testes mais empregados para esse objetivo, se destacam o campo aberto, o labirinto em cruz elevado e o reconhecimento de objetos. Em conjunto, esses testes permitem avaliar componentes distintos, porém complementares, do comportamento emocional e cognitivo. Enquanto os dois primeiros são amplamente utilizados para investigar padrões exploratórios e comportamentos relacionados à ansiedade (Kraeuter et al., 2019), o teste de reconhecimento de objetos fornece informações relevantes acerca da memória e da capacidade dos animais em distinguir estímulos familiares de estímulos novos (Ennaceur; Delacour, 1988; Antunes; Biala, 2012). Dessa forma, a aplicação combinada desses testes possibilita uma análise integrada dos efeitos do enriquecimento ambiental sobre diferentes aspectos do comportamento em animais submetidos ao estresse osmótico.

Assim, considerando a provável influência do estresse osmótico e o surgimento de comportamentos de ansiedade e depressão, a hipótese deste trabalho é de que o enriquecimento ambiental modula positivamente as alterações comportamentais induzidas pelo estresse osmótico. Além disso, não há registros na literatura dos

efeitos do EA sobre a ingestão hídrica, explorando uma lacuna existente na literatura de como o estresse osmótico poderia ser influenciado pelo enriquecimento ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

Investigar se o enriquecimento ambiental é capaz de modular comportamentos emocionais e cognitivos induzidos pelo estresse osmótico decorrente da privação hídrica em ratos.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos da privação hídrica sobre parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, exploração e memória;
- Determinar se o enriquecimento ambiental modifica as respostas emocionais induzidas pelo estresse osmótico;
- Determinar se o enriquecimento ambiental modifica o desempenho cognitivo de animais submetidos ao estresse osmótico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais:

Ratos Wistar machos, com 21 dias de vida (pós-desmame), acondicionados no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados sob ciclo claro/escuro de 12-12 horas (luzes acesas às 06:00 e apagadas às 18:00), com temperatura ambiente controlada em 22°C (variação de mais ou menos 2°C) e umidade dentro de 50 a 70%. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e à ração padrão durante todo o período anterior aos protocolos experimentais. Certificado de Aprovação na CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) N°: 1072240523 (Anexo A).

3.2. Alojamento:

3.2.1. Caixa padrão: Foram acomodados 4 animais em cada caixa padrão. Essas caixas coletivas têm sua composição de polipropileno, dimensões de 49 cm de comprimento, 34 cm de largura e 16 cm de altura, sendo forradas ao fundo com maravalha. A troca da maravalha, ração e água foi realizada 3 vezes por semana sempre no mesmo horário pela manhã.

3.2.2. Enriquecimento Ambiental: Cada gaiola para enriquecimento ambiental acomodou 4 animais e contou com a presença de 4 objetos, além de roda de corrida e do material de ninho. Considerando essa quantidade de objetos como um conjunto enriquecedor, foi preparado e disposto 3 conjuntos ou rotações para maximizar e tornar constante a característica de novidade desses artefatos, evitando repetições e impedindo adaptações. Dentre esses objetos, foram utilizadas bolas coloridas de borracha, pequenos sinos sonoros, tubos curtos e/ou curvados de plástico e mais algum objeto colorido de formato diferente. A gaiola conta com 3 pisos interligados por escadas de plástico ou balanço com cordas. Em um dos andares foi mantida uma casa de plástico de cores diferentes sendo alternadas com cestos de plástico adaptados para servir como um iglu. As dimensões da gaiola de enriquecimento utilizada são de 30 cm de comprimento, 40 cm de largura e 60 cm

de altura. O fundo foi forrado com maravalha, trocada 3 vezes por semana no mesmo horário pela manhã. Um desses dias de troca foi fixado para substituições e mudanças de posições dos objetos da gaiola de enriquecimento.

As condições experimentais aplicadas para o presente estudo foram embasadas em metodologias de pesquisas anteriores, os quais a execução do enriquecimento ambiental ocorreu com objetos e caixas mais simples em protocolos que exibiram resultados promissores como redução do comportamento do tipo ansioso e promoveu maior densidade sináptica no hipocampo ventral de ratos adultos que passaram por separação materna na fase neonatal (Doreste-Mendez et al., 2019). Dessa forma, foram utilizadas gaiolas já existentes no laboratório, de dimensões menores que o preconizado, e brinquedos/materiais cujo material é de plástico ou madeira e reaproveitáveis.

3.3. Privação Hídrica:

Este procedimento foi realizado com o intuito de induzir um estresse osmótico pela elevação da osmolaridade plasmática para ativação do mecanismo de ingestão hídrica (sede). Durante a 5ª semana de alojamento, um grupo de animais foi submetido ao protocolo de privação hídrica, com duração de 24 ou 48 horas, e outro grupo seguiu sendo normohidratado (ambos em caixa padrão e gaiola de enriquecimento). Os grupos foram, posteriormente, comparados entre si. Animais submetidos a privação de água permaneceram com livre acesso ao alimento durante todo o protocolo.

3.4. Avaliação da Privação Hídrica:

Para avaliar a hidratação dos animais submetidos às privações hídricas de 24h ou de 48h e dos animais normohidratados, foi realizada a medição do hematócrito, que determina a porcentagem de glóbulos vermelhos no volume total de sangue. Foi retirada uma amostra de sangue do tronco após a eutanásia ser realizada, com a coleta da amostra em um capilar, posteriormente centrifugada e medida através de micro-hematócrito.

3.5. Testes Comportamentais:

Os testes comportamentais foram realizados individualmente para todos os grupos experimentais em diferentes sets de conjunto de animais. Durante a realização de todos os testes comportamentais, a sala experimental permaneceu sob iluminação por luz vermelha, uma vez que roedores apresentam baixa sensibilidade aos comprimentos de onda dessa faixa do espectro luminoso. Essa condição minimiza a interferência da iluminação sobre o comportamento espontâneo dos animais, reduzindo o estresse decorrente da exposição à luz e permitindo adequada observação e registro das sessões experimentais (Himanshu et al., 2020). O primeiro protocolo utilizado foi o teste do campo aberto, seguido do teste do labirinto em cruz elevado e, por fim, o teste de reconhecimento de objetos.

3.5.1. Campo Aberto: Os movimentos de cada rato foram monitorados em uma arena quadrada (110 cm X 110 cm), fechada lateralmente por 4 paredes de 40 cm de altura e demarcada no chão com 16 quadrantes com tamanhos iguais (20 X 20 cm). Dos 16 quadrantes, 12 ficam em contato com as paredes da arena, sendo denominados de quadrantes laterais (ou de tigmotaxia), enquanto 4 quadrantes não estão em contato com as paredes do aparato, sendo então denominados de quadrantes centrais. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e os comportamentos foram gravados por 5 minutos. Após o tempo da gravação do teste, o animal foi devolvido para sua caixa e a arena higienizada com álcool 20%, evitando assim pistas com cheiro marcante para o próximo animal submetido ao teste. As variáveis analisadas no campo aberto foram: número de cruzamentos nos quadrantes, número de cruzamentos nos quadrantes periféricos, número de cruzamentos nos quadrantes centrais; tempo (%) nos quadrantes centrais da arena e tempo (%) nos quadrantes da periferia. Além disso, foi quantificado a frequência de autolimpeza (*grooming*) e de exploração vertical, aqui chamada de “levantamentos”, quando o animal se apoia somente nas patas traseiras e se eleva para explorar o ambiente.

3.5.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE): O teste avalia o comportamento do tipo ansioso dos roedores, no qual é fundamentada no princípio de que o rato

tende a explorar menos um lugar potencialmente perigoso (menos exploração em braços abertos do aparato). A estrutura do labirinto é composta por dois braços abertos de madeira, cuja largura e comprimento correspondem a 10 cm e 50 cm, respectivamente, e dois braços fechados, cuja largura e comprimento são iguais ao do braço aberto, com a diferença de possuir duas paredes pretas que cercam cada braço lateralmente, e possuem altura de 39 cm, que ficam dispostos em forma de cruz, numa altura de 50 cm em relação ao chão. Cada animal foi posicionado no centro da plataforma de frente para o braço aberto e o tempo de gravação de cada animal para exploração no aparato foi de 5 minutos. As variáveis comportamentais ficam divididas em espaço-temporais e etológicas. As variáveis espaço-temporais avaliadas são: tempo de permanência nos braços abertos e número total de entradas nos braços abertos e fechados. As entradas e saídas serão estabelecidas como o posicionamento das quatro patas do animal dentro ou fora do braço do aparelho. As variáveis etológicas avaliadas são: empinamentos (movimento vertical no qual o animal mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras), imersão de cabeça/comportamento de risco (movimento exploratório de cabeça/ombros sobre a borda lateral dos braços abertos em direção ao chão) e auto-limpeza/*grooming* (ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com a língua, dentes e/ou patas dianteiras).

3.5.3. Reconhecimento de Objetos: Conduzido em uma arena quadrada (110 cm X 110 cm), fechada lateralmente por 4 paredes de 40 cm de altura e demarcada no chão com 16 quadrantes com tamanhos iguais (20 X 20 cm), conforme protocolos previamente descritos e validados (Ennaceur e Delacour, 1988; Antunes & Biala, 2012; Leger et al., 2013). O procedimento foi realizado em três dias consecutivos, com sessões de habituação e exploração fixadas em 10 minutos cada. No dia 1 (pré-teste 1), os animais foram colocados individualmente na arena, sem a presença de objetos, para habituação ao ambiente. Este procedimento visa reduzir a ansiedade e garantir que a exploração subsequente seja direcionada aos estímulos experimentais (Bevins & Besheer, 2006; Dere, Huston & De Souza Silva, 2007). No pré-teste 2 (24 horas após o pré-teste 1), os animais foram novamente expostos à arena por 10 minutos, desta vez na presença de dois objetos idênticos. Os objetos

foram dispostos transversalmente entre si, com cerca de 5 cm de distância das paredes da arena, de modo a permitir livre exploração e evitar vieses espaciais (Broadbent et al., 2010; Akkerman et al., 2012). No dia 3 (teste, 24 horas após o pré-teste 2), um dos objetos familiares foi substituído por um objeto novo, diferente em forma e textura. Assim, os animais foram expostos simultaneamente a um objeto familiar e um objeto novo durante 10 minutos de exploração. Apenas o pré-teste 2 e o teste foram filmados para avaliação.

O teste de reconhecimento de objetos é amplamente utilizado para avaliar memória de reconhecimento em roedores, explorando a tendência natural desses animais de dedicar maior tempo à exploração de estímulos novos em comparação a estímulos previamente familiarizados (Ennaceur; Delacour, 1988; Antunes; Biala, 2012). Durante a familiarização, os animais são expostos a dois objetos idênticos, permitindo a aquisição da informação e a formação da memória referente aos estímulos apresentados. Após um intervalo de retenção, um dos objetos é substituído por um objeto novo, sendo então avaliada a capacidade do animal em discriminar o estímulo familiar do estímulo novo. Dessa forma, o aumento da exploração do objeto novo é interpretado como evidência de memória de reconhecimento preservada, enquanto a ausência dessa preferência pode indicar prejuízo nos processos de aquisição, retenção ou a lembrança da memória (Ennaceur; Delacour, 1988; Antunes; Biala, 2012). O desempenho nesse teste depende principalmente da integridade funcional do hipocampo e suas conexões com estruturas límbicas envolvidas na preservação das memórias (Antunes; Biala, 2012; Leger et al., 2013).

O desempenho foi avaliado por meio da latência para encontro do objeto 1 (pré teste 2) e para o objeto familiar (teste), tempo de exploração direcionado a cada objeto, considerando como exploração a aproximação do focinho a menos de 2 cm do objeto ou o contato direto com ele, excluindo comportamentos de escavação ou apoio. O índice de discriminação foi posteriormente calculado como indicador de memória de reconhecimento (Antunes & Biala, 2012; Leger et al., 2013). Ele é calculado pela fórmula: $ID = \frac{\text{Tempo com objeto novo} - \text{tempo com objeto familiar}}{\text{Tempo com objeto novo} + \text{tempo com objeto familiar}}$

tempo com objeto novo + tempo com objeto familiar. Esse resultado pode variar entre +1 e -1, em que um valor positivo indica maior tempo gasto explorando o objeto novo, um valor negativo indica maior tempo gasto explorando o objeto familiar, e um valor igual a zero indica ausência de preferência entre os objetos.

3.7. Eutanásia

Ao final dos períodos experimentais, os animais foram anestesiados antes do abate, e a eutanásia foi realizada por decapitação utilizando guilhotina. Para a anestesia, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de uma mistura de cetamina e xilazina (30 e 20 mg/Kg de peso corporal, respectivamente). O plano anestésico foi considerado adequado quando os reflexos de retirada da pata, da cauda e da pálpebra estavam ausentes.

3.8. Análise Estatística

O software utilizado foi o Graphpad Prism Software 8.0. Na análise estatística foram retirados os outliers de cada grupo e para isso a fórmula média $\pm$ 2 vezes o desvio padrão da média foi aplicada para cada conjunto de dados, e os valores fora dos limites máximos e mínimos do intervalo dado pela fórmula foram desconsiderados para análise. Para as análises, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA *Two-Way*), seguido de comparações múltiplas conforme indicado em cada figura, seguido do teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média nos gráficos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.9. Protocolo experimental:

3.9.1 Desenho experimental 1: Ratos foram mantidos em caixa padrão ou de EA por 5 semanas. Na última semana, 1 ou 2 dias antes do experimento, foram submetidos, ou não, ao protocolo de PH. Após esse período, foram feitos os testes comportamentais de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Ao final dos testes, os animais foram eutanasiados e sangue coletado para análise.

3.9.2 Desenho experimental 2: Ratos foram mantidos em caixa padrão ou de EA por 5 semanas. Na última semana, 1 ou 2 dias antes do experimento, foram submetidos, ou não, ao protocolo de PH. Após esse período, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, sendo composto por 3 dias de experimento (pré-teste 1, pré-teste 2 e teste). Ao final dos testes, os animais foram eutanasiados e sangue coletado para análise.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da privação hídrica

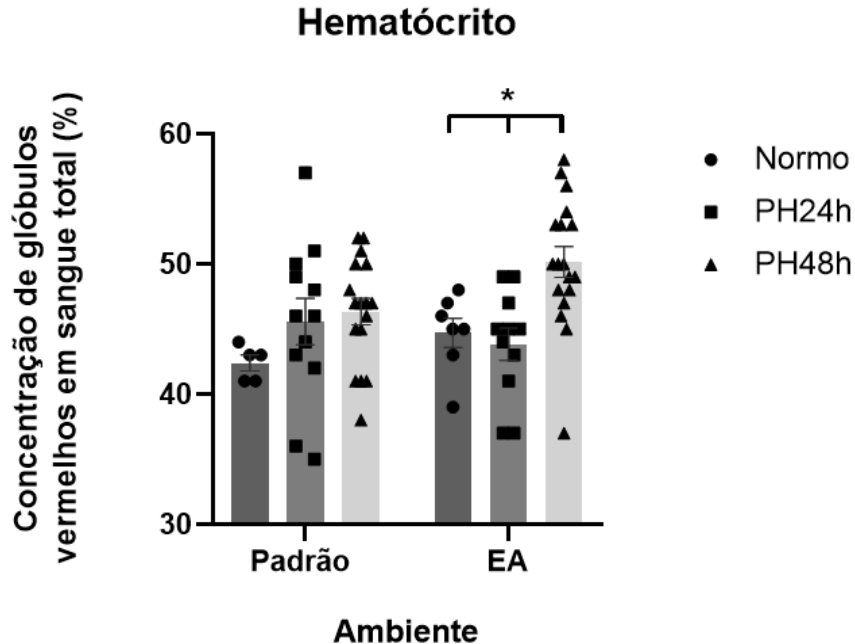
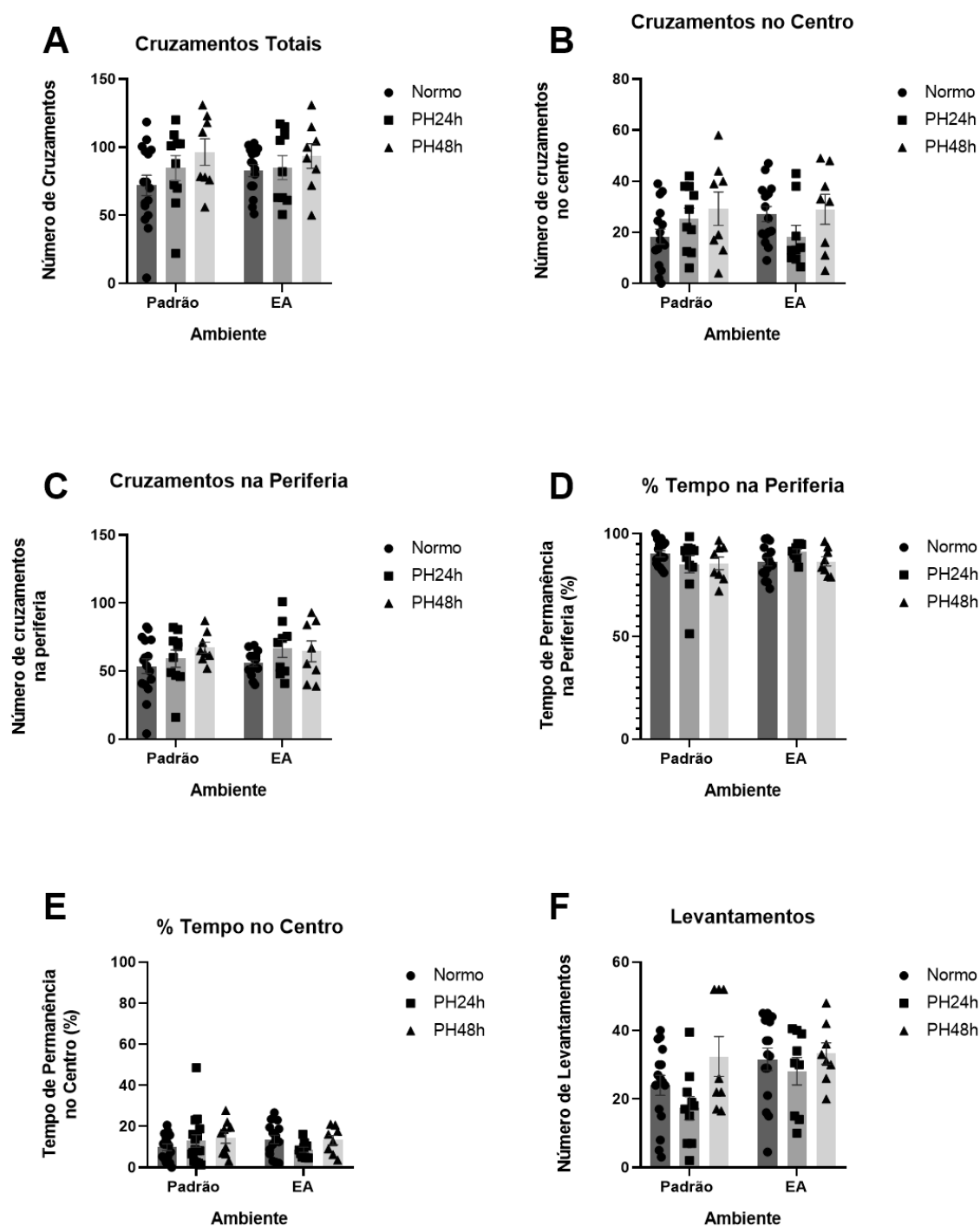


Figura 1: Avaliação da hidratação medida através do hematócrito em animais submetidos ou não (normohidratados) à privação hídrica de 24h e 48h (PH24h e PH48h, respectivamente). Os valores foram expressos por média $\pm$ EPM. O número de animais é representado pelas formas geométricas. Os dados foram submetidos à ANOVA *Two-Way* seguida do teste *post hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$.

Nos animais mantidos em ambiente enriquecido, o grupo submetido à privação hídrica de 48 horas apresentou valores médios de hematócrito superiores aos observados no grupo normohidratado e ao submetido à privação hídrica de 24 horas. Já nos animais alojados em ambiente padrão, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as condições experimentais. Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais de diferentes ambientes. Valor de F demonstrando a interação entre o tipo de ambiente foi $F(1, 64) = 1,429$, com $p = 0,2363$; Quanto ao fator em relação a hidratação foi $F(2, 64) = 6,658$, com $p = 0,0024$ ($p < 0,05$).

4.2. Campo Aberto



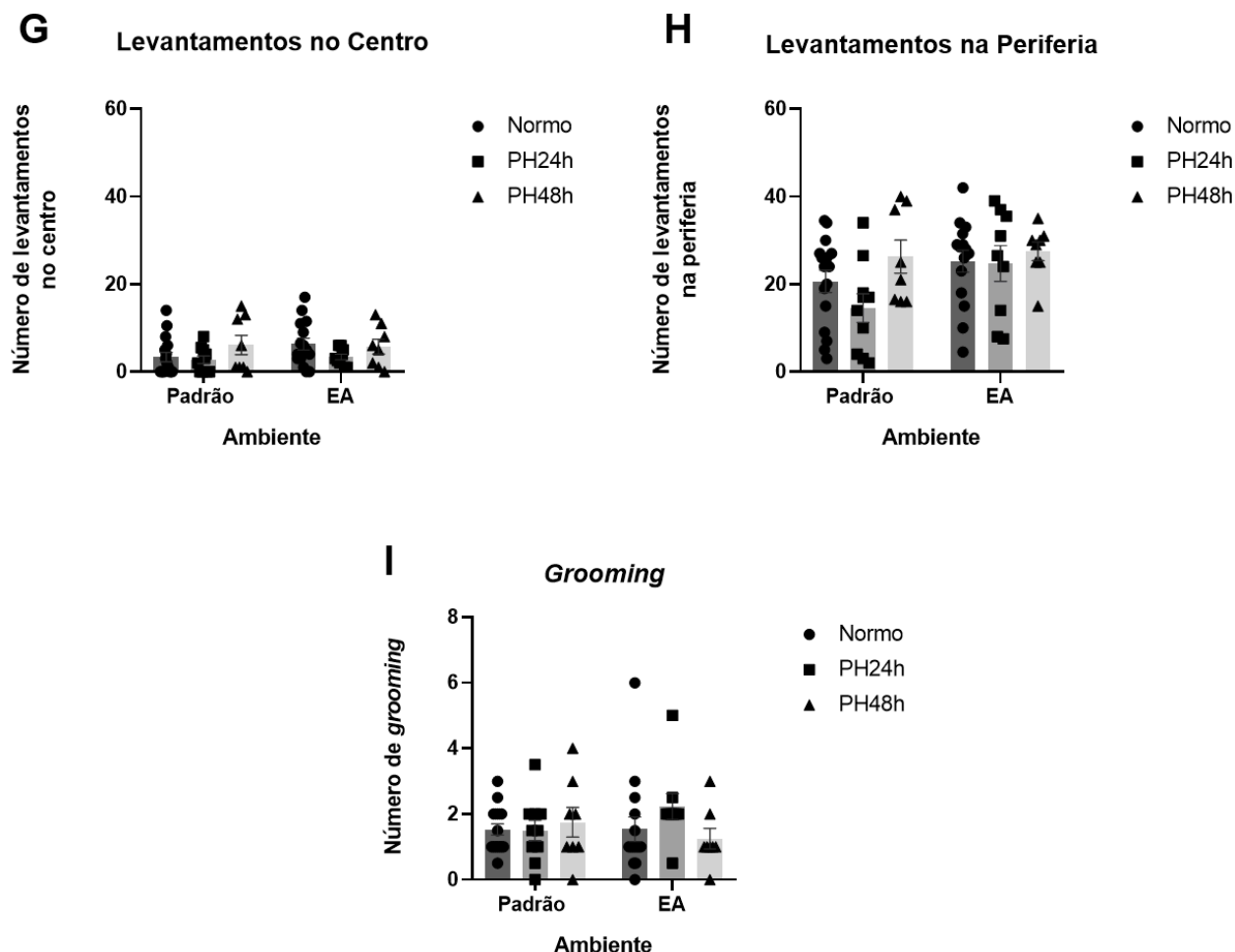


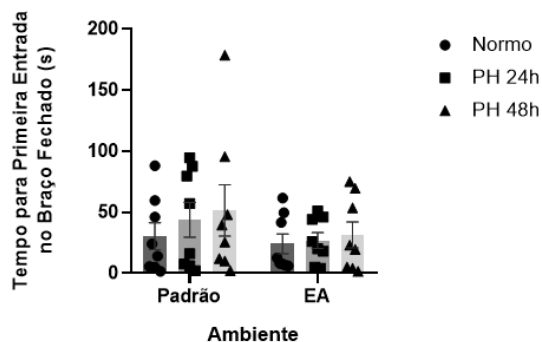
Figura 2: Análise teste do campo aberto. Número total de cruzamentos (A), cruzamentos no centro (B), cruzamentos na periferia (C), taxa de tempo na periferia (D), taxa de tempo no centro (E), número total de levantamentos (F), número de levantamentos no centro (G), número de levantamentos na periferia (H) e número de auto-limpeza (*grooming*) (I). As colunas indicam, respectivamente, animais normohidratados, animais submetidos à privação hídrica por 24h (PH24) ou 48h (PH48), alojados em caixas padrão ou de enriquecimento ambiental (EA). O número de animais é representado pelas formas geométricas. Os valores foram expressos por média $\pm$ EPM. Os dados foram submetidos à ANOVA Two-Way seguida do teste *post hoc* de Tukey.

A análise dos resultados obtidos demonstrou que a privação hídrica, independentemente da duração da exposição, não promoveu alterações estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados no campo aberto. Da mesma forma, a exposição ao enriquecimento ambiental não modificou

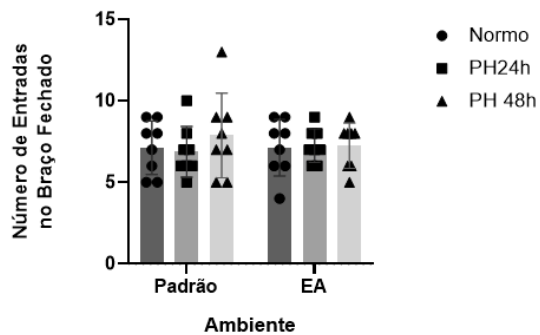
significativamente a atividade locomotora, a exploração vertical (levantamentos), o comportamento de autolimpeza (*grooming*) ou a ocupação das diferentes regiões do campo (cruzamentos).

4.3. Labirinto em Cruz Elevado

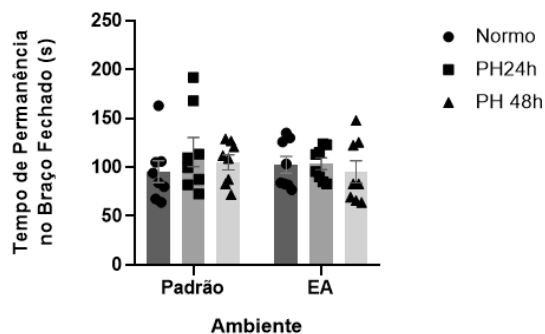
A Latência Entrada no Braço Fechado



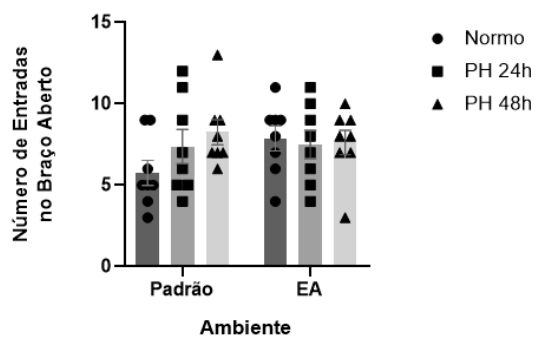
B Entradas Braço Fechado



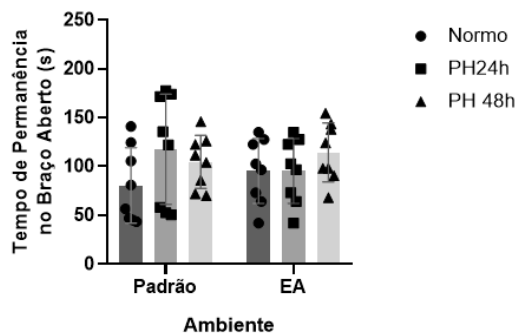
C Tempo Braço fechado



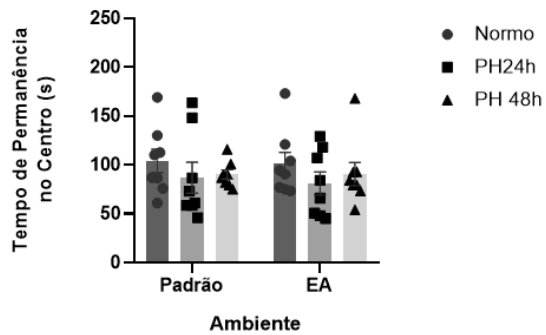
D Entradas Braço Aberto



E Tempo Braço Aberto



F Tempo centro



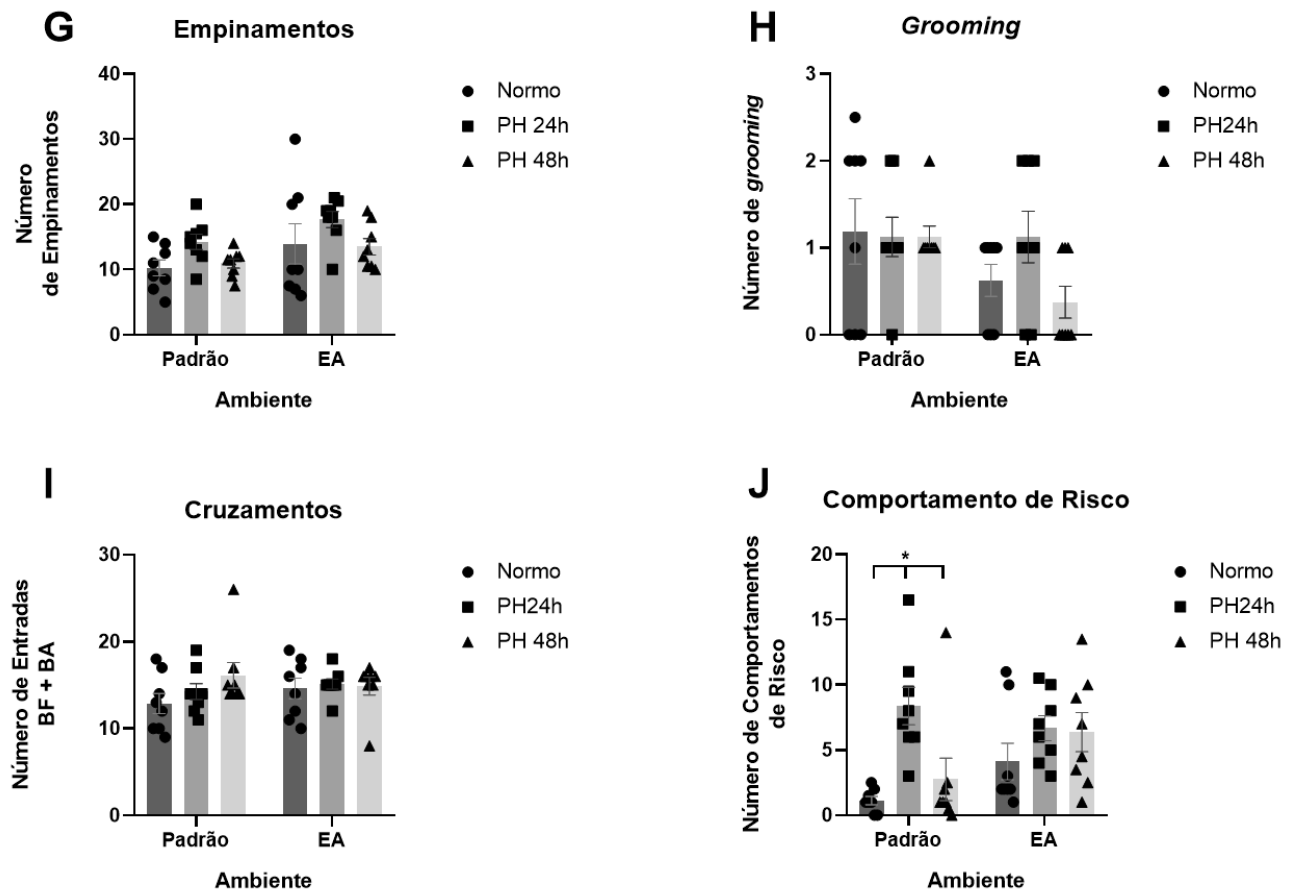
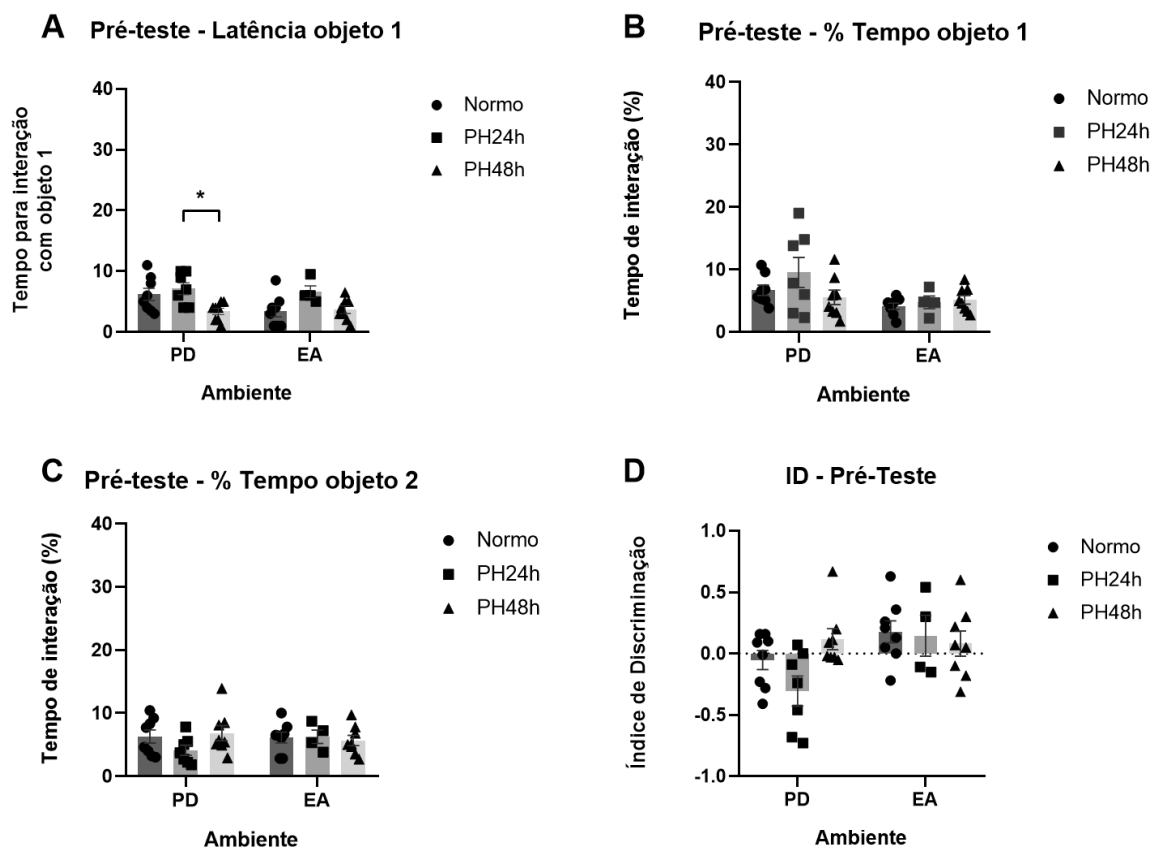


Figura 3: Análise do teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Latência para entrar no braço fechado (A), entradas no braço fechado (B), tempo no braço fechado (C), entradas no braço aberto (D), tempo no braço aberto (E), tempo no centro (F), empinamentos (G), número de auto-limpeza (*grooming*) (H), cruzamentos totais (I), comportamento de risco (J). As colunas indicam, respectivamente, animais normohidratados, animais submetidos à privação hídrica por 24h (PH24) ou 48h (PH48), alojados em caixas padrão ou de enriquecimento ambiental (EA). O número de animais é representado pelas formas geométricas. Os valores foram expressos por média $\pm$ EPM. Os dados foram submetidos à ANOVA Two-Way seguida do teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$.

Através da análise realizada, a estimulação osmótica induzida pela privação hídrica não promoveu alterações significativas nos parâmetros clássicos do LCE, incluindo latência para entrada nos braços fechados, número de entradas nos braços abertos e fechados, tempo de permanência nos braços abertos, tempo de permanência nos braços fechados e tempo de permanência no centro. De forma semelhante, a exposição ao enriquecimento ambiental também não resultou em

modificações expressivas nos parâmetros anteriormente citados. Ademais, houve diferença estatística no grupo padrão em relação às privações hídricas, em que a privação hídrica de 24 horas aumentou o comportamento de risco comparado aos grupos normohidratados e PH48h.

4.4. Reconhecimento de Objetos



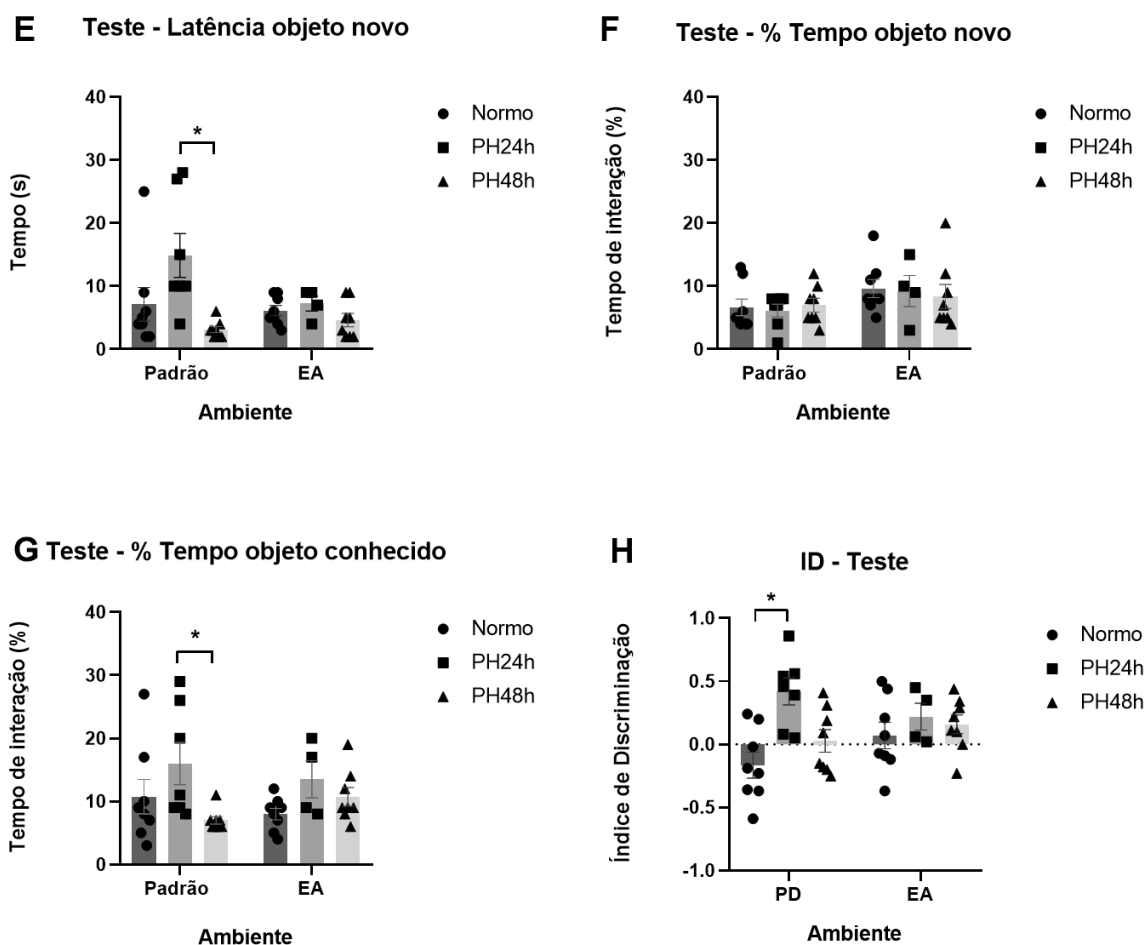


Figura 4: Análise do teste de reconhecimento de objetos. Pré-teste - Latência para interação com objeto 1 (A), taxa do tempo de interação com objeto 1 (B), taxa do tempo de interação com objeto 2 (C), índice de discriminação (ID) - pré-teste (D); Teste - Latência para interação com objeto novo (E), taxa do tempo de interação com objeto novo (F), taxa de tempo de interação com objeto conhecido (G), índice de discriminação (ID) - teste (H). As colunas indicam, respectivamente, animais normohidratados, animais submetidos à privação hídrica por 24h (PH24) ou 48h (PH48), alojados em caixas padrão ou de enriquecimento ambiental (EA). Os valores foram expressos por média $\pm$ EPM. Os dados foram submetidos à ANOVA Two-Way seguida do teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$

A análise dos parâmetros avaliados demonstrou alterações estatisticamente significativas nos grupos padrão com privação de 24 horas comparados aos com privação de 48 horas, nos gráficos A e G, em que o grupo PD-PH24h demonstrou maior tempo de interação com o objeto conhecido em relação ao PD-PH48h, mas também demoraram mais a ter o primeiro contato com objeto 1 (gráfico A - pré teste)

e com o objeto novo (gráfico E - teste). Também foi demonstrado uma diferença estatisticamente significativa na análise do índice de discriminação do teste (gráfico H), em que o grupo padrão normohidratado obteve um ID menor comparado ao grupo padrão com privação de 24 horas. Ademais, o enriquecimento ambiental não demonstrou diferenças estatisticamente significativas na latência para interação com o primeiro objeto, na porcentagem de tempo de interação com o objeto 1 ou com o objeto novo, na taxa de tempo de interação com o objeto familiar ou no índice de discriminação.

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da privação hídrica

Os resultados do hematócrito sugerem que o prolongamento da privação hídrica para 48 horas foi capaz de promover alterações no hematócrito dos animais submetidos ao enriquecimento ambiental. Considerando que o hematócrito corresponde à proporção do volume sanguíneo ocupada pelas hemácias, o aumento observado após 48 horas de privação hídrica é compatível com um processo de hemoconcentração decorrente da redução do volume plasmático, frequentemente associado a estados de desidratação (Guyton; Hall, 2011; Antunes-Rodrigues et al., 2004).

A ausência de diferenças significativas envolvendo os grupos mantidos em alojamento padrão sugere que essas alterações foram discretas e possivelmente influenciadas pela variabilidade biológica dos animais. De modo geral, os resultados indicam que a privação hídrica prolongada foi capaz de produzir efeitos fisiológicos detectáveis sobre o hematócrito, corroborando a efetividade do protocolo experimental em induzir um desafio osmótico, embora sem repercussões amplas sobre os outros parâmetros avaliados.

5.2. Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado

Os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado são amplamente utilizados para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores, além de fornecer informações complementares sobre exploração e reatividade emocional frente a ambientes potencialmente aversivos (Prut; Belzung, 2003; Kraeuter et al., 2019; Walf; Frye, 2007). No presente estudo, a ausência de diferenças significativas na maioria dos parâmetros avaliados em ambos os testes sugere que a privação hídrica, nas condições empregadas, não foi capaz de induzir alterações robustas nos comportamentos relacionados à ansiedade.

Embora a privação hídrica represente um importante desafio homeostático, capaz de promover intensa ativação de osmorreceptores centrais, aumento da

secreção de vasopressina e ativação do sistema renina-angiotensina, a mobilização desses sistemas não implica necessariamente no aparecimento de alterações emocionais detectáveis por testes comportamentais clássicos (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Mecawi et al., 2015). Roedores saudáveis apresentam elevada capacidade adaptativa frente a desafios fisiológicos moderados, recrutando mecanismos compensatórios que preservam funções essenciais mesmo diante da ativação de sistemas associados ao estresse (McEwen, 2017). Dessa forma, os resultados observados podem refletir a eficiência dos mecanismos homeostáticos ativados durante a privação hídrica na manutenção da estabilidade comportamental.

Krause et al. (2011) demonstraram que alterações no estado de hidratação são capazes de modificar respostas fisiológicas e comportamentais relacionadas ao estresse, embora esses efeitos nem sempre se manifestem de forma consistente em todos os parâmetros avaliados. De maneira semelhante, Felintro et al. (2023) observaram que as repercussões comportamentais da privação hídrica variam de acordo com o protocolo experimental empregado, o tempo de privação e o teste comportamental utilizado. Em conjunto, esses achados indicam que a privação hídrica não produz respostas comportamentais uniformes, sugerindo que a magnitude e a natureza dos seus efeitos dependem de múltiplos fatores experimentais.

Apesar da ausência de alterações nos parâmetros clássicos de ansiedade, o aumento do comportamento de risco observado no grupo submetido à privação hídrica de 24 horas sugere que o estresse osmótico pode ter influenciado aspectos mais sutis da avaliação emocional. O comportamento de risco é caracterizado pelo alongamento corporal em direção a um estímulo potencialmente aversivo, mantendo parte do corpo em uma região considerada segura, sendo interpretado como um comportamento de avaliação de risco associado ao conflito entre exploração e esquiva (Roy; Chapillon, 2004; Albrechet-Souza et al., 2007). Entretanto, como esse resultado não foi acompanhado por alterações consistentes nos demais parâmetros avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, sua interpretação deve

ser realizada com cautela, não sendo suficiente para caracterizar um estado ansioso generalizado.

Outro aspecto relevante é referente ao possível envolvimento de sistemas neuroendócrinos não avaliados diretamente neste estudo. Além da ativação dos sistemas vasopressinérgico e renina-angiotensina, a privação hídrica também é capaz de ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), promovendo aumento da secreção de glicocorticoides, especialmente corticosterona em roedores (Antunes-Rodrigues et al., 2004; Mecawi et al., 2015). Alterações sustentadas nesses hormônios têm sido associadas a mudanças em processos emocionais e cognitivos devido à sua ação sobre estruturas límbicas como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (Conrad, 2010; McEwen, 2017). Embora os resultados comportamentais não indiquem alterações expressivas decorrentes da privação hídrica, não se pode descartar a participação do eixo HPA nas adaptações fisiológicas induzidas pelo estresse osmótico, reforçando a necessidade de futuras investigações que incluam análises hormonais e neurobiológicas.

Em relação ao enriquecimento ambiental, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos relacionados à ansiedade. Embora diversos estudos demonstrem que ambientes enriquecidos promovem aumento da neuroplasticidade, neurogênese hipocampal, remodelamento dendrítico e maior resiliência frente a diferentes tipos de estressores (Van Praag; Kempermann; Gage, 2000; Baroncelli et al., 2010; Livingston-Thomas et al., 2016; Nithianantharajah; Hannan, 2006), esses efeitos tendem a ser mais evidentes em modelos que produzem déficits emocionais ou cognitivos mais pronunciados (Rojas-Carvajal et al., 2020; Musuroglu et al., 2022). Considerando que os animais deste estudo não apresentaram alterações comportamentais relevantes decorrentes da privação hídrica, é possível que não houvesse um comprometimento suficientemente intenso para que os efeitos protetores do enriquecimento ambiental fossem detectados. Além disso, adaptações induzidas pelo enriquecimento podem ocorrer em níveis moleculares, celulares e sinápticos sem necessariamente resultar em mudanças

comportamentais observáveis nos testes empregados (Zocher et al., 2021; Stephen et al., 2025).

De maneira geral, os resultados obtidos nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado indicam que a privação hídrica utilizada neste estudo não foi capaz de produzir alterações robustas nos comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto o enriquecimento ambiental não promoveu efeitos detectáveis sobre esses parâmetros. Esses achados sugerem que, nas condições experimentais empregadas, o protocolo não foi suficiente para induzir alterações comportamentais detectáveis.

5.3. Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos é amplamente utilizado para avaliar memória de reconhecimento em roedores, explorando a tendência natural desses animais em investigar estímulos novos por um período superior ao dedicado a estímulos previamente conhecidos (Ennaceur; Delacour, 1988; Antunes; Biala, 2012). Após a fase de familiarização, é esperado que animais com memória de reconhecimento preservada apresentem preferência espontânea pelo objeto novo, refletida por um índice de discriminação positivo. Dessa forma, a validade da interpretação desse teste depende não apenas da existência de diferenças estatísticas entre grupos experimentais, mas também da confirmação de que os animais controles apresentem o padrão esperado de exploração do objeto novo (Akkerman et al., 2012; Leger et al., 2013).

No presente estudo, embora tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas em alguns parâmetros isolados, a interpretação desses achados deve ser realizada com cautela. O índice de discriminação observado nos animais normohidratados mantidos em ambiente padrão não apresentou o comportamento esperado para um grupo controle, evidenciando baixa ou inexistente preferência pelo objeto novo. Considerando que esse grupo representa a referência para comparação entre as condições experimentais, a ausência de um padrão adequado de discriminação limita a interpretação dos efeitos

da privação hídrica e do enriquecimento ambiental sobre a memória de reconhecimento.

Diversos fatores metodológicos podem influenciar o desempenho no teste de reconhecimento de objetos. Entre eles, podem ser destacados: a qualidade dos animais utilizados em estudo, o intervalo entre as fases de treinamento e teste, as características físicas dos objetos utilizados, diferenças na saliência dos estímulos, níveis reduzidos de exploração espontânea e fatores ambientais capazes de interferir na motivação exploratória dos animais (Akkerman et al., 2012; Antunes; Biala, 2012; Leger et al., 2013). Quando esses fatores não permitem que os animais controlem demonstrem preferência consistente pelo objeto novo, é difícil atribuir diferenças observadas entre grupos a alterações reais dos processos de aprendizagem ou memória.

Nesse contexto, embora tenha sido observada diferença estatística no índice de discriminação entre os grupos padrão normohidratado e padrão submetido à privação hídrica de 24 horas, esse resultado isolado não pode ser interpretado como evidência de melhora da memória de reconhecimento induzida pela privação hídrica. Da mesma forma, as diferenças observadas na latência para interação e no tempo de exploração do objeto conhecido também não foram acompanhadas por um padrão consistente nos demais parâmetros avaliados, reduzindo a robustez biológica dessas diferenças. Assim, a significância estatística observada deve ser interpretada com cuidado, uma vez que sua relevância funcional permanece incerta diante da ausência de validação adequada do comportamento esperado no grupo controle.

Embora existam evidências demonstrando que a privação hídrica ativa neurônios vasopressinérgicos dos núcleos supraóptico e paraventricular, bem como projeções para estruturas límbicas envolvidas na cognição (Hernández et al., 2015; Hernández et al., 2016), os resultados obtidos neste estudo não permitem estabelecer essa relação. Como o protocolo comportamental não apresentou o padrão esperado de discriminação nos animais controle, qualquer interpretação

acerca da participação da vasopressina, da plasticidade hipocampal ou de mecanismos compensatórios permaneceria especulativa e extrapolaria as evidências produzidas pelo presente trabalho.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou investigar uma temática ainda pouco explorada na literatura, avaliando a interação entre a privação hídrica, um modelo de estresse osmótico, e o enriquecimento ambiental, reconhecido por seus efeitos benéficos sobre a plasticidade neural e o comportamento. Embora diversos estudos tenham demonstrado efeitos do enriquecimento ambiental sobre alterações emocionais e cognitivas induzidas por diferentes modelos de estresse, ainda são escassas as investigações que relacionam essa estratégia experimental ao contexto da privação hídrica.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que, nas condições experimentais empregadas, o protocolo de privação hídrica utilizado não produziu alterações comportamentais detectáveis pelos testes utilizados, enquanto o enriquecimento ambiental não promoveu efeitos que pudessem ser detectados sobre os parâmetros emocionais e cognitivos avaliados. Da mesma forma, a exposição ao enriquecimento ambiental não produziu modificações detectáveis nos parâmetros exploratórios, emocionais ou cognitivos analisados.

Embora a hipótese inicial previsse que o enriquecimento ambiental pudesse atenuar possíveis efeitos comportamentais induzidos pela privação hídrica, os achados sugerem que o desafio osmótico empregado não foi suficiente para provocar prejuízos comportamentais robustos capazes de serem detectados pelos parâmetros utilizados. Dessa forma, não foi possível demonstrar um efeito protetor estatisticamente significativo do enriquecimento ambiental nas condições experimentais avaliadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A ausência de marcadores neurobiológicos capazes de avaliar diretamente alterações em sistemas relacionados ao estresse osmótico, como a atividade vasopressinérgica ou a concentração de angiotensina II, limita a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas observadas.

Dessa forma, futuros estudos poderão aprofundar a compreensão dessa temática por meio da utilização de protocolos mais extensos de privação hídrica, diferentes estratégias de enriquecimento ambiental e da inclusão de análises neuroquímicas, moleculares e histológicas.

Em conjunto, os resultados apresentados fornecem informações relevantes para a compreensão das adaptações fisiológicas e comportamentais associadas ao estresse osmótico e reforçam a necessidade de novas investigações sobre os mecanismos que relacionam homeostase hídrica, aspectos comportamentais e plasticidade neural.

REFERÊNCIAS

- AKKERMAN, S.; et al. Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. **Behavioural Brain Research**, 232(2), 335–347, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.022>>.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M. C.; RODRIGUES, C. F.; et al. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 267–273, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17553501/>>.
- ANTUNES, M., BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, 13(2), 93–110, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>>.
- ANTUNES-RODRIGUES J.; CASTRO, M.; LUCILA, L. K.; et al. Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715914/>>.
- ATROOZ, F.; ALROUSAN, G.; HASSAN, A.; et al. Early-Life Sleep Deprivation Enhanced Alcohol Consumption in Adolescent Rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9081815/>>.
- BARONCELLI, L.; BRASCHI, C.; SPOLIDORO, M.; et al. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 7, p. 1092–1103, 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cdd2009193>>.
- BEALE, K. E. L.; MURPHY, K. G.; HARRISON, E. K.; et al. Accurate Measurement of Body Weight and Food Intake in Environmentally Enriched Male Wistar Rats. **Obesity**, v. 19, n. 8, p. 1715–1721, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/oby.2010.331>>.
- CEVIK, O. S. et al. Maternal separation increased memory function and anxiety without effects of environmental enrichment in male rats. **Behavioural Brain**

Research, v. 441, p. 114280–114280, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36586488/>>.

CHUNG, I.M.; KIM, Y.M.; YOO, M.H.; et al. Immobilization stress induces endothelial dysfunction by oxidative stress via the activation of the angiotensin II/its type I receptor pathway. *Atherosclerosis*, v. 213, n. 1, p. 109–114, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021915010006945>>.

CONRAD, C. D. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 742–755, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19903505/>>.

COSTA, R. et al. Modulatory action of environmental enrichment on hormonal and behavioral responses induced by chronic stress in rats: Hypothalamic renin-angiotensin system components. **Behavioural Brain Research**, v. 397, p. 112928, jan. 2021.

COSTA, R.; TAMASCIA, M. L.; SANCHES, A.; et al. Tactile stimulation of adult rats modulates hormonal responses, depression-like behaviors, and memory impairment induced by chronic mild stress: Role of angiotensin II. **Behavioural Brain Research**, v. 379, p. 112250–112250, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432819304784?via%3Dihub>>.

DORESTE-MENDEZ, R.; RÍOS-RUIZ, E. J.; RIVERA-LÓPEZ, L. L.; *et al.* Effects of Environmental Enrichment in Maternally Separated Rats: Age and Sex-Specific Outcomes. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, p. 455728, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/behavioral-neuroscience/articles/10.3389/fnbeh.2019.00198/full>>.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioral Brain Research**, 31(1), 47–59, 1988. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X).

FELINTRO, V. et. al. Water deprivation induces hypoactivity in rats independently of oxytocin receptor signaling at the central amygdala. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1062211, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1062211/full>>.

GIRONACCI, M. M.; VICARIO, A.; CEREZO, G.; et al. The depressor axis of the renin–angiotensin system and brain disorders: a translational approach. **Clinical Science**, v. 132, n. 10, p. 1021–1038, 2018. Disponível em: <<https://portlandpress.com/clinsci/article-abstract/132/10/1021/77789/The-depressor-axis-of-the-renin-angiotensin-system?redirectedFrom=fulltext>>.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HERNÁNDEZ, V. S.; HERNÁNDEZ, O. R.; PEREZ, M.; et al. Hypothalamic Vasopressinergic Projections Innervate Central Amygdala GABAergic Neurons: Implications for Anxiety and Stress Coping. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 10, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5122712/>>.

HERNÁNDEZ, V. S.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, E.; MÁRQUEZ, M. M.; et al. Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26500509/>>.

HERNANDEZ, V. S.; RUÍZ-VELAZCO, S. ; ZHANG, L. Differential effects of osmotic and SSR149415 challenges in maternally separated and control rats: The role of vasopressin on spatial learning. **Neuroscience Letters**, v. 528, n. 2, p. 143–147, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394012011962>>.

HIMANSHU et al. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341, 31 ago. 2020.

JANKORD, R.; HERMAN, J. P. Limbic Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Function during Acute and Chronic Stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, n. 1, p. 64–73, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120092/>>.

KRAEUTER, A. K. et al. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Springer Protocols**, p. 69–74, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30535682/>>.

KRAUSE, E. G; ANNETTE D. K.; FLAK, J. N.; et al. Hydration State Controls Stress Responsiveness and Social Behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5470–5476, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086063/>>.

KYLIE E.L. et al. Accurate Measurement of Body Weight and Food Intake in Environmentally Enriched Male Wistar Rats. **Obesity**, v. 19, n. 8, p. 1715–1721, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/oby.2010.331>>.

LEGER, M. et al. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 11, p. 4048–4061, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cercor/article/25/11/4048/2366269?login=true>>.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, 8, 2531–2537, 2013. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>.

LIVINGSTON-THOMAS, J.; NELSON, P.; KARTHIKEYAN, S.; et al. Exercise and Environmental Enrichment as Enablers of Task-Specific Neuroplasticity and Stroke Recovery. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 2, p. 395–402, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26868018/>>.

LIU, J.; ZHU, HX.; FU, WL.; et al. Downregulated hippocampal expression of brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B in a rat model of comorbid epilepsy and depression. **Neurological Research**, v. 41, n. 5, p. 437–445, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30741614/>>.

LONETTI, G. et al. Early Environmental Enrichment Moderates the Behavioral and Synaptic Phenotype of MeCP2 Null Mice. **Biological Psychiatry**, v. 67, p. 657–665, 2010. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.12.022

MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic Stress**, v. 1, 2017. DOI: [10.1177/2470547017692328](https://doi.org/10.1177/2470547017692328)

MECAWI, A. S.; SILVIA G. R.; LEICO, L.; et al. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. **Comprehensive Physiology**, p. 1465–1516, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c140031>>.

MENDEZ-DAVID, I.; GUILLOUX, J.P.; PAPP, M.; et al. S 47445 Produces Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects through Neurogenesis Dependent and Independent Mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5515821/>>.

MUSUROGLU, S. K. et al. Environmental enrichment as a strategy: Attenuates the anxiety and memory impairment in social isolation stress. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 82, n. 6, p. 499–512, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jdn.10205>>.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn1970>>.

ORTIZ, J. B.; CONRAD, C. D. The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 49, p. 114–123, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428548/>>.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7).

PHAM, T. M.; SÖDERSTRÖM, S.; WINBLAD, B.; et al. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 63–70, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432899000194>>.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001429990301272X?via%3Dihub>>.

REIS, W. L.; BIANCARDI, V. C.; SON, S.; et al. Enhanced Expression of Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide Excitatory Effects in Oxytocin and Vasopressin Neurones During Water Deprivation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 653–663, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22060896/>>.

ROJAS-CARVAJAL, M.; SEQUEIRA-CORDERO A.; BRENES, J. C. Neurobehavioral Effects of Restricted and Unpredictable Environmental Enrichment in Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2020.00674/full>>.

ROY, V.; CHAPILLON, P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. **Behavioural Brain Research**, v. 154, n. 2, p. 439–448, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166432804000932?via%3Dihub>>.

SAAVEDRA, J. M. ; BENICKY, J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 185–193, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17514587/>>.

SMITH, J. et al. Hydration and beyond: neuropeptides as mediators of hydromineral balance, anxiety and stress-responsiveness. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25873866/>>.

STEPHEN, J. C.; KHARKONGOR, R.; KHAN, U. T. Cognitive Training and Enrichment Modulates Neural Plasticity and Enhances Cognitive Reserve in Aging Rats. *Experimental Aging Research*, 2025. DOI: [10.1080/0361073X.2025.2476331](https://doi.org/10.1080/0361073X.2025.2476331).

VAN-PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191–198, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11257907/>>.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.

ZHANG, L.; HERNÁNDEZ V. S. Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. **Neuroscience**, v. 228, p. 139–162, 2013. Disponível em: <[https://www.ibroneuroscience.org/article/S0306-4522\(12\)01018-4/abstract](https://www.ibroneuroscience.org/article/S0306-4522(12)01018-4/abstract)>.

ZOCHER, S.; OVERALL, R. W; LESCHE M.; et al. Environmental enrichment preserves a young DNA methylation landscape in the aged mouse hippocampus. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-021-23993-1>>.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado de aprovação da CEUA



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do enriquecimento ambiental na sede e no comportamento do tipo ansioso e depressivo de ratos submetidos a estimulação osmótica", protocolada sob o CEUA nº 1072240523 (ID 002535), sob a responsabilidade de **Wagner Luis Reis e equipe; Gabriela Lumi Yabu** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 10/10/2023.

We certify that the proposal "Effects of environmental enrichment on thirst and anxious/depressive-l.i.k.e behavior induced by osmotic stimulation", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 1072240523 (ID 002535), under the responsibility of **Wagner Luis Reis and team; Gabriela Lumi Yabu** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 10/10/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 09/2023 a 03/2025 Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

Linhagem: **Wistar**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 21 dias**

Quantidade: **144**

Peso: **30 a 30 g**

Florianópolis, 10 de outubro de 2023

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

