



---

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS – PIPGCF UFSCar/UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

***“Controle das respostas cardiovasculares ao estresse  
pela neurotransmissão endocanabinóide no núcleo  
leito da estria terminal em ratos: interação com a via de  
sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/proteína quinase  
G e envolvimento do hipotálamo lateral”***

**Lucas Gomes de Souza**

Araraquara/SP  
2020

**Lucas Gomes de Souza**

**“Controle das respostas cardiovasculares ao estresse  
pela neurotransmissão endocanabinóide no núcleo  
leito da estria terminal em ratos: interação com a via de  
sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/proteína quinase  
G e envolvimento do hipotálamo lateral”**

*Tese apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP para a  
obtenção do **Título de Doutor em Ciências.***

*Área de concentração: **Fisiologia.***

*Orientador: **Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.***

*Araraquara/SP  
2020*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

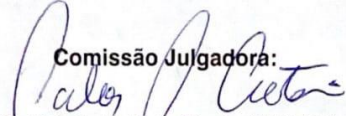
---

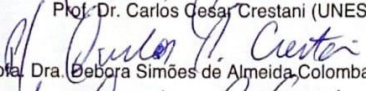
**Folha de Aprovação**


---

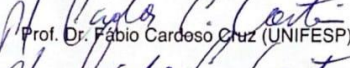
Defesa de Tese de Doutorado do candidato Lucas Gomes de Souza, realizada em 23/09/2020.

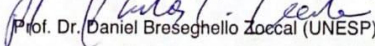
**Comissão Julgadora:**

  
Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)

  
Prof. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari (UNESP)

  
Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa (USP)

  
Prof. Dr. Fabio Cardoso Cruz (UNIFESP)

  
Prof. Dr. Daniel Bresseghele Zoccal (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.  
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Eu dedico este trabalho aos meus pais, José e Valdelice!  
Obrigado!

AGRADECIMENTOS

---

*Eu sou grato a **DEUS** pela dádiva da minha vida e por todos os obstáculos encontrados em minha caminhada! Deus foi aquele que me deu forças para caminhar e sempre olhar para frente, mesmo quando a tristeza e o desânimo estiveram prestes a me derrubar... Obrigado **DEUS**, hoje eu só tenho que agradecer a felicidade que tu me proporcionaste!*

*Agradeço aos meus pais **José Vicente de Souza e Valdelice Gomes Lopes** que não pouparam seus esforços e se dedicaram para que minha vitória fosse alcançada! Às minhas irmãs **Andreza Gomes de Souza Stefani e Jaqueline Gomes de Souza, Paulo Stefani (cunhado)** e em especial meu sobrinho **Brayan Stefani** tenho uma certeza em meu coração que vocês sempre estarão ao meu lado, eu amo minha família... Eu amo vocês!*

*Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani**, que acreditou, confiou e nunca desistiu de mim... Estar na vida acadêmica foi incrível! Quantas vezes fui bater em sua porta com meus anseios, dúvidas, inseguranças e você teve a compreensão e o entendimento necessário para tornar minha caminhada mais firme e segura com todo o seu ensino, conhecimento e dedicação! Levo comigo a experiência do imenso profissional que você é chefe!*

*Agradeço ao **Leandro Augusto de Oliveira** pela amizade que fiz na vida acadêmica, quantos experimentos, conversas, risadas, confidências, alegrias, brigas, tristezas, choros, desabafos, comemorações... Você sempre esteve ao meu lado! Obrigado Lê!!!*

*Agradeço ao **Ricardo Benini**, o amigo mais pilhado e elétrico que eu conheci! Quantas risadas e “zueira” entre nós! É muito bom ter você ao meu lado e sem esquecer da **Sarah Vargas**, amo vocês!*

*Agradeço minha amiga **Ana Carolina Moreira da Silva Pires**, sempre ao meu lado, verdadeira, espontânea e com o um astral lá em cima! **Bee**, o que seria de mim sem você? Sempre juntos!*

*Agradeço ao **Gessynger Moraes Silva** e a **Larissa Spósito**, sempre alegrando a minha vida! Sempre foi e será um prazer estar com vocês! Quantos hot-dogs, churrasquinhos, barzinhos, carnaval e sem esquecer do dia doido do PIRATAS (risos), mas tivemos conversas que renderam bastante assunto... Obrigado benzinhos!*

Agradeço ao **Willian Costa Ferreira**, um irmão que a vida me concedeu! Sempre ao meu lado... Me ajudou, ensinou, salvou várias vezes, aguentou meus choros, minhas crises, meus surtos e risadas largas! Como pode? Uma amizade assim? (risos e choros), um companheiro de apartamento, de rachar a conta, de discussões pessoais e profissionais, de muitos e muitos experimentos, cálculos, diluições, viagens para congressos sempre juntos! Um amigo que levo para a vida! Estaremos juntos para sempre! Te amo meu amigo...

Agradeço a minha grande amiga **Heloiza Rossi**, uma amizade que transcende a vida! Esses anos ao seu lado meu tornou uma pessoa muito melhor! Você sempre torceu e esteve ao meu lado! Desde a turma do ônibus 990 até a Europa! Um ajudando o outro em todos os sentidos! Muito obrigado para você e toda sua família que me acolheu como se fosse um deles! Te amo para sempre!

Agradeço às grandes amigas que Deus me deu de presente... São vocês **Láisse, Laiane, Laila**; e não posso esquecer da matriarca **Néia**! Obrigado pelas risadas, choros e desabafos... E antes que vocês reclamem, eu não me esqueci dos namorados **Natanael, Bruno e o Ailton**. Deus vos abençoe!

Agradeço o grupo **Mc Donald's lovers** composto pelo meus lindos **Gabriel (estorvo), Celina, Emilson e Jéssica**... Ah! como é bom estar com vocês! Gosto muito dos nossos "rolês" praticamente gastronômicos, como é bom nossas risadas... Uma amizade que a vida me trouxe de presente! Vou levar todos comigo...

Agradeço aos colegas do grupo do laboratório de farmacologia da FCFAR – UNESP **Lucas Canto, Daniela Baptista, Vinicius Costa, Nathália (Bang), Diego (Di), Matheus (Capião), Lígia Cury, Carlos Roberto, Lorena Souza, Lilian Liz, Carlos Eduardo (Cadu), Rodrigo Anderson, Beatriz Moreno, Camila Marchi, Patrícia Rodella, Vanessa Amaral, Karine Borsari** e aos colegas do laboratório de toxicologia **Jonatas Oliveira, Eduardo Vivêncio e Rafaela Baldassari**, e todos os colegas que por ventura eu possa ter esquecido! E um agradecimento especial ao **Lucas Barretto de Souza**, meu irmãozinho mais novo e tenho muito apreço pela sua amizade e não posso esquecer da minha querida **Tatiani Sorregotti**, minha amiga de longa data! Tatinha, eu te amo muito viu?

Agradeço aos amigos da UNIFESP-SP **Paula Bianchi (Pupu), Paola Palombo, Sheila Engi, Carol Zaniboni, Thais Yokoyama e Fábio Cruz**, aos amigos da FCAV – Jaboticabal **Mariane Vicente (Bah), Elisa Maioqui, Caroline Silva, Carlos Junior, Camila Linhares (Matão/Jabuka)**, aos amigos da FC – Bauru **Naiara Herrera (Nah), Francine Duchatsch (Fran), Danyelle Miotto (Dany), Lidieli Tardelli (Lidi), Vinícius (Vini)** e a Profa. Dra. **Sandra Lia do**

**Amaral Cardoso**, aos amigos da UFSCar, em especial a minha parceira de vida, **Lígia Tavares** e aos amigos da FOAr **Aline Zenatti**, **Diulli Cavassim** e todos os outros que fizeram parte dessa jornada.

Agradeço a secretária do departamento **Tirene Pavanelli (Ti)**, aos secretários do PIPGCF **Alexandre Chiva (UFSCar)** e **Cláudia Molina (UNESP)** e as técnicas do laboratório **Rosana Pupin** e **Elizabete Lepera** por toda ajuda e aprendizado.

Agradeço aos professores do laboratório de Farmacologia, **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**, **Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin** e a **Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta** que não hesitam em ensinar.

Agradeço aos membros da **banca examinadora** pelas críticas construtivas e sugestões para a melhora deste trabalho.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (**FCFar/UNESP**) pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (**PIPGCF-UFSCar/UNESP**) pela a oportunidade.

Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, (**FAPESP-processo 2016/05028-9**) pelo apoio financeiro, pela bolsa concedida e divulgação em congressos científicos nacionais e internacionais.

Agradeço aos animais utilizados no desenvolvimento deste trabalho “**O uso de animais em pesquisa é um privilégio. Estes animais que estão nos ajudando a desvendar os mistérios da ciência merecem nosso respeito e o melhor cuidado possível. Um animal bem tratado irá proporcionar resultados científicos mais confiáveis, o que deve ser o objetivo de todos os pesquisadores.**” (Guimarães, 2004).



"Quando a vida te decepciona, qual é a solução? Continue a nadar, continue a nadar! Para achar a solução, nadar, nadar!"

(Dory, filme Procurando Nemo – 2003)

## **AUXÍLIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi conduzido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, auxílio 2016/05028-9).

RESUMO

---

GOMES-DE-SOUZA, L. “**Controle das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão endocanabinóide no núcleo leito da estria terminal em ratos: interação com a via de sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/proteína quinase G e envolvimento do hipotálamo lateral.**” 2020. (Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFAr, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, 2020.

**RESUMO.** O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura localizada no prosencéfalo rostral, que participa no processamento das respostas autônomas, neuroendócrinas e comportamentais durante situações aversivas. Um estudo recente do nosso grupo evidenciou uma influência inibitória da sinalização endocanabinóide no NLET, agindo através do receptor CB<sub>1</sub> local, na resposta de taquicardia induzida pelo estresse de restrição agudo, porém sem influenciar as respostas de aumento da pressão arterial média e vasoconstrição cutânea da cauda. Neste sentido, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA e da sinalização do óxido nítrico (NO) locais no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET. Nós observamos que o antagonismo do receptor CB<sub>1</sub> no (AM251) NLET aumentou a liberação de óxido nítrico (NO) durante o estresse de restrição. Além disso, a microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) no NLET facilitou a resposta taquicárdica, porém sem afetar as respostas pressora e de queda da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo. A facilitação da resposta taquicárdica ao estresse de restrição causada pelo tratamento com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET foi completamente abolida após o pré-tratamento local com um antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA (LY235959), bem como com inibidores seletivos das enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NPLA) e guanilato ciclase solúvel (ODQ) e da proteína quinase G (KT5823). Nossos resultados sugerem que a neurotransmissão endocanabinóide no NLET inibe a via de sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/proteína quinase G; e esse mecanismo está envolvido no controle da resposta taquicárdica ao estresse. Nós também avaliamos o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no hipotálamo lateral (HL) no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET. No experimento de caracterização do papel da neurotransmissão GABAérgica no HL nós identificamos que a microinjeção

bilateral de um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> (SR95531) no HL, mas não de um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub> (CGP35348), reduziu a resposta de taquicardia ao estresse de restrição, porém sem afetar as respostas pressora e de queda da temperatura cutânea da cauda. Esses achados indicam que a neurotransmissão GABAérgica no HL, atuando através de receptores GABA<sub>A</sub> locais, desempenha um papel facilitatório na resposta taquicárdica durante o estresse de restrição agudo. A avaliação da participação da neurotransmissão GABAérgica do HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET revelou que a microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) no NLET diminuiu a ativação neuronal no HL durante o estresse de restrição. Além disso, a facilitação da taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição causada pela microinjeção de AM251 no NLET foi abolida pelo pré-tratamento do HL com o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>. Por fim, nós avaliamos o envolvimento de receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET na ansiedade inata e na resposta ansiogênica ao estresse de restrição agudo. Avaliação da expressão gênica revelou a presença dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> nas divisões anterior e posterior do NLET. A microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) no NLET anterior aumentou a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) em animais *naive* e inibiu o efeito ansiogênico no LCE desencadeado pelo estresse de restrição. Por outro lado, a microinjeção de um antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> (JTE907) no NLET anterior aumentou de maneira dose-dependente a ansiedade inata e inibiu a resposta ansiogênica causada pela restrição. Esses resultados indicam que os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> presentes no NLET estão envolvidos no controle da ansiedade inata e das respostas ansiogênicas evocadas pelo estresse.

**Palavras-chave:** restrição; núcleo leito da estria terminal; endocanabinóide; glutamato; labirinto em cruz elevado; hipotálamo lateral.

ABSTRACT

---

GOMES-DE-SOUZA, L. "Control of cardiovascular responses to stress by endocannabinoid neurotransmission in the terminal bed nucleus of the stria terminalis in rats: interaction via local NMDA receptor/nNOS/sGC/protein kinase G signaling pathway and involvement of the lateral hypothalamus." 2020. Thesis in PhD in Physiological Sciences) - School of Pharmaceutical Sciences of Araraquara - FCFAr, São Paulo State University - UNESP, Araraquara, 2020.

**ABSTRACT.** The bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is a structure located in the rostral forebrain, which has been implicated in autonomic, neuroendocrine and behavioral responses during aversive situations. A recent study from our group showed an inhibitory influence of endocannabinoid signaling within the BNST, acting through the local CB<sub>1</sub> receptor, in the tachycardia induced by acute restraint stress, but with no effects on the arterial pressure increase and the sympathetic-mediated cutaneous vasoconstriction. Based upon that, one of the objectives of this work was to evaluate the involvement of NMDA glutamatergic receptor and local nitric oxide (NO) signaling in the control of cardiovascular responses to acute restraint stress by BNST endocannabinoid neurotransmission BNST. We observed that CB<sub>1</sub> receptor antagonism in the BNST increased the release of nitric oxide (NO) during acute restraint stress. In addition, bilateral microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist (AM251) into the BNST facilitated the tachycardic response, but with no effects the pressure response and the cutaneous tail temperature drop induced by acute restraint stress. The facilitation of the tachycardic response to acute restraint stress caused by treatment with the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist in the BNST was completely abolished after local pretreatment with a NMDA selective glutamatergic receptor antagonist (LY235959), as well as with selective inhibitors of the enzymes neuronal nitric oxide synthase (NPLA) and soluble guanylate cyclase enzyme (ODQ) and protein kinase G (KT5823). Our results suggest that endocannabinoid neurotransmission in the BNST inhibits local glutamatergic neurotransmission via NMDA/nNOS/sGC/protein kinase G signaling; and this mechanism is involved in the control of tachycardiac response to stress. We also assessed the involvement of GABAergic neurotransmission in the lateral hypothalamus (LH) in the control of cardiovascular responses to acute restraint stress by BNST CB<sub>1</sub> receptors. Experiments of characterization of LH GABAergic neurotransmission revealed that bilateral microinjection of a selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist (SR95531) into the LH, but not a selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist (CGP35348), reduced

the tachycardia response to acute restraint stress, but without affecting the pressor responses and the drop in tail skin temperature. These findings indicated that GABAergic neurotransmission in the LH, acting through local GABA<sub>A</sub> receptors, plays a facilitatory role in the tachycardic response to restraint stress. Evaluation of the participation of LH GABAergic neurotransmission in HL in the control of cardiovascular responses to acute restraint stress by CB<sub>1</sub> receptor in BNST revealed that microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist into the BNST decreased the neuronal activation of LH neurons during acute restraint stress. Besides, facilitation of tachycardia caused by acute restraint stress following microinjection of AM251 into the BNST was abolished by pretreatment with a selective receptor antagonist GABA<sub>A</sub> (SR95531) in the LH. Finally, we investigated the involvement of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in the BNST in innate anxiety and anxiogenic response to acute restraint stress. Analysis of gene expression revealed the expression of both CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in the anterior and posterior divisions of the BNST. Intra-BNST microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist (AM251) increased the open arms exploration of the elevated plus-maze (EPM) in *naïve* animals and inhibited the anxiogenic effect observed in the EPM triggered by acute restraint stress. On the other hand, intra-BNST microinjection of a selective CB<sub>2</sub> receptor antagonist (JTE907) dose-dependently increased the innate anxiety in the EPM and inhibited the anxiogenic response evoked by restraint. These results indicate that CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors present in the BNST are involved in the control of innate anxiety and anxiogenic responses evoked by stress.

**Keywords:** Restraint; bed nucleus of the stria terminalis; endocannabinoid; glutamate; elevated plus maze, lateral hypothalamus.



## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

---

## **FIGURAS**

<i>Figura 1 - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2 - Ligantes endógenos dos endocanabinóide.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 3 - Representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 4 - Corte histológico referente a microinjeção no NLET.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 5 - Níveis de nitrito no NLET.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 6 - Representação diagramática nos grupos referentes ao receptor NMDA.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 7 - Curvas temporais dos grupos referentes ao receptor NMDA.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 8 - Representação diagramática nos grupos referentes ao inibidor da nNOS.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 9 - Curvas temporais dos grupos referentes ao inibidor da nNOS.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 10 - Representação diagramática nos grupos referentes ao inibidor da GCs.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 11 - Curvas temporais dos grupos referentes ao inibidor da GCs.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 12 - Representação diagramática nos grupos referentes ao inibidor da PKG.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 13 - Curvas temporais dos grupos referentes ao inibidor da PKG.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 14 - Mecanismo de interação endocanabinóide via receptor NMDA/nNOS/GCs/ PKG.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 15 - Corte histológico referente a microinjeção no HL.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 16 - Representação diagramática dos sítios de microinjeção no HL.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 17 - Curvas temporais e a média das respostas referentes aos grupos GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 18 - Corte histológico representando a marcação de c-Fos no HL.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 19 - Fotos representativas dos grupos com marcações no HL.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 20 - Quantificação de neurônios positivos para c-Fos no HL.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 21 - Valores basais referentes aos grupos da interação NLET+HL.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 22 - Curvas temporais referentes aos grupos da interação NLET+HL.....</i>	<i>99</i>

<i>Figura 23 - Interação da neurotransmissão endocanabinóide no NLET e a neurotransmissão GABAérgica no HL no controle da resposta de FC durante o estresse de restrição.....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 24 - Gráfico de expressão gênica (RNAm) dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET e CPFm.....</i>	<i>112</i>
<i>Figura 25 - Corte histológico representando a microinjeção no NLET.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 26 - Representação diagramática referentes os grupos antagonistas CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 27 - Gráficos referentes a ansiedade inata (AM251 no NLET).....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 28 - Gráficos referentes a resposta ansiogênica pelo estresse (AM251 no NLET).....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 29 - Gráficos referentes a ansiedade inata (JTE907 no NLET).....</i>	<i>120</i>
<i>Figura 30 - Gráficos referentes a resposta ansiogênica pelo estresse (JTE907 no NLET).....</i>	<i>122</i>

## **TABELAS**

<i>Tabela 1 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de temperatura cutânea da cauda (T°C) após os tratamentos farmacológicos no núcleo do leito da estria terminal (NLET).....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 2 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de temperatura cutânea da cauda (T°C) após os tratamentos farmacológicos no núcleo do leito da estria terminal (HL). ....</i>	<i>76</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>2-AG</b>	<i>2-araquidonoil glicerol</i>
<b>5HT1A/5HT1C</b>	<i>receptor 5-hidroxitriptamina do tipo 1A/1C</i>
<b>AEA</b>	<i>anandamida</i>
<b>AHA</b>	<i>área hipotalâmica anterior</i>
<b>CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub></b>	<i>receptor endocanabinóide do tipo 1 e 2</i>
<b>CBD</b>	<i>canabidiol</i>
<b>cDNA</b>	<i>ácido desoxirribonucléico complementar</i>
<b>CeA</b>	<i>amígdala central</i>
<b>CNR1</b>	<i>ΔCt do receptor CB<sub>1</sub></i>
<b>CNR2</b>	<i>ΔCt do receptor CB<sub>2</sub></i>
<b>CPFm</b>	<i>córtex pré-frontal medial</i>
<b>DMSO</b>	<i>dimetilsulfóxido</i>
<b>DNA</b>	<i>ácido desoxirribonucléico complementar</i>
<b>EPM</b>	<i>erro padrão da média</i>
<b>FC</b>	<i>frequência cardíaca</i>
<b>GAPDH</b>	<i>proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
<b>GCs</b>	<i>guanilato ciclase solúvel</i>
<b>HL</b>	<i>hipotálamo lateral</i>
<b>HPA</b>	<i>eixo hipófise-pituitária-adrenal</i>
<b>IA</b>	<i>interaural</i>
<b>LCE</b>	<i>labirinto em cruz elevado</i>
<b>MCH</b>	<i>hormônio concentrador de melanina</i>
<b>NLET</b>	<i>núcleo leito da estria terminal</i>
<b>NMDA</b>	<i>N-metil-D-aspartato</i>
<b>nNOS</b>	<i>óxido nítrico sintase neuronal</i>

<b>NO</b>	<i>óxido nítrico</i>
<b>Nox</b>	<i>número de oxidação</i>
<b>NPLA</b>	<i>N<math>\omega</math>-propil-L-arginina</i>
<b>ODQ</b>	<i>1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one</i>
<b>OMS</b>	<i>organização mundial da saúde</i>
<b>PAM</b>	<i>pressão arterial média</i>
<b>PKG</b>	<i>proteína quinase G</i>
<b>PVN</b>	<i>núcleo paraventricular do hipotálamo</i>
<b>RNAm</b>	<i>ácido ribonucleico mensageiro</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>reação em cadeia polimerase em tempo real</i>
<b>SNC</b>	<i>sistema nervoso central</i>

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>ASPECTOS GERAIS.....</b>	<b>28</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
1.1. Respostas fisiológicas ao estresse .....	28
1.2. Núcleo leito da estria terminal (NLET) .....	31
1.3. Sistema endocanabinóide .....	32
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>38</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>39</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>40</b>
3.1. Animais.....	40
3.2. Implante de cânulas guias no NLET .....	40
3.3. Canulação da artéria femoral .....	41
3.4. Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca .....	41
3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda .....	42
3.6. Drogas e soluções utilizadas.....	42
3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central .....	42
3.8. Estresse por restrição agudo .....	43
3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no NLET .....	43
3.10. Quantificação dos níveis de metabólitos do NO .....	43
3.11. Análise estatística .....	44
<b>4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>44</b>
4.1. Efeito da microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB <sub>1</sub> no NLET sobre os níveis de NO <sub>x</sub> durante o estresse de restrição agudo .....	44
4.2. Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo pelo receptor CB <sub>1</sub> no NLET ....	45
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1. Efeitos da microinjeção de AM251 no NLET sobre os níveis locais de NO <sub>x</sub> durante o estresse agudo de restrição .....	48
5.2. Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo pelo receptor CB <sub>1</sub> no NLET ....	50
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>71</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>72</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>72</b>
3.1. Animais.....	72
3.2. Implante de cânulas guias no HL.....	72
3.3. Canulação da artéria femoral .....	72
3.4. Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca .....	72
3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda .....	72



3.6. Drogas e soluções utilizadas.....	73
3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central.....	73
3.8. Estresse por restrição agudo .....	73
3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no HL .....	73
3.10. Análise estatística .....	73
<b>4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>74</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>87</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>87</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>88</b>
3.1. Animais.....	88
3.2. Implante de cânulas guias no NLET e HL.....	88
3.3. Canulação da artéria femoral.....	88
3.4. Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca .....	88
3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda.....	88
3.6. Drogas e soluções utilizadas.....	88
3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central.....	89
3.8. Estresse por restrição agudo .....	89
3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas.....	89
3.10. Imunohistoquímica para c-Fos.....	89
3.11. Análise estatística .....	90
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>91</b>
4.1. Avaliação do efeito da microinjeção de AM251 no NLET no número de neurônios c-Fos positivos no HL após uma sessão aguda de estresse por restrição.....	91
4.2. Efeito AM251 da microinjeção no NLET com o pré-tratamento com SR95531 no HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. ....	92
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>92</b>
5.1. Efeito da microinjeção de AM251 no NLET sobre o número de células positivas para c-Fos no HL após o estresse de restrição agudo .....	93
5.2. Efeito do pré-tratamento do HL com SR95531 nas alterações das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição causadas pelo tratamento do NLET com AM251 97	
<b>6.DISSCUSSÃO .....</b>	<b>100</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>104</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>106</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>106</b>
3.1. Animais.....	106
3.2. Extração de RNAm, síntese do c-DNA e reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR).....	106
3.3. Implante de cânulas guias no NLET .....	107

3.4. Drogas e soluções utilizadas.....	107
3.5. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central.....	108
3.6. Labirinto em cruz elevado (LCE).....	108
3.7. Estresse por restrição agudo .....	108
3.8. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no NLET .....	108
3.9. Análise estatística .....	109
<b>4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>109</b>
4.1. Análise da expressão gênica dos receptores CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub> no NLET e CPFm.....	109
4.2. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista do receptor CB <sub>1</sub> (AM251) no NLET anterior nas respostas comportamentais no LCE (ansiedade inata) .....	110
4.3. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista do receptor CB <sub>1</sub> (AM251) no NLET anterior nas alterações comportamentais no LCE evocadas pelo estresse de restrição .....	110
4.4. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB <sub>2</sub> (JTE907) no NLET anterior nas respostas comportamentais no LCE (ansiedade inata) .....	110
4.5. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB <sub>2</sub> (JTE907) no NLET anterior nas alterações comportamentais no LCE evocadas pelo estresse de restrição .....	111
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>111</b>
5.1. Expressão gênica dos receptores endocanabinóides CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub> no NLET e no CPFm.....	111
5.2. Papel dos receptores CB <sub>1</sub> no NLET no controle de comportamentos semelhantes à ansiedade.....	113
5.3. Papel dos receptores CB <sub>2</sub> no NLET no controle de comportamentos semelhantes à ansiedade.....	119
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
6.1. Receptores CB <sub>1</sub> , NLET e ansiedade.....	125
6.2. Receptores CB <sub>2</sub> , NLET e ansiedade.....	127
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>128</b>
<b>CONCLUSÃO FINAL.....</b>	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXOS com os artigos publicados com os dados desta tese intitulados: .....</b>	<b>159</b>
1 - Cannabinoid receptor type 1 in the bed nucleus of the stria terminalis modulates cardiovascular responses to stress via local N-methyl-D-aspartate receptor/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/ protein kinase G signaling.....	159
2 - GABAA but not GABAB receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardic response to emotional stress in rats. ....	159

# INTRODUÇÃO GERAL

---

## **ASPECTOS GERAIS**

### **1. INTRODUÇÃO**

#### **1.1. Respostas fisiológicas ao estresse**

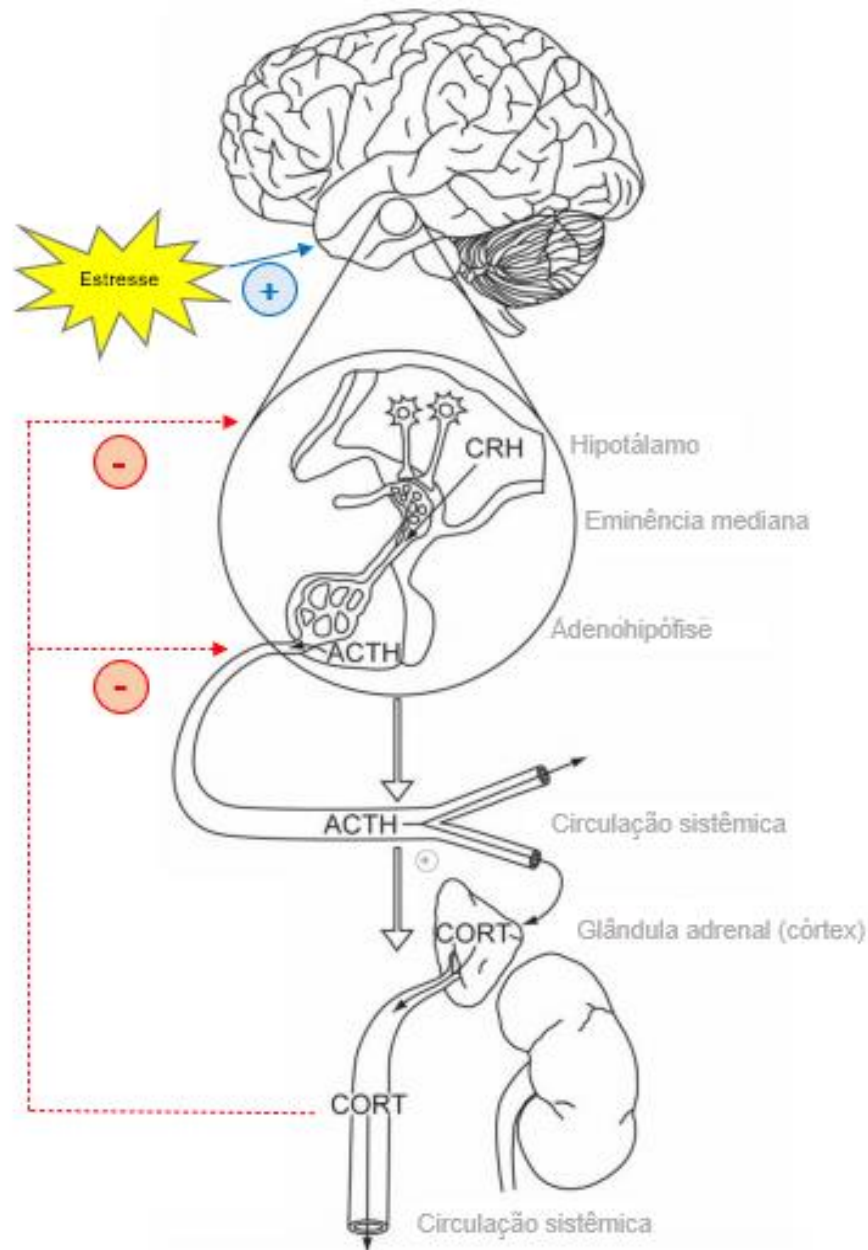
No ano de 2018 foi publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) o ranking das dez principais causas de morte no mundo, colocando as doenças cardiovasculares como o acidente vascular encefálico e a isquemia cardíaca no topo do ranking (OMS,2018). O estresse é proposto como um fator de risco para desencadeamento de doenças cardiovasculares (KIVIMÄKI; STEPTOE, 2018; WIRTZ; VON KÄNEL, 2017) (GRIPPO et al., 2006; SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014). De fato, algumas evidências demonstraram que fatores psicossociais como o estresse psicológico contribuem para o comprometimento da função cardiovascular (CRESTANI, 2016; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; GRIPPO et al., 2006; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002, 2008).

O termo estresse tem sido bastante discutido na literatura. O pesquisador Hans Selye (1956) definiu o estresse como uma resposta não específica do organismo a um agente estressor (MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2015; ROM; REZNICK, 2015; SANTOS; CASTRO, 1998). Alguns anos depois, (MCEWEN, 2000) definiu o estresse como uma ameaça real ou implícita a integridade fisiológica ou psicológica do indivíduo (MCEWEN, 2000). Desse modo, podemos definir que o estresse é um conjunto de eventos, que começa com um estímulo estressor, no qual exerce uma reação no cérebro (percepção do estresse), que subsequentemente resulta na ativação de sistemas fisiológicos no organismo (resposta ao estresse). (DHABHAR; MCEWEN, 1997; DHABHAR, 2019)

Diante uma situação de estresse, um conjunto coordenado de respostas fisiológicas é gerada com o objetivo de manutenção do equilíbrio interno (CRESTANI, 2016; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Em relação ao sistema nervoso autônomo, alterações na atividade autônoma e na função cardiovascular constituem importantes respostas observadas durante o estresse (CRESTANI, 2016; DAMPNEY; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Nesse sentido, estudos pré-clínicos evidenciaram que durante o estresse ocorre a ativação do sistema nervoso simpático e parassimpático

cardíaco (CARRIVE, 2006; CRESTANI et al., 2009a; CRESTANI, 2016; DOS REIS et al., 2014). Aumento da pressão arterial média e frequência cardíaca; redistribuição do fluxo sanguíneo (redução da perfusão cutânea e visceral e aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo também são observados durante situações aversivas (CRESTANI, 2016; CRESTANI et al., 2010; DAMPNEY; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008; KVETNANSKY et al., 1979; SCHADT; HASSER, 1998; ZHANG; JULIEN; BARRÈS, 1996). A diminuição do fluxo sanguíneo para a pele reduz a temperatura cutânea durante situações aversivas (BUSNARDO et al., 2013a; VIANNA; CARRIVE, 2005).

O eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) também é recrutado durante situações aversivas, o que acarreta aumento nos níveis circulantes dos glicocorticóides (BALE; VALE, 2004; HERMAN et al., 2016; MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2015). Na percepção do estresse, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é ativado e ocorre a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de vasopressina (AVP) (que auxilia a ação do CRH) na eminência mediana ou sistema porta-hipofisário percorrendo até a porção anterior do hipotálamo ou a adenohipófise. Esses hormônios agem sinergicamente na adenohipófise estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea, que por sua vez age na zona fasciculada do córtex da glândula adrenal estimulando a produção e liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999; HERMAN et al., 2016). Mecanismos de retroalimentação negativa tem a capacidade de controlar a produção e liberação dos hormônios do eixo HPA (BALE; VALE, 2004; HERMAN et al., 2016; MOISIADIS; MATTHEWS, 2014; MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2015) (Figura 1). Além disso, neurônios simpáticos se projetam diretamente para a medula das adrenais, nos quais estimulam a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) na circulação (BORNSTEIN; CHROUSOS, 1999; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Apesar da importância das alterações no sistema neuroendócrino, na atividade autônoma e na função cardiovascular durante situações aversivas, os mecanismos neurobiológicos envolvidos na geração e controle dessas respostas ainda são pouco compreendidos.



**Figura 1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).** As respostas são iniciadas pelos neurônios do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Os estímulos aversivos causam liberação de CRH na eminência mediana, que transportam esse peptídeo para a adenohipófise e o CRH se ligam nos seus receptores nos corticotróficos. Essa estimulação libera hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica, pela qual promove a síntese e secreção de glicocorticóides no córtex adrenal (CORT). Os glicocorticóides são então secretados na circulação sistêmica e pode acessar receptores cognatos em praticamente todos os sistemas orgânicos, incluindo o cérebro. (adaptado de: Herman et al.,2016).

## 1.2. Núcleo leito da estria terminal (NLET)

As respostas fisiológicas desencadeadas pelo estresse são mediadas pela ativação de estruturas límbicas no encéfalo (CRESTANI et al., 2013a; DAMPNEY, 2015; MILES; MAREN, 2019; MYERS; ULRICH-LAI, 2017; RADLEY; JOHNSON, 2018; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Uma das estruturas ativadas durante situações aversivas é o núcleo leito da estria terminal (NLET), (do inglês: *bed nucleus of the stria terminalis*, BNST) (CULLINAN et al., 1995; NEWSOM et al., 2012), no qual está localizado no prosencéfalo rostral (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001). O NLET forma um contínuo rostralmente à amígdala (DE OLMOS, J.; BELTAMINO, C.A.; ALHEID, 2004; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001), e diversos estudos demonstram uma notável similaridade morfológica e neuroquímica entre o NLET e algumas regiões da amígdala (DE OLMOS, J.; BELTAMINO, C.A.; ALHEID, 2004). Desse modo, o NLET é considerado um constituinte da “amígdala estendida” (ALHEID; HEIMER, 1988), na qual é composto pelos núcleos central e medial da amígdala e o NLET, bem como o conjunto de células que conectam essas estruturas (ALHEID; HEIMER, 1988; DE OLMOS, J.; BELTAMINO, C.A.; ALHEID, 2004).

O NLET possui conexões recíprocas com a amígdala, além de receber projeções do hipocampo e do córtex pré-frontal medial (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; MYERS et al., 2017; VERTES, 2004). Além disso, o NLET também é conectado com regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas no controle das respostas cardiovasculares e neuroendócrinas ao estresse (DONG; SWANSON, 2004). Desse modo, o NLET tem sido proposto como um centro de integração de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse, ao conectar estruturas como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal a regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas na geração das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse (CHOI et al., 2007; CRESTANI et al., 2013a; MYERS; ULRICH-LAI, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Foi demonstrado o envolvimento do NLET nas respostas cardiovasculares, neuroendócrinas e comportamentais induzidas por estímulos aversivos (CRESTANI et al., 2013a; DAVIS et al., 2010; ULRICH-LAI; HERMAN,

2009; WALKER; MILES; DAVIS, 2009). Com relação às respostas cardiovasculares, o papel do NLET nessas respostas parece depender do tipo de estímulo aversivo (CRESTANI et al., 2013a). Por exemplo, estudos prévios do nosso laboratório evidenciaram que o bloqueio sináptico local no NLET facilitou a resposta de taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição agudo (estímulo aversivo não-condicionado) (CRESTANI et al., 2009b), ao passo que as respostas cardiovasculares e comportamentais observadas durante o teste de medo condicionado ao contexto foram reduzidas após a inibição do NLET (RESSTEL et al., 2008).

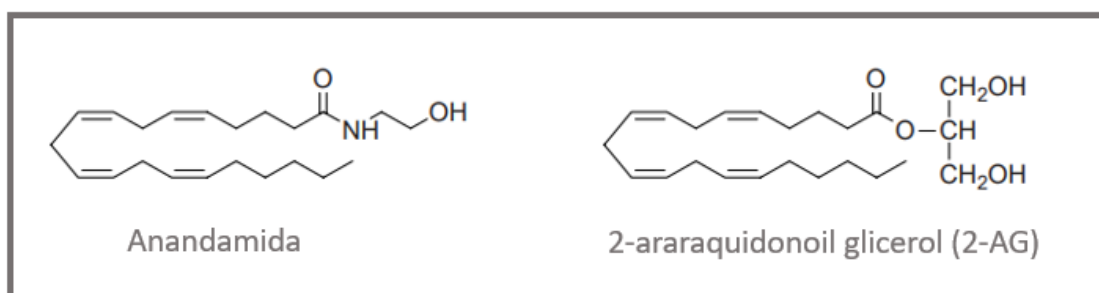
Os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET ainda não são completamente conhecidos. Estudos prévios forneceram evidências do envolvimento de mecanismos glutamatérgicos, noradrenérgicos, colinérgicos, CRFérgicos e nitrérgicos no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET (ADAMI et al., 2017; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018b; CRESTANI et al., 2009b; GOUVEIA et al., 2016; HOTT et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Outros estudos demonstraram que a microinjeção local de canabidiol (um fitocanabinóide de *Cannabis sativa*) no NLET afetou as respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição e pelo modelo de medo condicionado ao contexto, mas esses efeitos foram mediados pela ativação da serotonina local (5-HT)<sub>1A</sub> (GOMES et al., 2012, 2013). Desse modo, o envolvimento de neurotransmissores atípicos, como a neurotransmissão endocanabinóide, ainda é pouco compreendido.

### **1.3. Sistema endocanabinóide**

Estudos evidenciaram a participação da neurotransmissão endocanabinóide nas respostas fisiológicas e comportamentais evocadas por estímulos aversivos (HILL; MCEWEN, 2010; LUTZ et al., 2015; MORENA et al., 2016). O termo endocanabinóide refere-se ao conjunto de ligantes endógenos dos receptores ativados pelo  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), o composto responsável pela maioria dos efeitos induzidos pela planta *Cannabis sativa* (conhecida popularmente como maconha) (HOWLETT et al., 2002a). Os



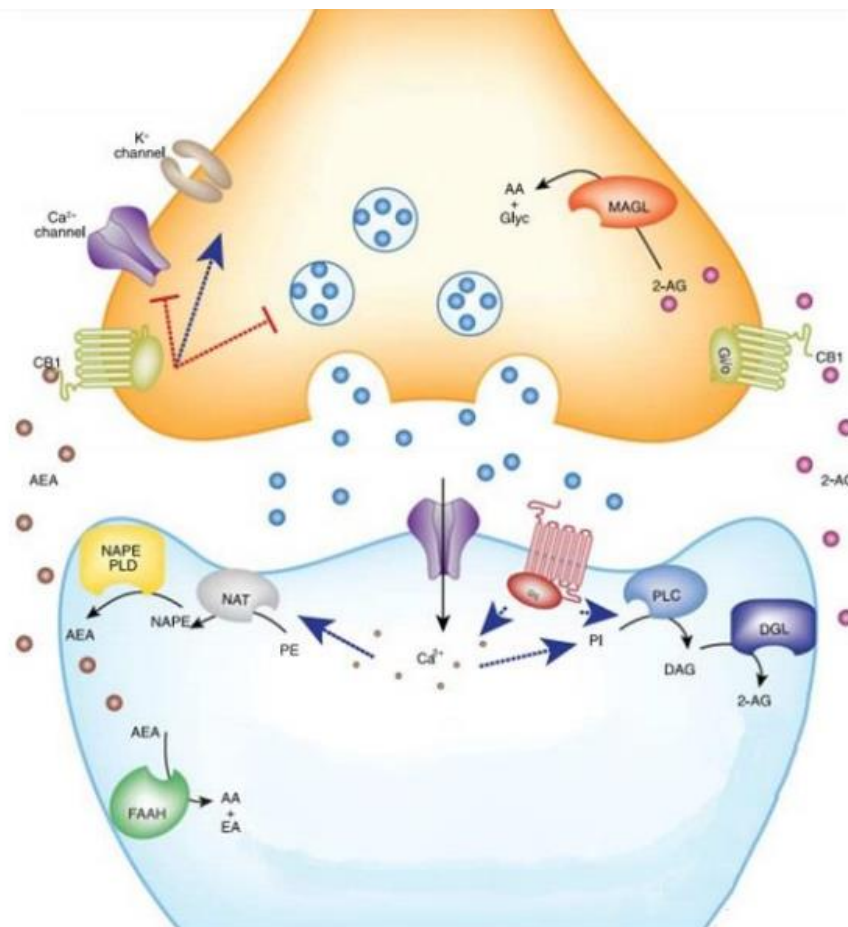
primeiros endocanabinóides identificados foram o araquidonoil etanolamida, também conhecido como anandamida (DEVANE et al., 1992), e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (MECHOULAM; PARKER, 2013; SUGIURA et al., 1995) (Figura 2, (adaptado de: Di Marzo et al.,1998). Apesar do relato de outros endocanabinóides (para revisão ler: (HOWLETT et al., 2002a; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006), estudos sobre a biossíntese, transporte celular, metabolismo e ações fisiológicas tem focado na anandamida e 2-AG (MECHOULAM; PARKER, 2013; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006).



**Figura 2 - Ligantes endógenos dos endocanabinóide**

No sistema nervoso central, a anandamida e o 2-AG são sintetizados “sob demanda” através da clivagem de fosfolipídios de membrana em neurônios pós-sinápticos (BISOGLNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006). A síntese de 2-AG ocorre a partir da formação de diacilglicerol, no qual é convertido em 2-AG pela enzima diacilglicerol-lipase (BISOGLNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005; LIGRESTI; CASCIO; DI MARZO, 2005). O mecanismo de síntese da anandamida no sistema nervoso central ainda não é completamente compreendido (LUTZ et al., 2015; MORENA et al., 2016). Os endocanabinóides agem como mensageiros retrógrados ao ativar o receptor CB<sub>1</sub> em terminais pré-sinápticos (HOWLETT et al., 2004; KATONA; FREUND, 2012; MECHOULAM; PARKER, 2013). Esse receptor é amplamente expresso por todo o sistema nervoso central (HERKENHAM et al., 1990; HOWLETT et al., 2004; TSOU et al., 1998). O receptor CB<sub>1</sub> é um receptor metabotrópico (isto é, está acoplado a proteína G - GPCRs) que possui uma ação inibitória através da inibição da atividade da enzima adenilato-ciclase, o que reduz a produção de adenosina monofostato cíclico (AMPC) (HOWLETT et al., 2002b). Através de um mecanismo dependente da MAPK (do inglês - *mitogen-activated protein kinases*)

a ativação do receptor CB<sub>1</sub> resulta em inibição dos canais de cálcio voltagem-dependentes e efluxo de potássio, o que hiperpolariza a célula resultando em redução na liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios (ELPHICK; EGERTOVA, 2001; FRANCISCHETTI; DE ABREU, 2006; KANO et al., 2009; MACKIE, 2006). Foi também identificado um segundo receptor ativado pelos endocanabinóides, designado como CB<sub>2</sub>, no qual foi inicialmente descrito como um receptor predominantemente periférico e expresso em componentes do sistema imune (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Estudos posteriores identificaram a expressão do receptor CB<sub>2</sub> em neurônios no encéfalo (SICKLE et al., 2014), porém o papel desse receptor no sistema nervoso central ainda é pouco compreendido (MECHOULAM; PARKER, 2013; MORENA et al., 2016). Os endocanabinóides são rapidamente recaptados da fenda sináptica através de mecanismos de transporte ainda pouco compreendidos (MECHOULAM; PARKER, 2013; MORENA et al., 2016). No neurônio, a anandamida é hidrolisada pela enzima ácido graxo amido hidrolase (do inglês - *fatty acid amide hydrolase*, FAAH), ao passo que o 2-AG é hidrolisado pela enzima monoacilglicerol-lipase (do inglês *monoacyl glycerol lipase*, MAGL) (DINH et al., 2002; MCKINNEY; CRAVATT, 2005). (Figura 3).



**Figura 3 - Representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide retrógrada.**

Após a liberação do neurotransmissor (por exemplo, glutamato), a despolarização pós-sináptica causa aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por meio da ativação de receptores NMDA e/ou receptores acoplados a Gq (por exemplo, mGluR1/5) e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. A elevação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta a biossíntese de endocanabinóides. Este modelo ilustra as duas vias biossintéticas primárias para anandamida e 2-araquidonoil glicerol, respectivamente. A AEA é sintetizada a partir de precursores de fosfolípidios (por exemplo, fosfatidiletanolamina) por uma transacilase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , N-aciltransferase, produzindo N-araquidonoil fosfatidiletanolamina. NAPE é então hidrolisado por uma fosfolipase D (NAPe-PLD) para produzir AEA. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou a ativação de receptores acoplados a Gq estimulam a fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol em diacilglicerol. O DAG é convertido em 2-AG pela diacilglicerol lipase. AEA e 2-AG, então, migram dos neurônios pós-sinápticos para se ligar aos receptores canabinóides do tipo 1 ( $\text{CB}_1$ ) localizados no terminal pré-sináptico. Uma vez ativados, os receptores  $\text{CB}_1$  se acoplam por meio das proteínas Gi/o para inibir a adenilil ciclase e regular os canais de íons e, por fim, suprimir a liberação de neurotransmissores. A sinalização endocanabinóide é então terminada pela degradação de enzimas. O AEA é principalmente hidrolisado em ácido araquidônico e etanolamina pela enzima de ácido graxo amido hidrolase, localizada pós-sinápticamente. 2-AG é hidrolisado pré-sinápticamente em AA e glicerol pela monoacilglicerol lipase. Legenda: ( $\text{Ca}^{2+}$ ) cálcio, ( $\text{K}^+$ ) potássio, (channel) canal, (Gq) receptor acoplado a proteína Gq, (Gi/o) receptor acoplado a proteína Gi/o, ( $\text{CB}_1$ ) receptor de endocanabinóides, (PI) fosfatidilinositol, (PLC) fosfolipase C, (DAG) diacilglicerol, (DGL) diacilglicerol lipase, (2-AG) 2-araquidonoil glicerol, (PE) fosfatidiletanolamina, (NAT) N-aciltransferase, (NAPE) N-araquidonoil fosfatidiletanolamina, (NAPe-PLD) N-araquidonoil fosfatidiletanolamina fosfolipase D, (AEA) anandamida, (FAAH) ácido graxo amino hidrolase, (AA) ácido araquidônico, (EA) etanolamina, (MAGL) monoacilglicerol lipase, (Glyc) glicerol. (adaptado de: Morena et al., 2016).

Foi identificada a expressão do receptor CB<sub>1</sub> no NLET (MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993; TSOU et al., 1998), e evidências mais recentes demonstraram sua localização em terminais glutamatérgicos e GABAérgicos no NLET (PUENTE et al., 2010). Com relação ao envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nas respostas ao estresse, foi inicialmente reportado que o tratamento sistêmico com um antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) aumentou a ativação neuronal no NLET induzida por um estímulo aversivo (NEWSOM et al., 2012, 2020), o que sugeriu a ativação desse mecanismo de neurotransmissão no NLET durante situações aversivas. Nesse sentido, dados prévios do nosso grupo demonstraram que a microinjeção no NLET de um antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) aumentou de maneira dose-dependente a resposta de taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição agudo, porém sem interferir com as respostas de aumento da pressão arterial média e de vasoconstrição cutânea (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). De maneira contrária, o aumento nos níveis locais de anandamida ou 2-AG no NLET (causado pelo tratamento local com inibidores seletivos da FAAH e da MAGL, respectivamente) reduziram a resposta de taquicardia ao estresse de restrição agudo, e esses efeitos foram abolidos pelo pré-tratamento local com o antagonista seletivo CB<sub>1</sub> (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Esses resultados forneceram evidências de uma influência inibitória da formação local de endocanabinóides no NLET na resposta de taquicardia durante situações aversivas.

Diante desses aspectos introdutórios descritos até o momento, na presente tese foram investigados os mecanismos locais e as vias neurais no encéfalo relacionadas com o controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET. Nós também avaliamos o papel de receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET nas respostas comportamentais de ansiedade inata e resposta ansiogênica ao estresse de restrição agudo. A fundamentação, descrição e discussão de cada protocolo foram organizados em capítulos, que são apresentados abaixo.

## CAPÍTULO 1

---

Receptor endocanabinóide (CB<sub>1</sub>) no núcleo leito da estria terminal modula as respostas cardiovasculares ao estresse via sinalização local receptor NMDA/nNOS/GCs/proteína quinase G.

## **CAPÍTULO 1**

### **1. INTRODUÇÃO**

Como mencionado acima, foi identificada a expressão do receptor CB<sub>1</sub> em terminais glutamatérgicos e GABAérgicos no NLET (PUENTE et al., 2010). Nesse sentido, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a ativação do receptor CB<sub>1</sub> no NLET inibe transmissões sinápticas excitatórias e inibitórias locais (BEDSE et al., 2019; GLANGETAS et al., 2013; LANGE et al., 2017; MASSI et al., 2008; PUENTE et al., 2010). Conseqüentemente, alguns estudos apontaram um envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide local no controle NLET das respostas ao estresse (BEDSE et al., 2019).

Conforme relatado anteriormente, o tratamento sistêmico com um antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> aumentou a ativação neuronal no NLET induzida pelo estresse (NEWSOM et al., 2012), o que sugere que a neurotransmissão endocanabinóide no NLET durante o estresse atua predominantemente inibindo sinapses excitatórias locais. Nesse sentido, foi relatada que a ativação de neurônios no NLET pela neurotransmissão glutamatérgica local atuando através do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) tem uma ação facilitatória sobre as respostas cardiovasculares a diferentes estressores, incluindo o estresse de restrição (ADAMI et al., 2017; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018a; HOTT et al., 2017). Desse modo, os resultados apresentados acima suportam a hipótese de que a influência inibitória da neurotransmissão endocanabinóide no NLET na resposta taquicárdica ao estresse por restrição agudo seja mediada pela inibição da neurotransmissão glutamatérgica local.

A ativação do receptor de glutamato NMDA é o mecanismo mais bem caracterizado para a ativação da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) no cérebro (CHACHLAKI; PREVOT, 2019; GARTHWAITE, 2008, 2019). O óxido nítrico (do inglês, NO) age no sistema nervoso central como uma molécula de sinalização, e é considerado um neurotransmissor atípico (GARTHWAITE, 2008; ZHOU; ZHU, 2009). Garthwaite e colaboradores (1988) demonstraram que a ativação do receptor glutamatérgico NMDA em neurônios pós-sinápticos resulta na formação de NO através de um mecanismo dependente de Ca<sup>+2</sup>. Deste modo, uma das formas de síntese de NO no sistema

nervoso central envolve a ativação do receptor NMDA e consequente aumento nas concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$ , o que acarreta a ativação da nNOS (GARTHWAITE, 2008). O NO possui diversas vias de sinalização, sendo que a principal envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (GARTHWAITE, 2008). Apesar do relato de outras vias de sinalização (CRAVEN; ZAGOTTA, 2006; RYBALKIN et al., 2003), a ativação da proteína quinase G é um importante mecanismo efetor do GMPc (GARTHWAITE, 2008; HOFMANN et al., 2006).

Nós observamos que a microinjeção do agonista glutamatérgico NMDA no NLET facilitou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo, e esse efeito foi inibido após o pré-tratamento com um inibidor seletivo da nNOS (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018b). Esse resultado sugere uma interação entre as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET. No entanto, embora relatos de interação entre neurotransmissões endocanabinóides e glutamatérgicas no NLET (BEDSE et al., 2019; GLANGETAS et al., 2013; MASSI et al., 2008; PUENTE et al., 2010), uma possível inibição da neurotransmissão glutamatérgica pela sinalização endocanabinóide no NLET pode também estar relacionada com uma modulação da neurotransmissão nitrérgica local. Entretanto, uma possível interação entre as neurotransmissões endocanabinóide e nitrérgica no NLET nunca foi investigada. Então, a nossa hipótese nesse primeiro estudo foi que a influência inibitória do receptor endocanabinóide  $\text{CB}_1$  no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo é mediada pela inibição da via de sinalização receptor glutamatérgico NMDA/nNOS/GCs/proteína quinase G no NLET.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA e da via de sinalização do NO no controle das respostas cardiovasculares observadas durante o estresse de restrição agudo pelo receptor endocanabinóide  $\text{CB}_1$  no NLET de ratos.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal variando entre 240-260g (60 dias). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu-SP). Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água e foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (protocolo # 61/2015).

#### **3.2. Implante de cânulas guias no NLET**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, intraperitoneal). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA), e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos and Watson (1997), e foram como segue:

- Ântero-posterior: +7,8 mm em relação à interaural;
- Lateral: +4 mm a partir da linha média;
- Vertical: -5,8 mm em relação ao osso;

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foi feito um orifício no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23 gauge) com 13 mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) e



pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula, evitando a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

### **3.3. Canulação da artéria femoral**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, intraperitoneal), e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. Este vaso foi dissecado e um cateter de polietileno foi introduzido até a artéria aorta abdominal inferior. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, EUA), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após implantação do cateter, o mesmo foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) por via subcutânea para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

### **3.4. Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca**

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50 (Clay Adams, EUA). A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Austrália), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média

(PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir do sinal de pressão arterial pulsátil.

### **3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda**

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi realizada através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor (BUSNARDO et al., 2013a; VIANNA; CARRIVE, 2005). Para a análise das imagens, a medida de temperatura foi realizada em cinco pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (BUSNARDO et al., 2013a; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2016).

### **3.6. Drogas e soluções utilizadas**

O AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>), ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel) e o KT5823 (inibidor da proteína quinase G) (Tocris, EUA) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%) contendo 20% de DMSO (DMSO 20%). O LY235959 (antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA) (Tocris, EUA), o N-propil-L-arginina (NPLA) (inibidor seletivo da nNOS), o tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fountora-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

### **3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central**

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para a microinjeção das drogas no NLET foram um mm mais longa do que as cânulas guias fixadas ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µL (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10) (Clay Adams, EUA). As drogas foram injetadas no volume de 100nL/lado no NLET (CRESTANI et al., 2009b; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016; RESSTEL et al., 2008).

### **3.8. Estresse por restrição agudo**

O estresse por restrição agudo consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo). No presente estudo, os animais foram mantidos por um período de 60 minutos no tubo de restrição (CRESTANI et al., 2009b; DEOLINDO et al., 2013; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação (BENINI et al., 2019, 2020)

### **3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no NLET**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.), e 100nL do corante azul de Evan (1%) foram microinjetados bilateralmente para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os encéfalos foram removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40µm de espessura para análise dos sítios de injeção, de acordo com Atlas de (PAXINOS; WATSON, 1997).

### **3.10. Quantificação dos níveis de metabólitos do NO**

Os animais foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos removidos. Microdissecções do NLET foram obtidas usando uma agulha de ponta chata de 14 Gauge a partir de secção coronal da região do NLET obtida em um criostato (-20°C) (CM1900, Leica, Alemanha). As amostras foram obtidas a partir das coordenadas +0,2mm a -0,92 mm em relação ao bregma, de acordo com parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997). Após a dissecação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

A quantificação dos níveis de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> (NO<sub>x</sub>) (produtos provenientes da oxidação espontânea do NO) foi utilizada como medida indireta da produção de NO no NLET. Para tanto, as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7.6; NaCl 137mM, 10% glicerol) complementado com inibidores de proteases e fosfatases. As amostras foram incubadas (na proporção de 1:1, v/v) overnight a 37°C na presença de nitrato redutase (#N7265,

Sigma-Aldrich) e NADPH (#33461, Sigma-Aldrich) (0,4U/ml e 1mg/ml, respectivamente, diluídos em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M pH7,5) para a conversão do NO<sub>3</sub> em NO<sub>2</sub>. Posteriormente, o NO<sub>2</sub> presente nas amostras foi quantificado através da incubação com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida com 5% de ácido fosfórico em água destilada + 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina em água destilada, v / v). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância foi lida em 540nm, e os níveis de NO<sub>2</sub> foram calculados a partir de curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (SigmaAldrich, EUA), e corrigidos em função da quantidade de proteínas totais presente na amostra. O conteúdo total de proteínas foi determinado utilizando um kit BioRad® (DC® protein assay). Todas as medidas foram realizadas em duplicata, e os resultados foram expressos como µM NO<sub>x</sub>/µg proteína.

### **3.11. Análise estatística**

Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). Os níveis de NO<sub>x</sub> no NLET e os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA) monofatorial. As alterações de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda ao longo do tempo foram analisadas utilizando (ANOVA) bifatorial, sendo o tratamento como fator principal e o tempo como medida repetida. Os resultados estatísticos com P<0,05 foram considerados significativos.

## **4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

### **4.1. Efeito da microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET sobre os níveis de NO<sub>x</sub> durante o estresse de restrição agudo**

Esse protocolo teve o objetivo de investigar se o antagonismo do receptor CB<sub>1</sub> ativa o mecanismo de sinalização receptor NMDA/NO no NLET durante o estresse de restrição agudo, resultando no aumento na formação local de NO. Para tanto, os animais foram tratados com veículo (DMSO 20%, 100nL) ou AM251 (30 e 100 pmol/100nL) no NLET, e 10 minutos após foram submetidos a uma sessão de 60 minutos do estresse por restrição agudo. Imediatamente após

término da sessão de estresse, os animais foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram removidos e estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuro processamento. O NLET de todos os animais foi coletado por microdissecção para quantificação dos níveis de  $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_3$  ( $\text{NO}_x$ ), que foi utilizado como uma medida indireta de produção local de NO (para detalhes, ver item 3.10, Capítulo 1).

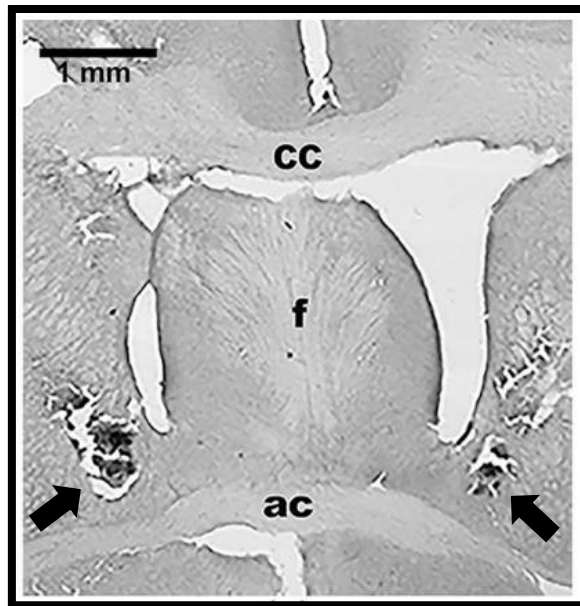
#### **4.2. Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo pelo receptor $\text{CB}_1$ no NLET**

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento da via sinalização local receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo pelo receptor endocanabinóide  $\text{CB}_1$  no NLET. Para tanto, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET, e mantidos em recuperação por no mínimo 3 dias. O experimento foi realizado 24 h após a implantação de um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. No dia do experimento, os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições da sala. Após este período, foi realizado um registro de 30 minutos para determinação dos valores basais de PA e FC. Após esse período, os animais foram tratados no NLET com veículo (salina ou DMSO, 100nl), LY235959 (antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, 0,5nmol/100nl), NPLA (inibidor seletivo da nNOS, 0,2nmol/100nl), ODQ (inibidor da enzima GCs, 0,5nmol/100nl) ou KT5823 (inibidor da PKG, 0,01 nmol/100nl) no NLET (ALVES et al., 2009; BUSNARDO et al., 2010; CHAN et al., 2005). Cinco minutos após, foi microinjetado veículo (DMSO 20%, 100nL) ou AM251 (100 pmol/100nL) no NLET (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Cinco minutos após o segundo tratamento farmacológico do NLET, os animais foram expostos a uma sessão de 60 minutos de estresse por restrição agudo (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Os registros de PA e FC foram realizados durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 min antes da restrição para os valores basais, e

nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos durante a restrição como uma medida indireta de vasoconstrição cutânea (BUSNARDO et al., 2013a; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016).

## **5. RESULTADOS**

A figura 4 mostra uma fotomicrografia de um corte coronal histológico ilustrando o sítio de injeção no NLET.

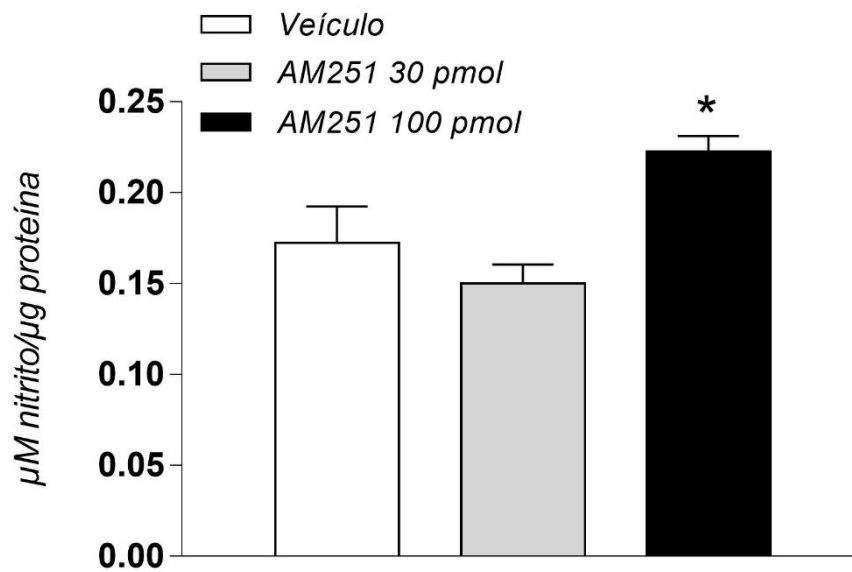


**Figura 4 - Corte histológico referente a microinjeção no NLET.** Fotomicrografia de um corte coronal histológico do encéfalo de um animal representativo ilustrando os sítios de microinjeção no NLET. As setas vermelhas representam o a microinjeção no NLET. ac: comissura anterior; cc: corpo caloso; f: fórnix.

### **5.1. Efeitos da microinjeção de AM251 no NLET sobre os níveis locais de NOx durante o estresse agudo de restrição**

A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> AM251 (30 e 100 pmol/100nL) no NLET alterou os níveis locais de NOx após a exposição ao estresse de restrição agudo ( $F_{(2,28)} = 7,222$ ,  $p < 0,003$ ) (Figura 5). A análise post-hoc revelou que o AM251 na dose de 100 pmol ( $p < 0,03$ ), mas não na dose de 30 pmol ( $p > 0,05$ ), aumentou os níveis de NOx no NLET durante o estresse de restrição (Figura 5).





**Figura 5 - Níveis de nitrito no NLET.** Níveis de NOx no núcleo do leito da estria terminal após exposição a uma sessão de 60 minutos de estresse por restrição em animais que receberam microinjeção bilateral do veículo (solução salina contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO), 100 nL, n=10) ou AM251 (30 pmol/100 nL, n=11; ou 100 pmol /100 nL, n=10) no NLET. As colunas representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). \* $p < 0,05$  versus grupo veículo, análise de variância ANOVA unidirecional seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni.

## 5.2. Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET

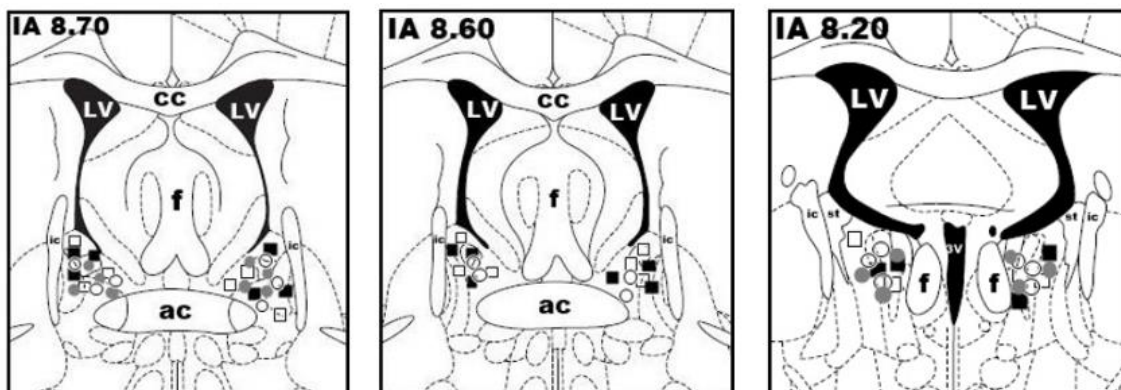
**Receptor NMDA.** As microinjeções bilaterais do antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA LY235959 (0,5 nmol/100 nL) e/ou AM251 (100 pmol/100 nL) no NLET não afetou os valores basais da FC ou da temperatura da pele da cauda (Tabela 1). A ANOVA monofatorial indicou efeito dos tratamentos farmacológicos na PAM, mas a análise post-hoc não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1). Entretanto, o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM (tempo:  $F_{(35,945)} = 40$ ,  $p < 0,0001$ ) e da FC (tempo:  $F_{(35,945)} = 20$ ,  $p < 0,0001$ ) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(6,162)} = 59$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 7). Além disso, a análise ANOVA bifatorial indicou efeito dos tratamentos farmacológicos do NLET na FC ( $F_{(3,27)} = 5$ ,  $p < 0,01$ ) e na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,27)} = 4$ ,  $p < 0,03$ ), mas não na PAM ( $F_{(3,27)} = 1$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 7). A ANOVA bifatorial também indicou uma interação tempo  $\times$  tratamento na PAM ( $F_{(105,945)} = 2$ ,  $p < 0,0002$ ), FC ( $F_{(105,945)} = 2$ ,  $p < 0,0001$ ) e na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(18,162)} = 3$ ,  $p < 0,0002$ ) (Figura 7).

A análise post-hoc revelou que o tratamento do NLET com AM251 (grupo SAL+AM251) facilitou a taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição agudo ( $p < 0,006$ ), e esse efeito foi inibido pelo pré-tratamento local com LY235959 (grupo LY+AM251) ( $p > 0,05$ ) (Figura 7). A Figura 6 apresenta representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.

**Tabela 1** - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de temperatura cutânea da cauda (T°C) após os tratamentos farmacológicos no núcleo do leito da estria terminal (NLET).

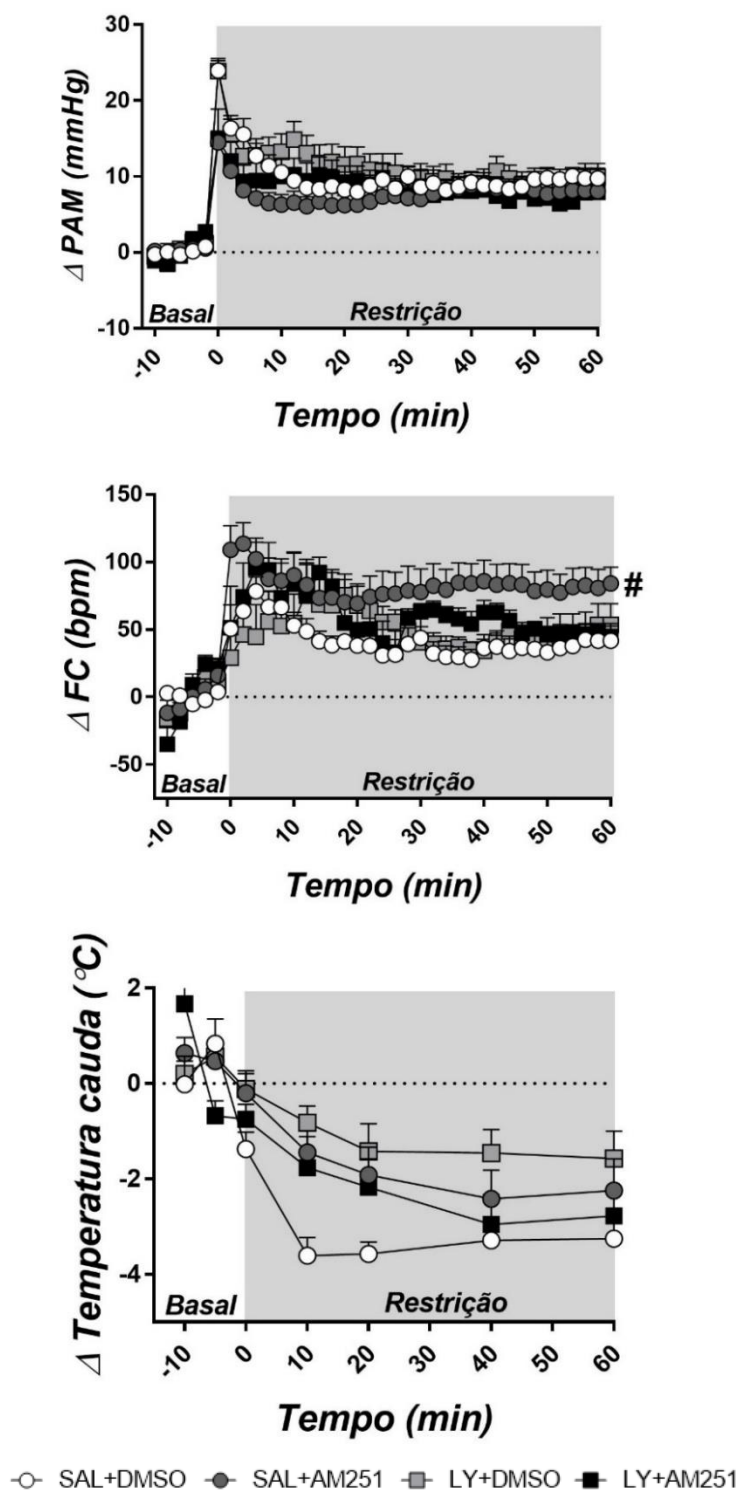
<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>PAM (mmHg)</b>	<b>FC (bpm)</b>	<b>T(°C)</b>
<b>SAL+DMSO</b>	8	100±2	363±9	28,3±0.3
<b>SAL+AM251</b>	8	100±1	338±10	29,4±0.4
<b>LY235959+DMSO</b>	8	99±2	366±11	29,1±0.5
<b>LY235959+AM251</b>	7	108±2	380±13	30,5±0.5
		$F_{(3,27)}=3,4$	$F_{(3,27)}=2,4$	$F_{(3,27)}=2,2$
		$P<0,03$	$P>0.05$	$P>0.05$
<b>SAL+DMSO</b>	8	100±2	363±9	28,3±0.3
<b>SAL+AM251</b>	8	100±1	338±10	29,4±0.4
<b>NPLA+DMSO</b>	8	109±3	373±13	29,5±0.3
<b>NPLA+AM251</b>	7	104±3	392±7	28,2±0.2
		$F_{(3,27)}=2,8$	$F_{(3,27)}=3,3$	$F_{(3,27)}=3,4$
		$P>0.05$	$P<0,03$	$P<0,02$
<b>DMSO+DMSO</b>	6	104±5	404±15	30,0±0.2
<b>DMSO+AM251</b>	6	114±2	403±15	29,3±0.4
<b>ODQ+DMSO</b>	8	106±2	378±7	29,5±0.5
<b>ODQ+AM251</b>	6	103±2	386±6	29,1±0.4
		$F_{(3,22)}=2,2$	$F_{(3,22)}=1,5$	$F_{(3,22)}=0,6$
		$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$
<b>DMSO+DMSO</b>	6	104±5	404±15	30,0±0.2
<b>DMSO+AM251</b>	6	114±2	403±15	29,3±0.4
<b>KT5823+DMSO</b>	6	109±2	388±17	30,4±0.5
<b>KT5823+AM251</b>	6	105±3	376±5	28,8±0.4
		$F_{(3,20)}=1,6$	$F_{(3,20)}=1,3$	$F_{(3,20)}=2,7$
		$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$

mmHg: milímetros de mercúrio, bpm: batimentos por minuto; DMSO: dimethyl sulfoxide; NPLA: N $\omega$ -propyl-L-arginine hydrochloride; ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; SAL: salina. Os dados foram expressos como erro  $\pm$  erro padrão da média (EPM). ANOVA monofatorial.



**Figura 6 - Representação diagramática nos grupos referentes ao receptor NMDA**, baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET dos grupos SALINA+DMSO (quadrados brancos), SALINA+AM251 (quadrados pretos) LY235959+DMSO (círculos brancos) e LY235959+AM251 (círculos cinza). IA - coordenada interaural; ac - comissura anterior, cc - corpo caloso, f - fórnix, ic - cápsula interna, LV - ventrículo lateral, st - estria terminal, 3V terceiro ventrículo.

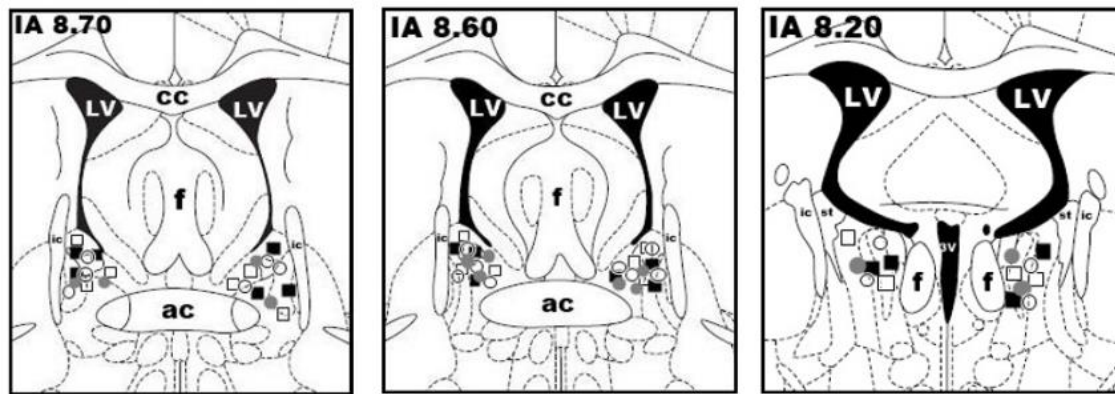
## receptor glutamatérgico NMDA



**Figura 7 - Curvas temporais dos grupos referentes ao receptor NMDA**, Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com LY235959 (antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA, 0,5nmol/100nl) e/ou AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, 100pmol/100nl) no NLET. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação com o grupo controle (Sal+DMSO), ANOVA acompanhado pelo post-hoc de Bonferroni.

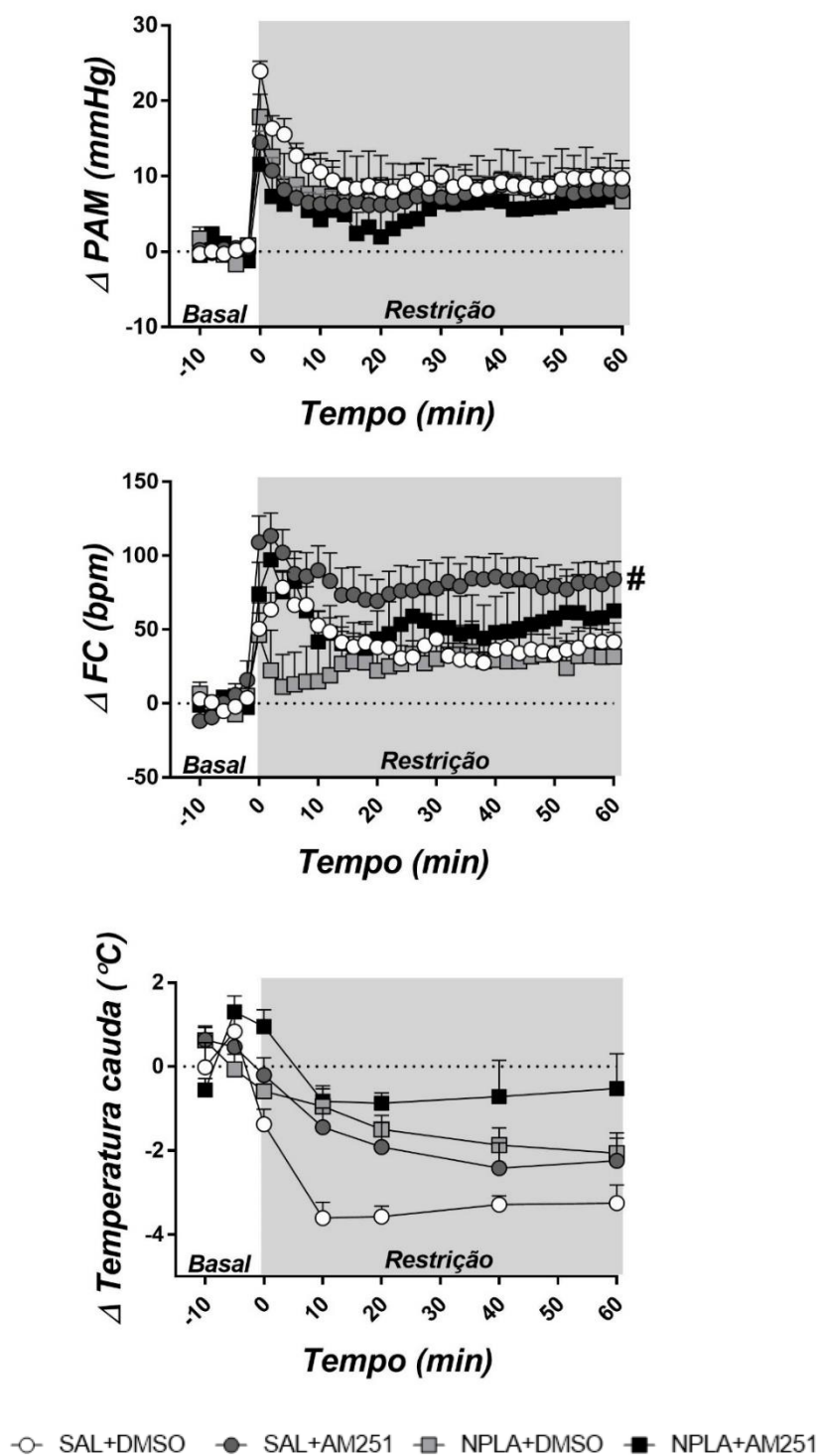
**nNOS.** As microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da nNOS NPLA (0,2 nmol/100 nL) e/ou AM251 (100 pmol/100 nL) no NLET não alterou os valores basais da PAM (Tabela 1). A ANOVA monofatorial indicou efeito de tratamentos farmacológicos na FC e na temperatura cutânea da cauda, mas a análise post-hoc não revelou diferença significativa entre os grupos experimentais nesses parâmetros (FC:  $p > 0,05$ ; temperatura cutânea da cauda:  $p > 0,05$ ) (Tabela 1). Entretanto o estresse de restrição agudo causou aumento da PAM (tempo:  $F_{(35,945)} = 420$ ,  $p < 0,0001$ ) e da FC (tempo:  $F_{(35,945)} = 15$ ,  $p < 0,0001$ ) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(6,162)} = 48$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 9). Além disso, a análise ANOVA bifatorial indicou efeito dos tratamentos farmacológicos do NLET na FC ( $F_{(3,27)} = 4$ ,  $p < 0,03$ ) e na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,27)} = 3,8$ ,  $p < 0,02$ ), mas não na PAM ( $F_{(3,27)} = 0,6$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 9). A ANOVA bifatorial também indicou uma interação tempo  $\times$  tratamento na FC ( $F_{(105,945)} = 1,5$ ,  $p < 0,0004$ ) e na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(18,162)} = 3$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não na PAM ( $F_{(105,945)} = 0,9$ ,  $p > 0,05$ ), (Figura 9).

A análise post-hoc revelou que o tratamento NLET com AM251 (grupo SAL+AM251) facilitou a taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição ( $p < 0,05$ ), e esse efeito foi inibido pelo pré-tratamento local com NPLA (grupo NPLA+AM251) ( $p > 0,05$ ) (Figura 9). A Figura 8 apresenta representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.



**Figura 8 - Representação diagramática nos grupos referentes ao inibidor da nNOS,** baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET dos grupos SALINA+DMSO (quadrados brancos), SALINA+AM251 (quadrados pretos) NPLA+DMSO (círculos brancos) e NPLA+AM251 (círculos cinza). IA - coordenada interaural; ac - comissura anterior, cc - corpo caloso, f - fórnix, ic - cápsula interna, LV - ventrículo lateral, st - estria terminal, 3V terceiro ventrículo.

## nNOS

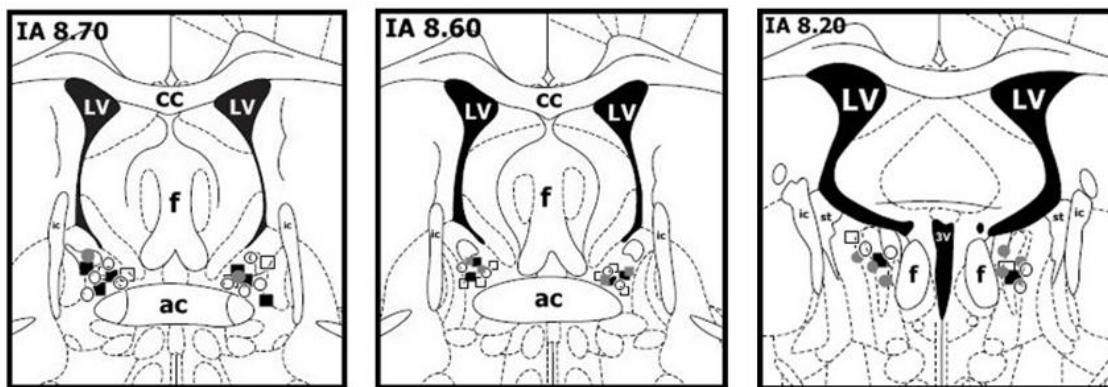


**Figura 9 - Curvas temporais dos grupos referentes ao inibidor da nNOS.** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ), frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com NPLA (inibidor seletivo da nNOS, 0,2nmol/100nl) e/ou com AM251 (antagonista seletivo do receptor  $CB_1$ , 100pmol/100nl) no NLET. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM. #  $P < 0,05$  ao longo de todo o período de restrição em comparação com o grupo controle (Sal+DMSO), ANOVA seguido pelo post-hoc de Bonferroni.



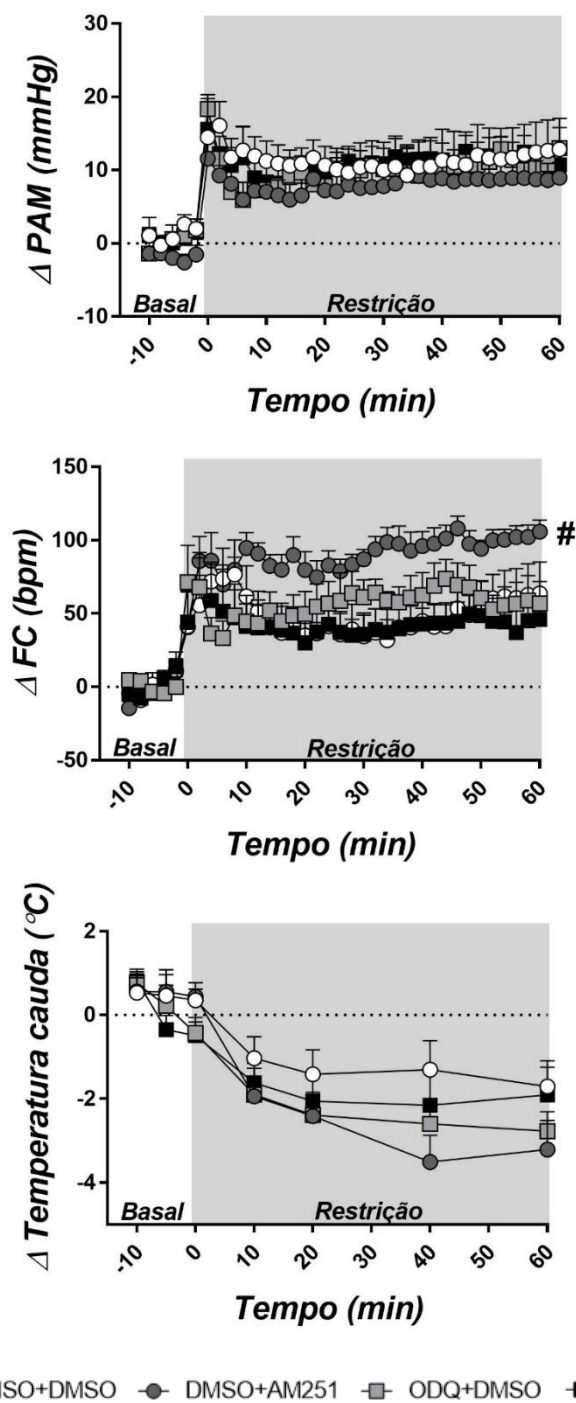
**GCs.** As microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da GCs ODQ (0,5 nmol/100 nL) e/ou AM251 (100 pmol/100 nL) no NLET não afetou os valores basais de PAM, FC ou da temperatura da pele da cauda (Tabela 1). Entretanto o estresse de restrição causou aumento da PAM (tempo:  $F_{(35,770)} = 27$ ,  $p < 0,0001$ ) e da FC (tempo:  $F_{(35,770)} = 17$ ,  $p < 0,0001$ ) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(6,132)} = 48$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 11). Além disso, a análise ANOVA bifatorial indicou efeito dos tratamentos farmacológicos do NLET na FC ( $F_{(3,22)}=4$ ,  $p < 0,01$ ), mas sem afetar a PAM ( $F_{(3,22)} = 0,5$ ,  $p > 0,05$ ) e a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,22)}= 1$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 11). A ANOVA bifatorial também indicou uma interação tempo x tratamento na FC ( $F_{(105,770)}=1,4$ ,  $p < 0,0007$ ) e na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(18,132)}=1,8$ ,  $p < 0,03$ ), mas não na PAM ( $F_{(105,770)}=0,6$ ,  $p > 0,05$ ), (Figura 11).

A análise post-hoc revelou que o tratamento do NLET com AM251 (grupo DMSO+AM251) facilitou a taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição ( $p < 0,02$ ), e esse efeito foi inibido pelo pré-tratamento local com ODQ (grupo ODQ+AM251) ( $p > 0,05$ ) (Figura 11). A Figura 10 apresenta a representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.



**Figura 10 - Representação diagramática nos grupos referentes ao inibidor da GCs, baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET dos grupos DMSO+DMSO (quadrados brancos), DMSO+AM251 (quadrados pretos) LY235959+DMSO (círculos brancos) e LY235959+AM251 (círculos cinza). IA - coordenada interaural; ac - comissura anterior, cc - corpo caloso, f - fórnix, ic - cápsula interna, LV - ventrículo lateral, st - estria terminal, 3V terceiro ventrículo.**

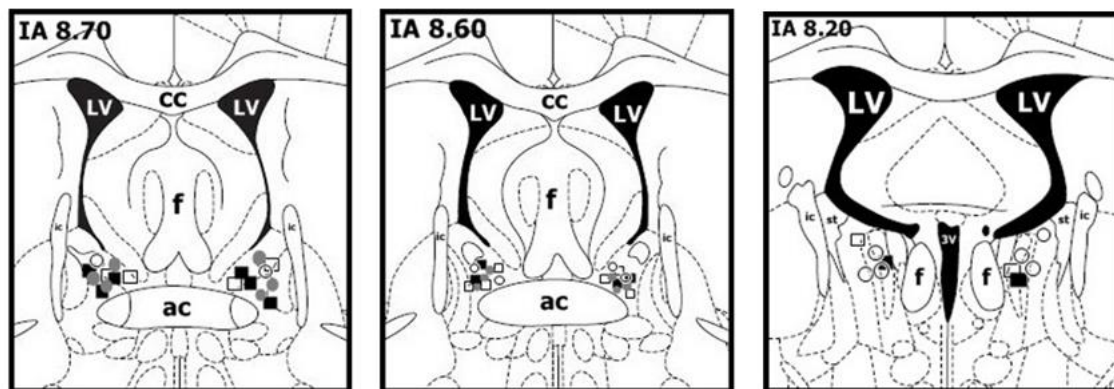
### Guanilato ciclase solúvel



**Figura 11 - Curvas temporais dos grupos referentes ao inibidor da GCs.** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel-GCs, 0,5nmol/100nl) e/ou AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, 100pmol/100nl) no NLET. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação com o grupo controle (DMSO+DMSO), ANOVA bifatorial acompanhado pelo post-hoc de Bonferroni.

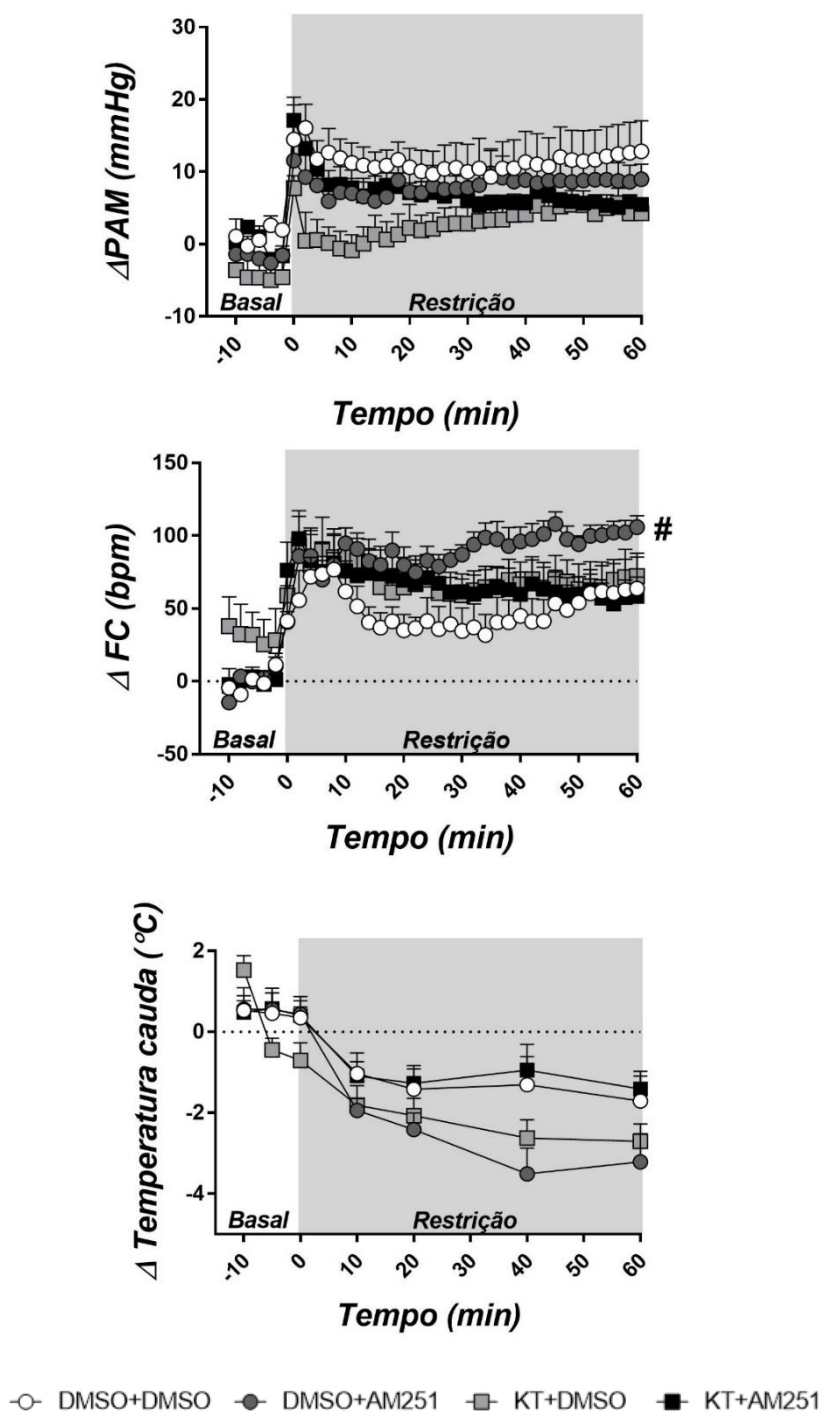
**PKG.** As microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da PKG KT5823 (0,01 nmol/100 nL) e/ou AM251 (100 pmol/100 nL) no NLET não afetou os valores basais da PAM, FC ou temperatura da pele da cauda (Tabela 1). Entretanto, o estresse de restrição causou aumento da PAM (tempo:  $F_{(35,700)} = 18$ ,  $p < 0,0001$ ) e da FC (tempo:  $F_{(35,700)} = 20$ ,  $p < 0,0001$ ), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(6,120)} = 54$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 13). Além disso, a análise ANOVA bifatorial indicou efeito dos tratamentos farmacológicos do NLET na FC ( $F_{(3,20)} = 3$ ,  $p < 0,05$ ), mas sem afetar a PAM ( $F_{(3,20)} = 2$ ,  $p > 0,05$ ) e a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,20)} = 2$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 13). A ANOVA bifatorial também indicou uma interação tempo  $\times$  tratamento na FC ( $F_{(105,700)} = 1,5$ ,  $p < 0,0005$ ) e na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(18,120)} = 2,8$ ,  $p < 0,0007$ ), mas não na PAM ( $F_{(105,700)} = 1,1$ ,  $p > 0,05$ ), (Figura 13).

A análise post-hoc revelou que o tratamento NLET com AM251 (grupo DMSO+AM251) facilitou a taquicardia desencadeada pelo o estresse de restrição ( $p < 0,03$ ), e esse efeito foi inibido pelo pré-tratamento local com KT5823 (grupo KT5823+AM251) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8). A Figura 12 é a representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.



**Figura 12 - Representação diagramática nos grupos referentes ao inibidor da PKG,** baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET dos grupos DMSO+DMSO (quadrados brancos), DMSO+AM251 (quadrados pretos) KT5823+DMSO (círculos brancos) e KT5823+AM251 (círculos cinza). IA - coordenada interaural; ac -comissura anterior, cc - corpo caloso, f - fórnix, ic - cápsula interna, LV - ventrículo lateral, st - estria terminal, 3V terceiro ventrículo.

### Proteína quinase G



**Figura 13 - Curvas temporais dos grupos referentes ao inibidor da PKG.** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura cauda) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com KT5823 (inibidor da proteína quinase G-PKG, 0,01nmol/100nl) e/ou AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, 100pmol/100nl) no NLET. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média $\pm$ EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação com o grupo controle (DMSO+DMSO), ANOVA bifatorial acompanhado pelo post-hoc de Bonferroni.

## **6. DISCUSSÃO**

O presente estudo fornece a primeira evidência de interação entre o receptor endocanabinóide CB<sub>1</sub> e a neurotransmissão e nitrérgica no NLET. Além disso, os dados reportados aqui são os primeiros a indicar que a modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo receptor endocanabinóide CB<sub>1</sub> no NLET é mediado por uma interação com as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica locais. De fato, nós observamos que a microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET aumentou a formação local de NO durante o estresse de restrição, como evidenciado através do aumento dos níveis de NO<sub>x</sub> no NLET. Além disso, o tratamento local do NLET com o antagonista seletivo do receptor NMDA, bem como com os inibidores da nNOS, GCs ou PKG; aboliram completamente a facilitação da resposta taquicárdica observadas em consequência da microinjeção do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET.

O receptor CB<sub>1</sub> é amplamente expresso em todo o sistema nervoso central (HERKENHAM et al., 1990; HOWLETT et al., 2004; TSOU et al., 1998), inclusive no NLET (MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993; TSOU et al., 1998). Evidências demonstraram sua localização na porção anterior do NLET (PUENTE et al., 2010; TSOU et al., 1998). De fato, o NLET anterior possui projeções diretas para regiões do hipotálamo e do tronco cerebral envolvidos no controle autônomo (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; DONG; SWANSON, 2004). Neste trabalho os tratamentos farmacológicos foram realizados na porção anterior do NLET. Vale ressaltar que a parte rostral do NLET está envolvida com o controle das respostas cardiovasculares (RODER; CIRIELLO, 1993; ZHANG; JULIEN; BARRÈS, 1996). Nesse sentido, nossos achados corroboram com achados que a porção anterior do NLET atua no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (GOMES-DE-SOUZA et al., 2020)

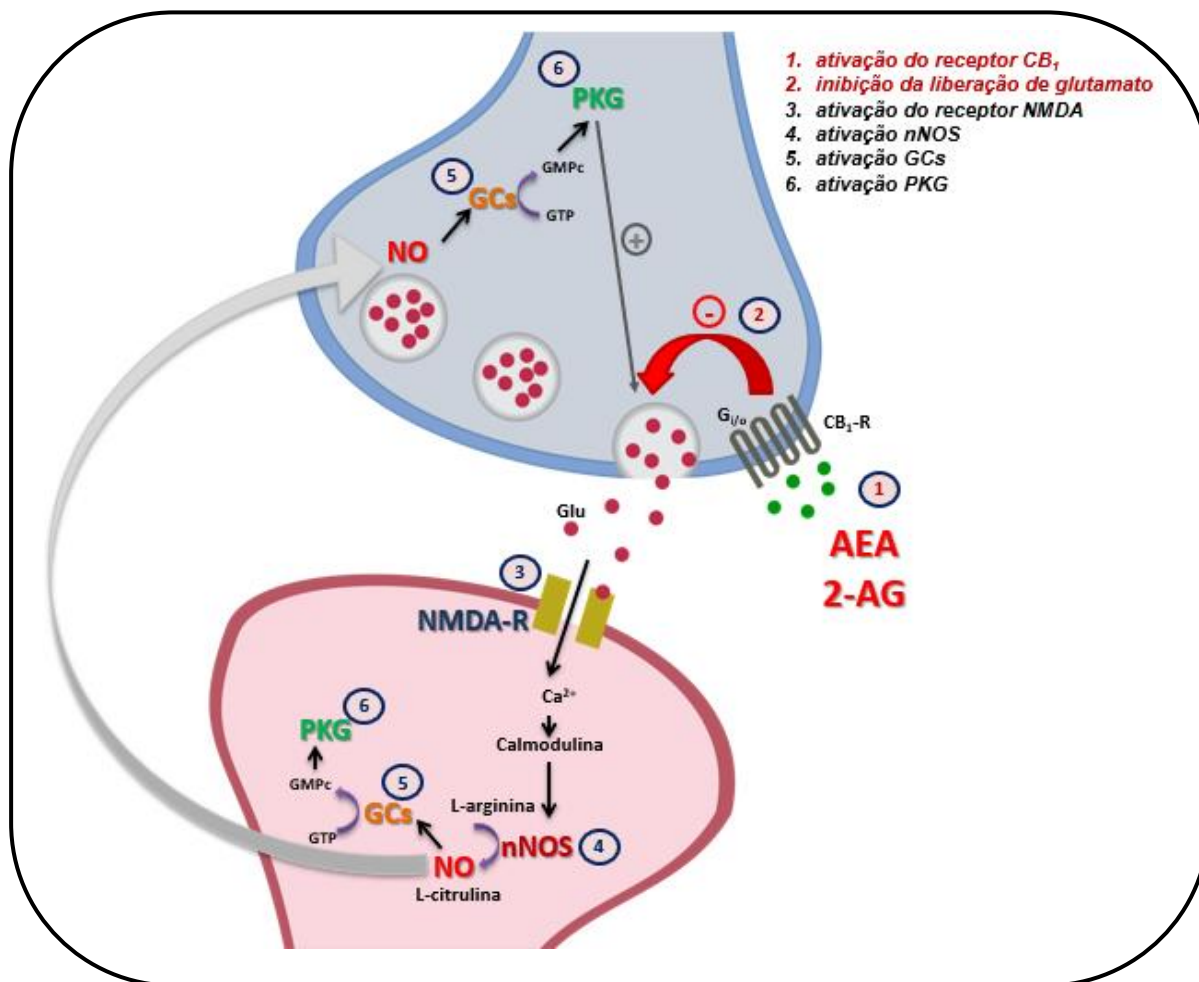
Identificamos anteriormente que microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET aumentou de forma dose-dependente a resposta taquicárdica provocada pela restrição, mas sem afetar o aumento da PA e a queda da temperatura cutânea da cauda (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Por outro lado, o tratamento local de NLET com inibidores da hidrólise da

anandamida (ou seja, um inibidor da FAAH) e do 2-AG (ou seja, um inibidor de MAGL) atenuou o aumento FC durante o estresse de restrição, e esse efeito foi abolido pela pré-tratamento local com AM251 (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Tomados em conjunto, esses resultados indicaram uma influência inibitória da ativação do receptor CB<sub>1</sub> no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse, efeito que parece ser mediado pela liberação local de AEA e 2-AG. Portanto, a facilitação da resposta de FC após o tratamento NLET com AM251 observado no presente estudo está de acordo com os resultados relatados anteriormente. Além disso, o controle inibitório das alterações cardiovasculares evocadas pelo estresse através do receptor CB<sub>1</sub> no NLET corrobora a proposição de que a neurotransmissão endocanabinóide atua no sistema nervoso central suprimindo as respostas ao estresse (HILL; TASKER, 2012; MORENA et al., 2016).

Estudos prévios utilizando técnicas de eletrofisiologia identificaram que os endocanabinóides agem pré-sinápticamente através do receptor CB<sub>1</sub> inibindo aferências glutamatérgicas locais no NLET (BEDSE et al., 2019; GLANGETAS et al., 2013; LANGE et al., 2017; MASSI et al., 2008; PUENTE et al., 2010). Esses achados são reforçados por evidências da presença de receptores CB<sub>1</sub> em terminais glutamatérgicos no NLET (MASSI et al., 2008; PUENTE et al., 2010). Essa influência inibitória do receptor CB<sub>1</sub> na neurotransmissão glutamatérgica no NLET foi proposta estar envolvida em circuitos de recompensa, auto-administração de nicotina, abstinência alcoólica e neuroplasticidade desencadeada pelo estresse e comportamento defensivo (BEDSE et al., 2019; GLANGETAS et al., 2013; LANGE et al., 2017; MASSI et al., 2008; REISIGER et al., 2014). No entanto, os resultados apresentados aqui fornecem a primeira evidência de interação entre as neurotransmissões endocanabinóide e glutamatérgica no NLET no controle das respostas fisiológicas ao estresse. Nossos resultados são ainda suportados por evidência recente de que a neurotransmissão glutamatérgica no NLET exerce uma influência facilitatória nas respostas cardiovasculares ao estresse (ADAMI et al., 2017; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018b), de modo que, como evidenciado no presente estudo, é esperada que inibição da neurotransmissão glutamatérgica por receptores CB<sub>1</sub> locais tenha uma influência inibitória nessas respostas.



Uma das formas de síntese de NO no sistema nervoso central reportadas na literatura envolve a ativação do receptor glutamatérgico NMDA e consequente aumento nas concentrações intracelulares de  $Ca^{+2}$ , o que acarreta a ativação da nNOS (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988; GARTHWAITE, 2008). Foi reportado que neurônios capazes de sintetizar NO no NLET são ativados durante situações aversivas (GUIMARÃES et al., 2005), e o tratamento sistêmico com inibidores da nNOS diminui a ativação neuronal causada pelo estresse no NLET (SILVA et al., 2012). Em conjunto, esses resultados sugerem um recrutamento da neurotransmissão nitrérgica do NLET durante ameaças aversivas. A ativação do receptor glutamatérgico NMDA em neurônios pós-sinápticos resulta na formação de NO através de um mecanismo dependente de  $Ca^{+2}$  e ativação do nNOS (CHACHLAKI; PREVOT, 2019; GARTHWAITE, 2008, 2019). Assim, foi reportado recentemente que a influência facilitatória do receptor NMDA no NLET nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse é mediada pela ativação local da nNOS (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018b). Apesar dessas evidências, a interação das neurotransmissões endocanabinóide e glutamatérgica nunca foi explorada. De fato, nossos achados fornecem a primeira evidência de uma interação entre a neurotransmissão endocanabinóide local e sinalização nitrérgica no NLET. A identificação de que a modulação das alterações cardiovasculares evocadas pelo estresse pelo o receptor NMDA é mediado pela ativação local da nNOS no NLET (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018b) suporta a ideia de que a interação endocanabinóide com o receptor NMDA e a sinalização nitrérgica é parte de uma mesma via de sinalização (isto é, sinalização do receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG). Nesse sentido, os resultados relatados aqui sugerem que a ativação do receptor  $CB_1$  em terminais excitatórios no NLET inibe a liberação de glutamato, que por sua vez reduz a ativação do receptor NMDA, influxo de  $Ca^{+2}$  e ativação de nNOS no neurônio pós-sináptico. A Figura 14 representa um esquema que descreve o mecanismo de interação proposto entre o receptor  $CB_1$  e a sinalização pela via receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG no NLET.



**Figura 14 - Mecanismo de interação endocanabinóide via receptor NMDA/nNOS/GCs/ PKG.**

Representação esquemática que ilustra o mecanismo de interação proposto entre o receptor canabinoide do tipo 1 ( $CB_1$ ) e a N-metil-D-aspartato (NMDA)/óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)/guanilato ciclase solúvel (GCs) / proteína quinase G (PKG) sinalizando o núcleo do leito da estria terminal (NLET) durante o estresse agudo de restrição. A ativação do receptor  $CB_1$  nos terminais pré-sinápticos excitatórios (1) inibe a liberação de glutamato (2), que por sua vez diminui a ativação do receptor de glutamato NMDA (NMDA-R) (3), nNOS (4), sGC (5) e PKG (6). 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; AEA: anandamida; GMPc: guanosina monofosfato cíclico;  $G_{i/o}$ : proteína  $G_{i/o}$  (inibitória); Glu: glutamato; GTP: trifosfato de guanosina; NO: óxido nítrico.

A via de sinalização do receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG parece ser o alvo de outros mecanismos neuroquímicos locais no NLET controlando as respostas ao estresse. De fato, a neurotransmissão CRFérgica no NLET é um mecanismo neuroquímico envolvido no controle das respostas cardiovasculares ao estresse (CRESTANI et al., 2013b; OLIVEIRA et al., 2015), e atua em neurônios pré-sinápticos, aumentando a neurotransmissão glutamatérgica local (SILBERMAN; WINDER, 2013). Essa interação entre glutamato e CRF, bem como a interação de sinalização de CRF-NO, foi recentemente demonstrada estarem envolvidas em respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição (OLIVEIRA et al., 2018). Uma interação entre neurotransmissões endocanabinóide e CRFérgica no NLET nunca foi relatado. Contudo, apesar das evidências de que o controle oposto exercido pelas neurotransmissões CRFérgica (papel facilitatório) e endocanabinóide (papel inibitório) das respostas cardiovasculares ao estresse sejam mediadas através da mesma via de sinalização (i.e, neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica), não podemos excluir a possibilidade de que a inibição da liberação local de CRF pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET também afete as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. De fato, foi encontrada a co-localização do receptor CB<sub>1</sub> e dos receptores CRFérgicos no NLET (COTA et al., 2007). Por outro lado, alguns estudos indicaram que a neurotransmissão endocanabinóide pode mediar os efeitos após a ativação da neurotransmissão da CRFérgica (KUPFERSCHMIDT; KLAS; ERB, 2012; KUPFERSCHMIDT; NEWMAN, 2012). Portanto, novos estudos são necessários para investigar uma interação direta entre as neurotransmissões endocanabinóide e CRFérgica no NLET.

O controle da função cardiovascular durante ameaças aversivas é mediado pelo sistema nervoso autônomo (CARRIVE, 2006; CRESTANI, 2016; DOS REIS et al., 2014). Nesse sentido, foi evidenciado que a inibição da atividade simpática cardíaca diminui o aumento da FC induzido pelo estresse, ao passo que o bloqueio do tônus parassimpático para o coração aumenta a taquicardia induzida por estímulos aversivos (CRESTANI, 2016; DOS REIS et al., 2014). Em conjunto, esses resultados sugerem uma co-ativação do sistema nervoso simpático e parassimpático cardíacos durante o estresse. A resposta pressora durante o estresse de restrição é abolido pelo tratamento com

antagonistas de adrenoreceptores  $\alpha_1$  (DOS REIS et al., 2014), o que sugere que vasoconstrição dos leitos vasculares esplânico, renal e cutâneo contribui para o aumento da pressão arterial durante o estresse (BLESSING, 2003; SCHADT; HASSER, 1998; ZHANG; JULIEN; BARRÈS, 1996). O NLET possui conexões diretas com estruturas bulbares envolvidas no controle da atividade autônoma, como o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo, e as regiões ventrolaterais (DONG; SWANSON, 2004; GRAY; MAGNUSON, 1987). Desse modo, a influência inibitória da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nas respostas de taquicardia causada pelo estresse de restrição agudo pode ser mediada pela ativação de vias inibitórias para neurônios pré-motores simpáticos localizados no bulbo ou facilitação de sinais excitatórios para neurônios parassimpáticos.

O NLET é proposto como um núcleo intergradador de informações, conectando estruturas corticolímbicas como o córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex insular, hipocampo e amígdala a regiões do hipotálamo e tronco cerebral envolvidas na geração de respostas fisiológicas e comportamentais (CRESTANI et al., 2013a; MYERS; ULRICH-LAI, 2017; RADLEY; JOHNSON, 2018; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Aferências no NLET oriundas do CPFm, córtex insular, hipocampo e amígdala basolateral (BLA) são principalmente glutamatérgicas (CH'NG et al., 2018; MYERS; ULRICH-LAI, 2017). Resultados anteriores forneceram evidências de que os receptores  $CB_1$  inibiram terminais pré-sinápticos excitatórios no NLET provenientes de região infralímbica do CPFm, córtex insular e BLA (BEDSE et al., 2019; GLANGETAS et al., 2013; LANGE et al., 2017; MASSI et al., 2008). Uma influência facilitatória do córtex infralímbico e do córtex insular foi reportada sobre a resposta de FC desencadada pelo estresse de restrição (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; TAVARES; CORRÊA; RESSTEL, 2009). Em relação a BLA, a ativação deste núcleo amigdalóide pelo estresse evoca alterações cardiovasculares e comportamentais (SANDERS; MORZORATI; SHEKHAR, 1995; SANDERS; SHEKHAR, 1995), e um estudo recente identificou que a angiotensina (1-7) (peptídeo regulador para os efeitos pró-estresse da angiotensina II) no BLA diminuiu as respostas cardiovasculares ao estresse de jato de ar (OSCAR et al., 2015). Nesse sentido, é possível que a interação com o receptor NMDA relatada

no presente estudo esteja relacionada com a inibição de informações excitatórias no NLET oriunda dessas estruturas corticolímbicas, o que reduz a resposta de FC. No entanto, como mencionado acima, aferências glutamatérgicas para o NLET também se origina do hipocampo (CH'NG et al., 2018; MYERS; ULRICH-LAI, 2017) e o NLET é parte do circuito neural envolvido no controle de respostas fisiológicas exercido por essa estrutura (ZHU et al., 2001) e foi relatado que essa estrutura desempenha um papel facilitatório nas respostas de FC ao estresse de restrição (SCOPINHO et al., 2013). Assim, não podemos excluir a possibilidade de que a interação da neurotransmissão endocanabinóide e glutamatérgica aqui relatada seja mediada pela inibição de informações provenientes do hipocampo. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar a rede central relacionada aos efeitos relatados no presente estudo.

## **7. CONCLUSÃO**

Em suma, os resultados reportados neste estudo indicam uma interação da neurotransmissão endocanabinóide no NLET com as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica locais durante situações aversivas. Além disso, nossos dados sugerem evidências de que o controle das respostas cardiovasculares durante situações aversivas pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET são mediadas através da inibição da sinalização receptor glutamatérgico NMDA/nNOS/GCs/PKG locais.

## CAPÍTULO 2

---

Os receptores GABA<sub>A</sub>, mas não os GABA<sub>B</sub>, no hipotálamo lateral modulam a resposta taquicárdica ao estresse emocional em ratos.

## **CAPÍTULO 2**

### **1. INTRODUÇÃO**

O hipotálamo lateral (HL) é uma área diencefálica complexa que foi reportada ser ativada por vários estímulos aversivos (BRISKI; GILLEN, 2001; CULLINAN et al., 1995; FURLONG et al., 2014; MOTTA; CANTERAS, 2015). Conseqüentemente, o HL estaria ligado à rede central que regula as respostas ao estresse (MYERS; ULRICH-LAI, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Em relação às alterações cardiovasculares, estudos iniciais forneceram evidência de um papel dessa área hipotalâmica no controle da resposta de pressão arterial evocada por estímulos aversivos condicionados (IWATA; LEDOUX; REIS, 1986). A influência do HL no controle das respostas cardiovasculares a ameaças aversivas incondicionais foram descritas apenas recentemente (DEOLINDO et al., 2013). Nesse sentido, inibição bilateral aguda da neurotransmissão do HL, causada pelo tratamento com o bloqueador sináptico não-seletivo  $\text{CoCl}_2$ , desencadeou um aumento da taquicardia evocada por uma sessão aguda de estresse de restrição, mas sem afetar a resposta pressora (DEOLINDO et al., 2013). Este efeito foi mimitizado pelo tratamento local com um antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA, o que indicou o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo HL (DEOLINDO et al., 2013). No entanto, apesar dos relatos de que o controle das respostas fisiológicas e comportamentais pelo HL reflete um equilíbrio de estímulos excitatórios e inibitórios locais (STANLEY et al., 2011), o papel dos mecanismos neuroquímicos inibidores locais no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo HL respostas nunca foi investigado.

O GABA é um neurotransmissor dominante no hipotálamo (DECAVEL; VAN DEN POL, 1990). Conseqüentemente, o controle inibitório dos neurônios do HL por interneurônios GABAérgicos locais foi descrito anteriormente (BURT et al., 2011; KONADHODE; PELLURU; SHIROMANI, 2015). Aferências GABAérgicas de estruturas límbicas envolvidas no controle das respostas evocadas ao estresse também foram relatadas no HL (GRITTI; MAINVILLE; JONES, 1994; JENNINGS et al., 2013). Apesar desses achados, o papel da

neurotransmissão GABAérgica do HL no controle das respostas ao estresse nunca foi investigado. Desse modo, a nossa hipótese nesse segundo estudo foi a de que a neurotransmissão GABAérgica no HL tem uma influência facilitatória nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

## **2. OBJETIVO**

Caracterização do papel da neurotransmissão GABAérgica no HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Animais**

Como descrito no item 3.1., Capítulo 1.

### **3.2. Implante de cânulas guias no HL**

Como descrito no item 3.2., Capítulo 1. Porém, todas as coordenadas para o HL tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de (Paxinos and Watson, 1997), e foram como segue para implante de cânulas bilaterais no HL.

- Ântero-posterior: +6,2 mm em relação à interaural;
- Lateral: +1,8 mm a partir da linha média;
- Vertical: -7,6 mm em relação ao osso.

### **3.3. Canulação da artéria femoral**

Como descrito no item 3.3., Capítulo 1.

### **3.4. Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca**

Como descrito no item 3.4., Capítulo 1.

### **3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda**



Como descrito no item 3.4., Capítulo 1.

### **3.6. Drogas e soluções utilizadas**

A gabazina (SR95531, antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>), o CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>), o tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fountora-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine<sup>®</sup>, Schering Plough, Brasil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

### **3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central**

Como descrito no item 3.7., Capítulo 1.

### **3.8. Estresse por restrição agudo**

Como descrito no item 3.8., Capítulo 1.

### **3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no HL**

Como descrito no item 3.9., Capítulo 1.

### **3.10. Análise estatística**

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda antes e depois do tratamento farmacológico foram comparados usando o teste t de Student. As alterações de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda ao longo do tempo foram analisadas utilizando ANOVA bifatorial, sendo o tratamento como fator principal e o tempo como medida repetida. A média dos valores durante os primeiros 10 minutos da sessão do estresse agudo de restrição (início) e durante o período restante do estresse de restrição (platô) também foram calculados. Esses valores foram comparados usando a ANOVA bifatorial, com tratamento como fator principal e tempo (início x platô) como medida repetida, seguida pelo

teste post-hoc de Bonferroni. Os resultados estatísticos com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

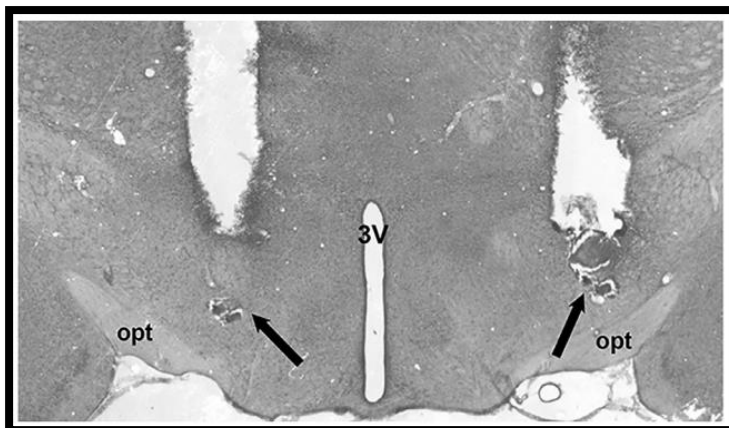
#### **4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

Este protocolo teve o objetivo de caracterizar o papel da neurotransmissão GABAérgica no HL nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo em ratos. Foi identificada a presença dos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> no HL (Margeta-Mitrovic et al., 1999; Bäckberg et al., 2003, 2004). Desse modo, nós investigamos o possível envolvimento de ambos os receptores GABAérgicos presentes no HL nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo em ratos. Para tanto, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionada ao HL, e mantidos em recuperação por no mínimo 3 dias. O experimento foi realizado 24 h após a implantação de um cateter na artéria femoral para registro cardiovascular.

No dia do experimento, os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento para habituação às condições da sala. Após este período, foi realizado um registro de 30 minutos para determinação dos valores basais de PAM e FC. Em seguida, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no HL de veículo (salina, 100nL), gabazina (SR95531, antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>, 0,01nmol/100nL) ou CGP35348 (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>, 10nmol/100nL) (ZHONG et al., 2008; ZHOU et al., 2014). Dez minutos após o tratamento farmacológico do HL, os animais foram expostos a uma sessão de 60 minutos de estresse de restrição agudo. Os registros de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram realizados como descritos nos itens (3.4. e 3.5. do Capítulo 1).

#### **5. RESULTADOS**

A figura 15 mostra fotomicrografia de um corte coronal histológico ilustrando o sítio de injeção bilateral no HL.



**Figura 15 - Corte histológico referente a microinjeção no HL.** Fotomicrografia de um corte coronal histológico do encéfalo de um animal representativo, que ilustra os sítios de microinjeção no HL e as setas indicam os sítios de microinjeção no HL. 3V: terceiro ventrículo, opt: quiasma óptico, 500µm.

**Tabela 2** - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e de temperatura cutânea da cauda (T°C) após os tratamentos farmacológicos no núcleo do leito da estria terminal (HL).

<i>Grupos</i>	<i>n</i>	<i>PAM (mmHg)</i>		<i>FC (bpm)</i>		<i>T(°C)</i>	
		<i>antes</i>	<i>depois</i>	<i>antes</i>	<i>depois</i>	<i>antes</i>	<i>depois</i>
<i>Controle</i>	7	97±5 <i>t</i> = 0.2, <i>P</i> = 0.78	99±4	362±2 <i>t</i> = 0.6, <i>P</i> = 0.55	389±3	29±0,6 <i>t</i> = 0.1, <i>P</i> = 0.85	29±0,4
<i>SR95531</i>	6	111±2 = 0.6, <i>P</i> = 0.51	113±2	375±9 <i>t</i> = 2.2, <i>P</i> = 0.05	404±9	30±0,7 <i>t</i> = 1.2, <i>P</i> = 0.2	29±0,1
<i>CGP35348</i>	7	108±2 <i>t</i> = 0.5, <i>P</i> = 0.61	106±2	413±1 <i>t</i> = 0.1, <i>P</i> = 0.88	409±2	28±0,5 <i>t</i> = 0.1, <i>P</i> = 0.88	28±0,6

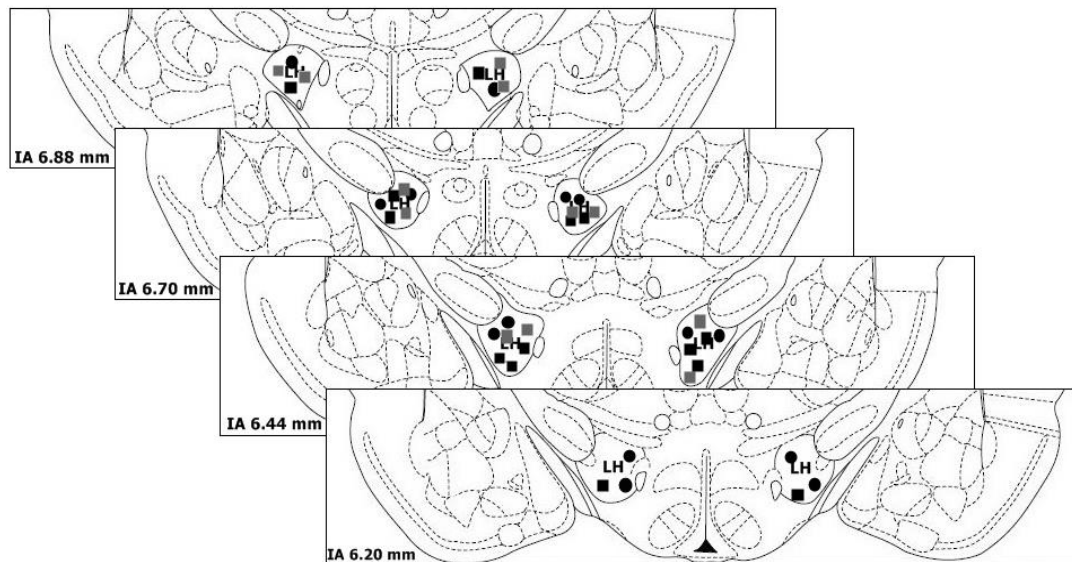
mmHg: milímetros de mercúrio, bpm: batimentos por minuto; SR95531: antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>, CGP35348: antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub>. Os dados foram expressos como erro ± erro padrão da média (EPM). ANOVA monofatorial.

A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> (SR95531) (0,01 nmol /100 nL, n=6) ou do antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub> (CGP35348) (10 nmol/100 nL, n=7) no HL não afetou os valores basais de PAM, FC ou na queda da temperatura cutânea da cauda, quando comparados com os animais tratados localmente com veículo (100 nL, n=7) (Tabela 2). Contudo, a análise temporal indicou que o estresse de restrição agudo desencadeou aumento da PAM (tempo:  $F_{(35,595)} = 21,11$ ,  $P < 0,0001$ ) e FC (tempo:  $F_{(35,595)} = 13,42$ ,  $P < 0,0001$ ) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(6,102)} = 11,8$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 17). A análise também indicou efeito dos tratamentos farmacológicos do HL (tratamento:  $F_{(2,17)} = 3,60$ ,  $P = 0,049$ ) e interação tratamento x tempo ( $F_{(70,595)} = 1,60$ ,  $P = 0,002$ ) para os valores de FC (Figura 17). No entanto, a análise não indicou efeito do tratamento na PAM (tratamento:  $F_{(2,17)} = 1,24$ ,  $P = 0,313$ ) e na queda da temperatura cutânea da cauda (tratamento:  $F_{(2,17)} = 0,68$ ,  $P = 0,515$ ) ou interação tratamento x tempo para as respostas da PAM e de queda da temperatura cutânea da cauda (PAM:  $F_{(70,595)} = 0,78$ ,  $P = 0,897$ ) ou na queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(12,102)} = 1,35$ ,  $P = 0,202$ ) (Figura 17). A análise post-hoc da resposta da FC revelou que o tratamento do HL com SR95531 ( $P = 0,039$ ), mas não com CGP35348 ( $P = 0,875$ ), diminuiu a resposta taquicárdica provocada pela restrição (Figura 17).

A análise das respostas médias durante o período inicial (10 primeiros minutos) e a fase de platô (10 aos 60 minutos) das respostas ao estresse de restrição indicou efeito do tratamento ( $F_{(2,34)} = 6,69$ ,  $P = 0,003$ ) e do tempo ( $F_{(1,34)} = 4,85$ ,  $P = 0,034$ ), mas sem interação entre tratamento x tempo ( $F_{(2,34)} = 0,62$ ,  $P = 0,540$ ) para os valores de FC (Figura 17). No entanto, a análise não indicou efeito do tratamento (PAM:  $F_{(2,34)} = 2,97$ ,  $P = 0,065$ ; queda da temperatura cutânea da cauda:  $F_{(2,34)} = 1,22$ ,  $P = 0,307$ ) ou do tempo (MAP:  $F_{(1,34)} = 2,54$ ,  $P = 0,120$ ; queda da temperatura cutânea da cauda:  $F_{(1,34)} = 2,79$ ,  $P = 0,104$ ) ou interação tratamento x tempo (PAM:  $F_{(2,34)} = 0,17$ ,  $P = 0,840$ ; queda da temperatura cutânea da cauda:  $F_{(2,34)} = 0,47$ ,  $P = 0,627$ ) para as respostas de temperatura da pele e da PAM (Figura 17).

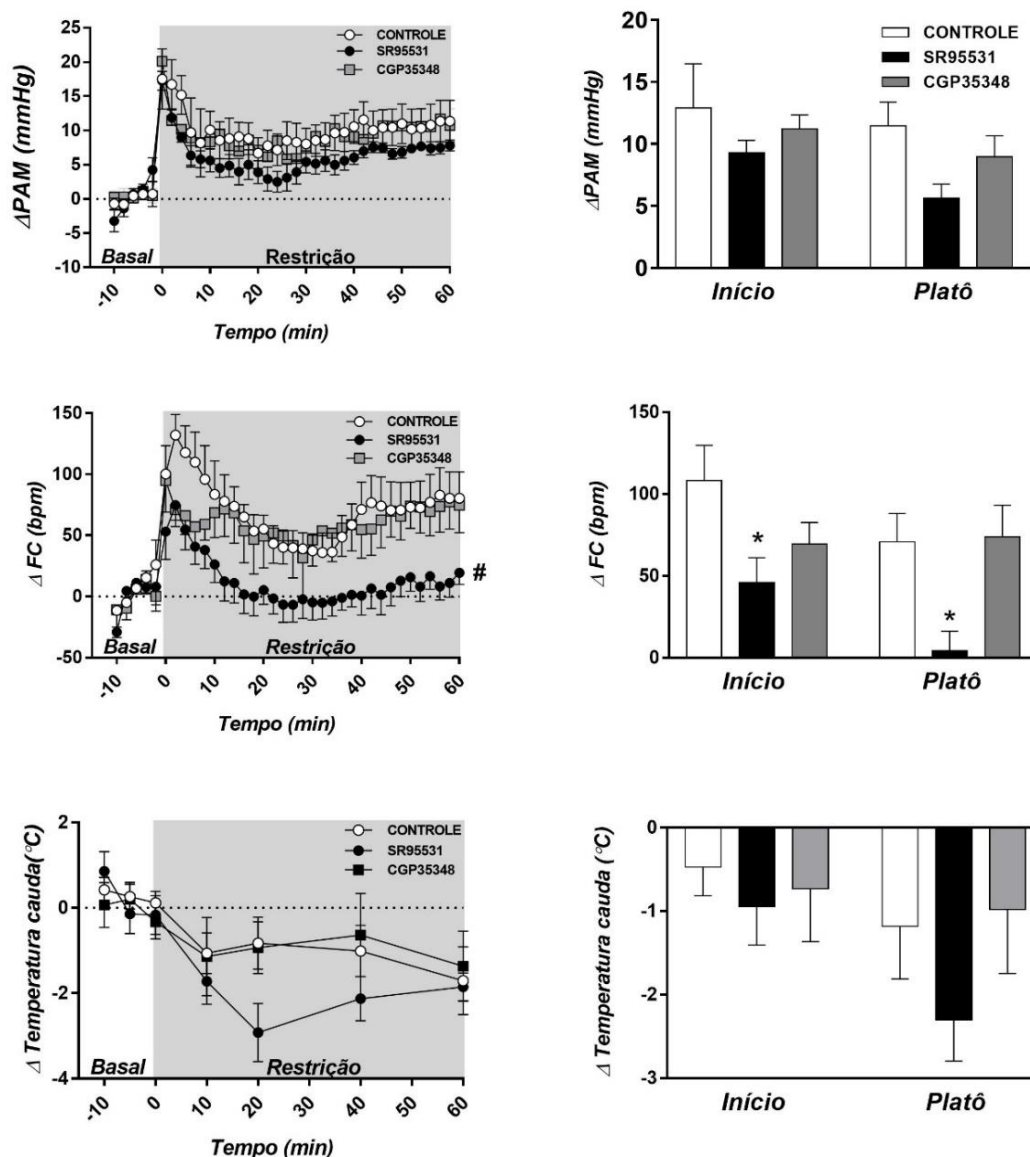
A análise post-hoc da resposta da FC revelou que o tratamento do HL com SR95531 (início:  $P = 0,016$ , platô:  $P = 0,047$ ), mas não com CGP35348 (início:  $P = 0,192$ , platô:  $P = 0,994$ ), diminuiu a resposta taquicárdica evocada pela

restrição durante o período inicial e de platô (Figura 17). A Figura 16 apresenta representação diagramática dos sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo.



**Figura 16 - Representação diagramática dos sítios de microinjeção no HL**, baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção bilateral no HL dos grupos veículo (círculos pretos), o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> SR95531 (quadrados cinzas) e o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub> CGP35348 (quadrados pretos) no HL. coordenada interaural IA.

## Antagonistas GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>



**Figura 17 - Curvas temporais e a média das respostas referentes aos grupos GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>.** Efeito do tratamento do hipotálamo lateral (HL) com antagonistas seletivos do GABA<sub>A</sub> e do receptor GABA<sub>B</sub> nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse agudo de restrição. **(Esquerda)** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da pele da cauda ( $\Delta$ temperatura cauda) induzida pelo estresse de restrição em animais que receberam microinjeção bilateral do veículo (controle, 100 nL; n = 7), o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> SR95531 (0,01 nmol/100 nL; n = 6) ou o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub> CGP35348 (10 nmol/100 nL; n=7) no HL. A área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e barra o erro padrão da média (EPM). # P <0,05 durante todo o período de restrição em comparação com animais tratados com veículo, ANOVA bifatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. **(Direita)** médias da PAM, FC e temperatura da cauda durante o início (10 primeiros minutos) e fase de platô do estresse de restrição em animais submetidos ao tratamento com HL com veículo (barras brancas, n=7), SR95531 (barras pretas, n=6) ou CGP35348 (barras cinza, n=7). As colunas representam a média e barram o SEM. \* P <0,05 versus grupo tratado com veículo, ANOVA bifatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.



## **6. DISCUSSÃO**

Nossos resultados fornecem a primeira evidência do envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no HL no controle das respostas cardiovasculares induzidas por estímulos aversivos. De fato, nós observamos que a microinjeção bilateral de um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> (SR95531) no HL reduziu o aumento da FC durante o estresse de restrição, porém sem afetar a resposta pressora e a queda na temperatura cutânea da cauda. No entanto, o tratamento do HL com um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>B</sub> (CGP35348) não afetou nenhum dos parâmetros avaliados.

Deolindo e colaboradores (2013) relataram recentemente que a inibição bilateral aguda da neurotransmissão no HL causada pelo tratamento local com o inibidor sináptico não-seletivo CoCl<sub>2</sub> aumentou a taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição, porém sem afetar a resposta pressora. Este efeito foi mimetizado pelo tratamento do HL com um antagonista seletivo do receptor NMDA (DEOLINDO et al., 2013), o que sugeriu um papel da neurotransmissão glutamatérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo HL. Em conjunto, esses resultados forneceram evidências de um papel inibitório do HL no controle das respostas cardíacas ao estresse, que é mediado, pelo menos parcialmente, pela neurotransmissão glutamatérgica local. Os resultados relatados no presente capítulo fornecem evidências adicionais de um papel inibitório do HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse, uma vez que o antagonismo da neurotransmissão GABAérgica, tratamento esse que aumenta a ativação neuronal local (JONES; MYERS; HERMAN, 2011), causou diminuição da resposta de taquicardia desencadeada pelo o estresse de restrição. No entanto, talvez mais importante, é o fato dos resultados reportados constituírem a primeira evidência de que a neurotransmissão GABAérgica no HL, agindo via ativação de receptores GABA<sub>A</sub> locais, age no processamento de resposta ao estresse. Nesse sentido, uma vez que a taquicardia aumentada observada após o bloqueio sináptico não seletivo no HL pela microinjeção local de CoCl<sub>2</sub> é mimetizada pelo tratamento local com um antagonista do receptor de glutamato (DEOLINDO et al., 2013), parece que a liberação de GABA no HL durante o estresse age modulando os efeitos mediados pela ativação de terminações glutamatérgicas locais, em vez de

mediar o controle das respostas evocadas pelo estresse no HL. De qualquer forma, como o controle de respostas comportamentais (STANLEY et al., 2011), o papel do HL nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse parece ser o resultado do balanço na ativação de terminações glutamatérgicas e GABAérgicas no HL.

O HL tem sido proposto como parte do circuito encefálico que regula as respostas cardiovasculares ao estresse, conectando estruturas límbicas como o hipocampo e a amígdala central a estruturas efetoras no hipotálamo e no tronco cerebral, bem como a neurônios simpáticos na coluna intermediolateral (MYERS et al., 2017). No entanto, aferências GABAérgicas no HL foram identificados a partir de estruturas límbicas como a área pré-óptica, a área hipotalâmica anterior (AHA) e o núcleo leito da estria terminal (NLET) (GRITTI; MAINVILLE; JONES, 1994; JENNINGS et al., 2013). De acordo, todas essas regiões contêm uma quantidade densa de neurônios produtores de GABA (BOUDABA; SZABÓ; TASKER, 1996; CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; OKAMURA et al., 1990; RADLEY; GOSSELINK; SAWCHENKO, 2009), e a maioria das projeções para outras estruturas límbicas são GABAérgicas (BOUDABA; SZABÓ; TASKER, 1996; MYERS et al., 2014; ROLAND; SAWCHENKO, 1993). Em conjunto, essas evidências suportam as projeções GABAérgicas a partir dessas estruturas para o HL.

Estudos prévios evidenciaram que a ativação de receptores de glutamato no NLET ou do receptor angiotensinérgico AT<sub>1</sub> na AHA durante o estresse por restrição aumentaram as respostas cardiovasculares evocadas pela restrição (ADAMI et al., 2017; KUBO et al., 2001). Portanto, é possível que o controle das respostas cardiovasculares evocadas pela restrição demonstrado no presente estudo pelos receptores GABA<sub>A</sub> no HL seja parte dos circuitos neurais relacionados ao controle do NLET e da AHA, uma vez que a ativação de neurônios GABAérgicas do NLET e da AHA inibiria a ativação neuronal no HL, que por sua vez facilitaria as respostas cardiovasculares. Por outro lado, estudos recentes relataram que a inibição da neurotransmissão local em núcleos pré-ópticos (medial e lateral) aumentou a taquicardia evocada pela restrição, indicando um papel inibitório (DUARTE et al., 2017; FASSINI et al., 2017). Embora essas evidências não suportem a ideia de um envolvimento da

neurotransmissão GABAérgica no HL na via relacionada ao controle das respostas cardiovasculares ao estresse pela área pré-óptica, um possível papel dos mecanismos neuroquímicos excitatórios locais no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelos núcleos pré-ópticos nunca foi relatado. De qualquer forma, mais estudos são necessários para elucidar o circuito relacionado ao controle das respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse pela neurotransmissão GABAérgica no HL.

O HL é uma área heterogênea contendo tipos celulares distintos, incluindo aminoácidos excitatórios e inibitórios; além de neuropeptídeos, sendo orexina e hormônio concentrador de melanina (MCH) encontrados predominantemente no HL (BERTHOUD; MÜNZBERG, 2011; STUBER; WISE, 2016). Os neurônios orexinérgicos projetam-se para o hipotálamo, tronco cerebral e para regiões envolvidas no controle autônomo, bem como para neurônios simpáticos na medula espinhal (CARRIVE, 2017). Estudos anteriores relataram diminuição das respostas cardiovasculares a vários estressores psicológicos em camundongos knockout para orexina, bem como após tratamento sistêmico com antagonistas dos receptores de orexina (BEIG; DAMPNEY; CARRIVE, 2015; FURLONG et al., 2009; KAYABA et al., 2003). A influência facilitatória da orexina nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse refuta a ideia de envolvimento desse mecanismo neuroquímico nos efeitos relatados no presente estudo, uma vez que a desinibição de neurônios orexinérgicos evocados pelo tratamento do HL com o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> deveria aumentar, ao invés de diminuir, as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Isso também é suportado por evidências de que os neurônios orexinérgicos não estão envolvidos nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição (FURLONG et al., 2009).

Com relação ao MCH, apesar dos relatos de que os antagonistas dos receptores MCH diminuem a hipertermia induzida por estresse (SMITH et al., 2006, 2009), o seu papel específico no controle das respostas cardiovasculares diante da exposição a ameaças aversivas nunca foi documentado. Contudo, a administração intracerebroventricular do MCH diminuiu a pressão arterial e a FC em animais não-estressados (MESSINA; OVERTON, 2007), o que sugere que a influência facilitatória da neurotransmissão GABAérgica na resposta taquicárdica

evocada por restrição pode ser mediada pela inibição de neurônios MCH no HL. Além de neuropeptídeos, não podemos excluir o papel de neurônios que expressam aminoácidos, pois além da identificação da expressão abundante de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos no HL, marcadores desses aminoácidos foram identificados em neurônios orexinérgicos e melaninérgicos (STUBER; WISE, 2016). Apesar desses achados, mais estudos são necessários para elucidar a população neuronal local envolvida no controle das respostas cardiovasculares ao estresse.

Como discutido no capítulo 1 (para detalhes, ver Capítulo 1), o sistema nervoso simpático e parassimpático estão envolvidos nas respostas cardiovasculares durante ameaças aversivas (CRESTANI, 2016), de modo que a resposta de FC é o resultado de uma co-ativação simpática e parassimpática (CARRIVE, 2006; DOS REIS et al., 2014). Há evidências neuroanatômicas de projeções do HL para regiões do tronco encefálico contendo neurônios parassimpáticos, como o núcleo motor dorsal e o núcleo ambíguo (LUITEN; TER HORST; STEFFENS, 1987; TER HORST; LUITEN; KUIPERS, 1984). Nesse sentido, estudos prévios indicaram que o controle inibitório da resposta de FC ao estresse de restrição pelos receptores NMDA no HL foi mediado por uma facilitação do tônus parassimpático para o coração (DEOLINDO et al., 2013). Portanto, a influência facilitatória do receptor GABA<sub>A</sub> no HL na taquicardia evocada pela restrição pode ser mediada pela inibição de mecanismos facilitatórios para neurônios parassimpáticos no tronco encefálico. No entanto, considerando que o HL conecta direta, e indiretamente via regiões na porção ventrolateral do bulbo, a neurônios simpáticos na coluna intermediolateral (ALLEN; CECHETTO, 1992; SAPER et al., 1976) não podemos excluir a possibilidade de que o controle pela neurotransmissão GABAérgica no HL é também mediada pela inibição de mecanismo inibitórios para os neurônios simpáticos.

## **7. CONCLUSÃO**

Em resumo, nossos resultados indicam um envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no HL no controle das alterações cardiovasculares desencadeadas durante ameaças aversivas. Especificamente,

nossos resultados fornecem evidências de que a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, mas não GABA<sub>B</sub>, no HL desempenha um papel facilitatório na taquicardia induzida por estresse, mas sem afetar o aumento da pressão arterial e a vasoconstrição cutânea mediada pela ativação simpática vasomotora.

## CAPÍTULO 3

---

A modulação da resposta taquicárdica ao estresse pelo receptor endocanabinóide  $CB_1$  no núcleo do leito da estria terminal é mediado pela ativação do receptor  $GABA_A$  no hipotálamo lateral.

## **CAPÍTULO 3**

### **1. INTRODUÇÃO**

A grande maioria dos neurônios no NLET são GABAérgicos (>90%) (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; RADLEY; GOSSELINK; SAWCHENKO, 2009). De fato, dados recentes demonstraram que a maior parte das projeções do NLET para outras estruturas límbicas são de neurônios GABAérgicos (MYERS et al., 2014). Nesse sentido, algumas evidências tem indicado a presença de projeções GABAérgicas do NLET para o HL (GRITTI; MAINVILLE; JONES, 1994; JENNINGS et al., 2013). As evidências de conexão GABAérgica do NLET com o HL, juntamente com os resultados sugerindo uma influência inibitória do HL na resposta de taquicardia causada pelo estresse por restrição (DEOLINDO et al., 2013) (para detalhes, ver Capítulo 2), sugerem que essa região diencefálica possa ser parte da via neuronal envolvida na modulação da resposta de FC ao estresse pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET. Nesse sentido, considerando que a influência da neurotransmissão endocanabinóide seja mediada por uma inibição da neurotransmissão glutamatérgica local (dados Capítulo 1), uma hipótese seria que a formação local de endocanabinóide no NLET durante situações aversivas reduza a liberação local de glutamato, o que diminui a ativação de neurônios GABAérgicos no NLET que se projetam para o HL, resultando em uma menor inibição dos neurônios do HL, e conseqüente redução da resposta de FC ao estresse. Desse modo, neste trabalho testamos a hipótese de que a facilitação da resposta de taquicardia ao estresse por restrição decorrente da microinjeção de AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>) no NLET seja mediada por uma menor ativação de neurônios no HL via ativação do receptor GABA<sub>A</sub> local.

### **2. OBJETIVO**

- Avaliar o efeito do antagonismo farmacológico do receptor CB<sub>1</sub> no NLET sobre o número de neurônios c-Fos positivos no HL após uma sessão de estresse de restrição agudo.

- Investigar o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica no HL, agindo via receptor GABA<sub>A</sub>, no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Animais**

Como descrito no item 3.1., Capítulo 1.

#### **3.2. Implante de cânulas guias no NLET e HL**

Como descrito no item 3.2., Capítulo 1 e 2.

#### **3.3. Canulação da artéria femoral**

Como descrito no item 3.3., Capítulo 1.

#### **3.4. Registro da pressão arterial média e frequência cardíaca**

Como descrito no item 3.4., Capítulo 1.

#### **3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda**

Como descrito no item 3.5., Capítulo 1.

#### **3.6. Drogas e soluções utilizadas**

SR95531 (antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub>) (TOCRIS cat. # 1262, West-woods Business Park, Ellisville, MO, EUA), 2,2,2 Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA; cat. # T48402) e Uretana (Sigma-Aldrich; cat. # U2500) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). AM251 (N- (piperidin-1-il) -5- (4-iodofenil) -1- (2,4-diclo-rofenil) -4-metil-1H-pirazol-3 carboxamida) (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>) (TOCRIS cat. # 1117, West-woods Business Park, Ellisville, MO, EUA) foi dissolvido em uma solução salina contendo 30% de DMSO (DMSO 30%). A flunixinina meglumina (Banamine,



Schering Plough, Cotia, SP, Brasil) e a preparação poliantibiótica de estreptomicinas e penicilinas (Pentabiotico, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) foram utilizadas como fornecidas.

### **3.7. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central**

Como descrito no item 3.7., Capítulo 1.

### **3.8. Estresse por restrição agudo**

Como descrito no item 3.8., Capítulo 1.

### **3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas**

Como descrito no item 3.9., Capítulo 1.

### **3.10. Imunohistoquímica para c-Fos**

Trinta minutos após o término da sessão de estresse, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e perfundidos com salina tamponada com fosfato (PBS) (1 molar pH 7,4) acompanhado de paraformaldeído 4% em solução com tampão fosfato (pH 7,4). Em seguida, os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído por 2h e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS a 4°C. Após dois dias, os encéfalos foram congelados em gelo seco em pó por 1h, e em seguida estocados em freezer -80°C até o processamento.

A técnica de imunohistoquímica para c-Fos foi feita após a realização de cortes coronais de 35µm dos encéfalos na região do HL (baseado nas pranchas de microinjeção no HL nos experimentos funcionais (GOMES-DE-SOUZA et al., 2019) em criostato (-20°C) (CM1900, Leica, Alemanha). As fatias contendo a região encefálica de interesse (i.e., HL) foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) em PBS e incubadas em solução bloqueadora (soro de cabra 3% e Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com anticorpo anti-c-Fos (diluição 1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; produzido em coelho) em solução bloqueadora por 24 horas à 4°C. Após essa incubação, as fatias foram

lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (diluição 1:600; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS-Tx (Triton X-100 0,25%) e soro de cabra 3% por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), Triton X-100 0,5% e PBS. Na sequência, as fatias foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 7 minutos. Finalmente, foram lavadas 4 vezes (5 minutos cada lavagem), transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram hidratadas em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (30%, 60%, 90%, 95% e 100%) e xilol (LabSynth, São Paulo, Brasil). Por fim, foram cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e lamínulas.

A imunomarcção de c-Fos foi capturada através de uma câmera acoplada a um microscópio (Zeiss Axioskop 2). Foram capturadas duas imagens por corte (hemisfério direito e esquerdo) e foram obtidos pelo menos quatro cortes por animal. A contagem foi realizada a partir de uma área fixa do HL, e a quantificação foi realizada em pelo menos dois cortes do HL por animal. As células positivas para c-Fos foram contadas utilizando o programa Image J. Os resultados foram expressos como número médio de células positivas para c-Fos/mm<sup>2</sup>. O HL foi identificado de acordo com o atlas de encéfalo de ratos de (PAXINOS; WATSON, 1997).

### **3.11. Análise estatística**

Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). O efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) monofatorial. A ANOVA bifatorial, com tratamento como medida principal e tempo como medida repetida, acompanhada do teste post-hoc de Bonferroni, foi usada para comparar as curvas temporais de variações da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda durante o

estresse por restrição agudo. A comparação do número de neurônios positivos para c-Fos (grupo controle versus grupo tratado) foi realizada usando o teste t de Student. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

#### **4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram trazidos para a sala experimental em suas próprias caixas. Os animais foram permitidos pelo menos 60 minutos para se adaptarem às condições da sala experimental, como som e iluminação, antes de iniciar os experimentos. A sala experimental teve a temperatura controlada (24°C) e era isolada acusticamente das outras salas.

##### **4.1. Avaliação do efeito da microinjeção de AM251 no NLET no número de neurônios c-Fos positivos no HL após uma sessão aguda de estresse por restrição**

Este protocolo teve o objetivo de investigar se o antagonismo do receptor  $CB_1$  no NLET resulta em redução no número de neurônios ativos no HL durante o estresse de restrição agudo. Para tanto, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET, e mantidos em recuperação por no mínimo 4 dias. No dia do experimento, os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições da sala. Após este período, foi realizada a microinjeção bilateral de veículo (30% DMSO diluído em salina, 100nL,  $n = 8$ ) ou AM251 (100pmol/100nL,  $n = 11$ ) no NLET (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016, 2020). Dez minutos após o tratamento farmacológico do NLET, os animais foram expostos a uma sessão de 60 minutos de estresse por restrição agudo. Trinta minutos após o término da sessão de estresse, todos os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguido por paraformaldeído 4%. Em seguida, os encéfalos foram removidos e submetidos a procedimento para quantificação do número de células positivas para c-Fos no HL (para detalhes, ver item 3.10).

#### **4.2. Efeito AM251 da microinjeção no NLET com o pré-tratamento com SR95531 no HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.**

O objetivo deste protocolo foi investigar o envolvimento do receptor GABA<sub>A</sub> no HL nos efeitos do tratamento do NLET com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> AM251 sobre as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo. Para isso, grupos independentes de ratos foram pré-tratados no HL com antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> SR95531 (1 pmol/100nL, n = 6) ou veículo (solução salina, 100nL/lado n = 6) (GOMES-DE-SOUZA et al., 2019). Cinco minutos depois, os animais receberam veículo (DMSO 30%, 100nL /lado n = 6) ou AM251 (100pmol/100nL/lado n = 6) no NLET (FERREIRA-JUNIOR et al., 2012; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016; LISBOA et al., 2008). Cinco minutos após o segundo tratamento farmacológico do NLET, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse por restrição.

O registro cardiovascular começou pelo menos 30 minutos antes do início da restrição, e foi realizado durante toda a sessão de estresse. A temperatura da pele da cauda foi medida 10, 5 e 0 minutos antes da restrição para os valores basais e aos 10, 20, 40 e 60 minutos durante a restrição (BUSNARDO et al., 2013a). Cada animal recebeu um único tratamento farmacológico e foi submetido a uma sessão de restrição. Em cada protocolo, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os vários grupos experimentais.

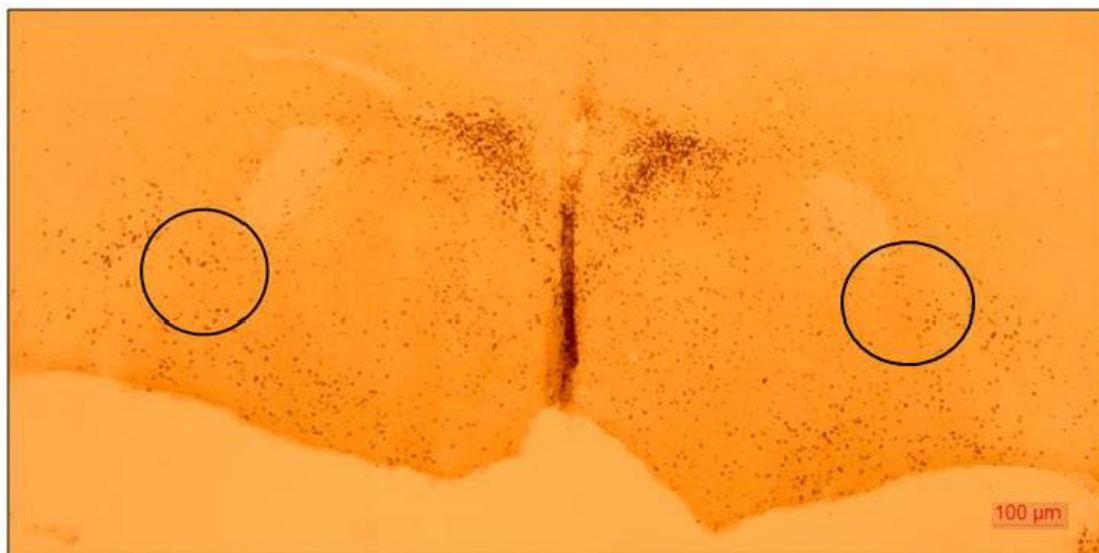
### **5. RESULTADOS**

Abaixo representamos fotomicrografias de cortes histológicos ilustrando o sítio de injeção no NLET e HL.

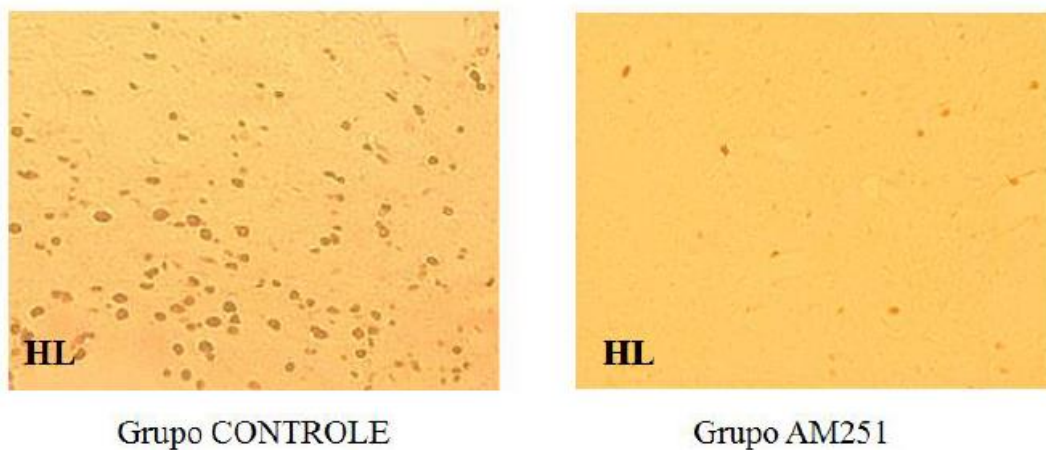
- Referente ao NLET, como demonstrado na figura 4, Capítulo 1.
- Referente ao HL, como demonstrado na figura 15, Capítulo 2.

### **5.1. Efeito da microinjeção de AM251 no NLET sobre o número de células positivas para c-Fos no HL após o estresse de restrição agudo**

A microinjeção bilateral de AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, 100pmol/100nL, n=11) diminuiu significativamente o número de células positivas para c-Fos no HL ( $t = 4,59$ ;  $P < 0,001$ ) após a exposição ao estresse de restrição, quando comparado com os animais tratados com veículo (100 nL/lado, n = 8) (Figura 18). A Figuras 19 mostra corte histológico de um animal representativo ilustrando a marcação de c-Fos no HL e a delimitação da área quantificada. A Figura 20 apresenta cortes de animais representativos ilustrando a marcação imunohistoquímica de c-Fos no HL nos animais tratados com veículo ou AM251 no NLET.



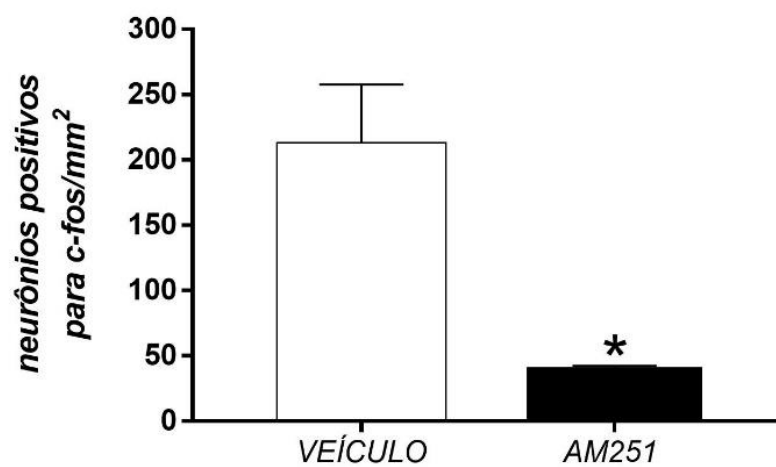
**Figura 19 - Corte histológico representando a marcação de c-Fos no HL.** Corte representativo ilustrando a marcação para c-Fos e a delimitação da área no HL em que foi realizada a quantificação das células positivas para c-Fos.



**Figura 20 - Fotos representativas dos grupos com marcações no HL.** Fotos representativas da marcação de c-Fos no HL de animais tratados no NLET com veículo (grupo controle, foto esquerda) ou AM251 (grupo AM251, foto direita), 50 $\mu$ m.

## INTERAÇÃO HL-NLET (C-FOS)

---



**Figura 18 - Quantificação de neurônios positivos para c-Fos no HL.** Quantificação de neurônios positivos para a proteína c-Fos no HL de ratos tratados com AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, 100pmol/100nL) (barra preta) ou veículo (DMSO 30%, 100nL) (barra branca) no NLET e submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse de restrição. As barras representam a média  $\pm$  EPM. \* P<0,05, teste t de Student.



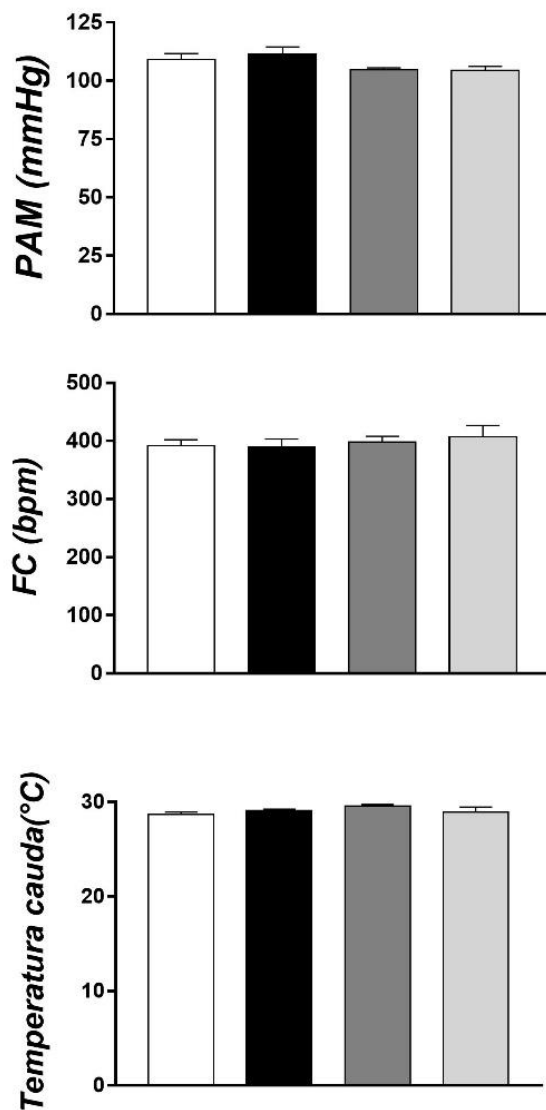
## 5.2. Efeito do pré-tratamento do HL com SR95531 nas alterações das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição causadas pelo tratamento do NLET com AM251

As microinjeções bilaterais do SR95531 (1 pmol/100nL/lado, n = 6) no HL e/ou AM251 (100pmol/100nL/lado n = 6) no NLET não afetaram os valores basais da PAM, FC ou temperatura da pele da cauda (Figura 21). No entanto, o estresse da restrição agudo causou aumento da PAM (tempo:  $F_{(35,700)} = 38$ ,  $P < 0,0001$ ) e da FC (tempo:  $F_{(35,700)} = 30$ ,  $P < 0,0001$ ), e diminuiu a temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(6,120)} = 38$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 22). Além disso, a análise não indicou efeito dos tratamentos farmacológicos sobre as respostas da PAM ( $F_{(3,20)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ), FC ( $F_{(3,20)} = 1,4$ ,  $P > 0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,20)} = 1,5$ ,  $P > 0,05$ ) durante o estresse de restrição agudo (Figura 22). No entanto, a análise indicou interação estresse x tempo para a FC ( $F_{(105, 700)} = 1$ ,  $P < 0,01$ ) e a queda na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(18, 120)} = 2$ ,  $P < 0,01$ ).

A análise post-hoc não indicou efeito dos tratamentos na diminuição da temperatura cutânea da cauda ( $P > 0,05$ ) (Figura 22). Entretanto, a análise post-hoc revelou que o tratamento do NLET com AM251 (grupo salina + AM251) aumentou a taquicardia causada pela restrição ( $P < 0,05$ ), e esse efeito foi inibido nos animais pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> no HL ( $P > 0,05$ ) (Figura 22).

## INTERAÇÃO HL+NLET (BASAL)

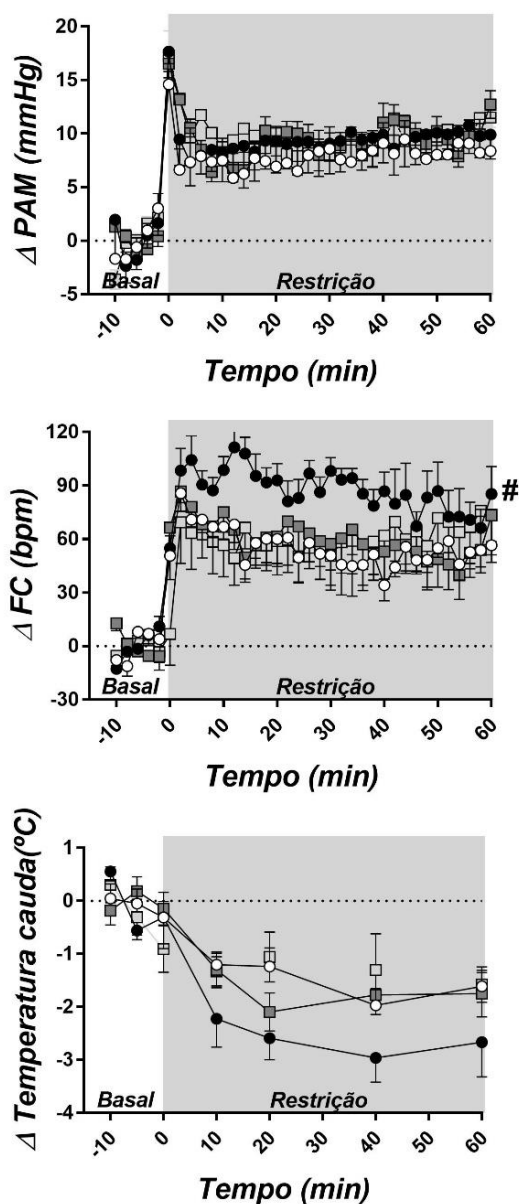
□ SALINA HL+DMSO NLET      ■ SR95531 HL+DMSO NLET  
■ SALINA HL+AM251 NLET      □ SR95531 HL+AM251 NLET



**Figura 21 - Valores basais referentes aos grupos da interação NLET+HL.** Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda (°C) em animais tratados com SALINA + DMSO (barras brancas), SALINA + AM251 (barras pretas), SR95531 + DMSO (barras cinza escuro) e SR95531 + AM251 (barras cinza claro). As barras representam a média  $\pm$  SEM, ANOVA monofatorial.

## INTERAÇÃO HL+NLET (RESTRIÇÃO)

- SALINA HL+DMSO NLET      ■ SR95531 HL+DMSO NLET  
● SALINA HL+AM251 NLET      □ SR95531 HL+AM251 NLET



**Figura 22 - Curvas temporais referentes aos grupos da interação NLET+HL.** Curvas temporais de alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura cauda) desencadeadas por estresse agudo de restrição em animais tratados bilateralmente no HL com veículo (SALINA, solução salina 100nL) ou o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> SR95531 (1 pmol/100nL), seguido de uma segunda microinjeção no veículo com (DMSO) (solução salina contendo 30% de DMSO, 100nL) ou o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> AM251 (100pmol/100nL).

## **6.DISCUSSÃO**

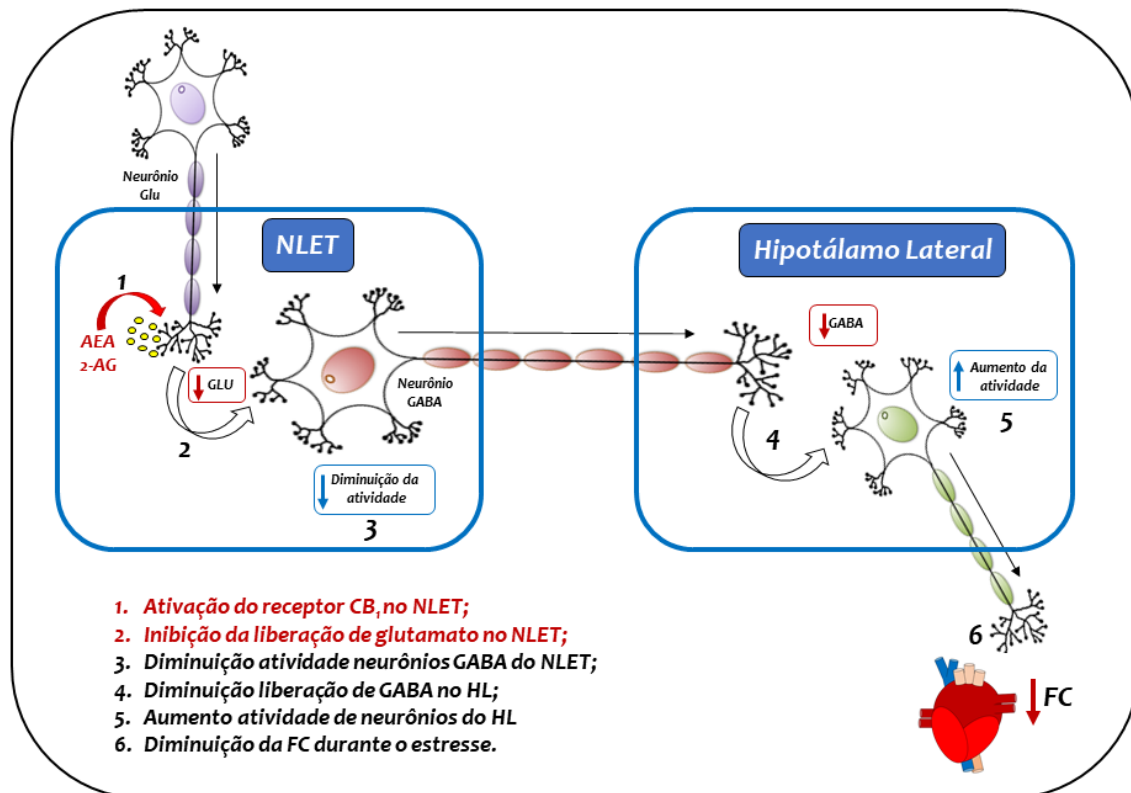
Os resultados obtidos neste estudo são os primeiros a indicar um envolvimento da interação entre o NLET e o HL no controle das respostas cardiovasculares durante o estresse. De fato, nós observamos que a microinjeção bilateral de um antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) no NLET facilitou o aumento da FC, mas sem afetar as respostas de aumento da PAM e a queda da temperatura cutânea da cauda. O efeito do AM251 na resposta taquicárdica ao estresse de restrição foi inibido em animais pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> (SR95531) no HL. Outro achado que confirma nossa hipótese de envolvimento do HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET foi a observação de que a microinjeção bilateral de AM251 no NLET diminuiu a ativação neuronal no HL em animais submetidos a uma sessão aguda de restrição de estresse.

O HL recebe aferências de várias estruturas límbicas, incluindo o NLET (CH'NG et al., 2018; DONG; SWANSON, 2004; HAO et al., 2019; HOSOYA; MATSUSHITA, 1980). Como mencionado acima, a grande maioria dos neurônios no NLET são GABAérgicos (>90%) (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; RADLEY; GOSSELINK; SAWCHENKO, 2009). De fato, dados recentes mostraram que a maioria das projeções de NLET para outras estruturas límbicas são de neurônios GABAérgicos (CH'NG et al., 2018; MYERS et al., 2014). Nesse sentido, algumas evidências indicaram a presença de projeções GABAérgicas do NLET para o HL (GRITTI; MAINVILLE; JONES, 1994). Com base nesses achados, nós investigamos a participação da neurotransmissão GABAérgica no HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET. Em conjunto, os dados apresentados aqui suportam a nossa hipótese de que a facilitação da resposta de FC ao estresse de restrição observado após o tratamento do NLET com AM251 é mediado por um aumento na liberação de GABA no HL, já que nós observamos que o tratamento do NLET com AM251 reduziu o número de neurônios positivos para c-Fos no HL após o estresse por restrição, e o pré-tratamento do HL com o antagonista GABA<sub>A</sub> inibiu os efeitos do antagonismo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET sobre a resposta de taquicardia ao estresse de restrição.

As projeções GABAérgicas do NLET para o HL foram implicadas nas respostas comportamentais de preferência condicionada por lugar à cocaína, ingestão alimentar e ansiolíticas (Sartor & Aston-jones, 2012; Jennings et al., 2013; Kim et al., 2013; Ch et al., 2018). Entretanto, do nosso conhecimento, os dados reportados no presente capítulo constituem a primeira evidência do envolvimento dessa via neural em respostas fisiológicas ao estresse.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados desse protocolo elucidaram o envolvimento de aumento na liberação de GABA e ativação do receptor GABA<sub>A</sub> no HL, o que resulta em redução na ativação neuronal nesse núcleo hipotalâmico, na facilitação da resposta taquicárdica ao estresse de restrição causada pelo antagonismo do receptor CB<sub>1</sub> no NLET. A Figura 23 apresenta uma representação esquemática da interação entre a neurotransmissão endocanabinóide no NLET e a neurotransmissão GABAérgica no HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.



**Figura 23 – Mecanismo de interação da neurotransmissão endocanabinóide no NLET e a neurotransmissão GABAérgica no HL no controle da resposta de FC durante o estresse de restrição.** Representação esquemática que ilustra o mecanismo de interação proposto entre o receptor canabinóide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) no núcleo do leito da estria terminal (NLET) e o receptor GABAérgico do tipo A (GABA<sub>A</sub>) no hipotálamo lateral no controle da resposta de FC durante o estresse agudo de restrição. A ativação do receptor CB<sub>1</sub> nos terminais pré-sinápticos excitatórios (1) inibe a liberação de glutamato (2), que por sua vez diminui a atividade de neurônios GABA no NLET (3), diminui a liberação de GABA no HL (4). Além disso, ocorre o aumento da atividade de neurônios do HL (5), que diminui a FC durante o estresse agudo de restrição (6). 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; AEA: anandamida; Glu: glutamato; NLET: núcleo leito da estria terminal.

## CAPÍTULO 4

---

Os receptores  $CB_1$  e  $CB_2$  no núcleo do leito da estria terminal modulam de maneira diferente comportamentos relacionados à ansiedade: ansiedade inata e influência de experiências anteriores ao estresse.

## **CAPÍTULO 4**

### **1. INTRODUÇÃO**

O sistema endocanabinóide foi identificado nas estruturas límbicas do cérebro, de modo que está posicionado para modular respostas emocionais, como medo e ansiedade (LISBOA et al., 2017; PATEL et al., 2017; YIN; WANG; ZHANG, 2019). Consequentemente, variantes nos genes do sistema endocanabinóide têm sido associadas à ansiedade em humanos e roedores (DINCHEVA et al., 2015; HEITLAND et al., 2012). Estudos em roedores relataram dados conflitantes sobre o efeito da administração sistêmica do antagonista do receptor CB<sub>1</sub> em respostas semelhantes à ansiedade, mas vários trabalhos demonstraram consistentemente fenótipo ansioso em camundongos deficientes do receptor CB<sub>1</sub> (LISBOA et al., 2017; YIN; WANG; ZHANG, 2019). O papel ansiolítico dos receptores CB<sub>1</sub> também foi evidenciado em ensaios clínicos do antagonista do receptor CB<sub>1</sub> rimonabanto (MOREIRA; CRIPPA, 2009).

Em relação aos receptores CB<sub>2</sub>, evidências recentes indicaram sua expressão na glia e nos neurônios em várias regiões do cérebro (GONG et al., 2006; ONAIVI et al., 2006; SICKLE et al., 2014; SOARES et al., 2013; STEMPEL et al., 2016). Dessa forma, estudos anteriores relataram que o tratamento sistêmico com agonista e antagonista do receptor CB<sub>2</sub> afetou o comportamento da ansiedade em vários testes, mas os resultados são controversos (LISBOA et al., 2017). No entanto, como identificado no caso dos receptores CB<sub>1</sub>, animais deficientes do receptor CB<sub>2</sub> apresentaram ansiedade aumentada em (ORTEGA-ALVARO et al., 2011). Os diferentes achados obtidos com a administração farmacológica de drogas que atuam no sistema endocanabinóide podem ser explicados pelo fato de que a modulação endocanabinóide dos comportamentos de ansiedade é específica em relação ao local do cérebro (KOREM et al., 2016). No entanto, apesar dos relatos do efeito dos fitocanabinóides e inibidores do metabolismo e da recaptação de endocanabinóides em várias estruturas límbicas (LISBOA et al., 2017; MOREIRA et al., 2012), o papel específico dos receptores CB<sub>1</sub> e, principalmente, CB<sub>2</sub> em diferentes estruturas cerebrais ainda não são completamente compreendidas.

O NLET está envolvido em estados emocionais como a ansiedade (CALHOON; TYE, 2015; FOX; SHACKMAN, 2019; LEBOW; CHEN, 2016). Por



exemplo, a lesão do NLET ou a inibição química reduziram o comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto zero elevado (WADDELL; MORRIS; BOUTON, 2006) e inibiram o sobressalto aumentado pela luz e pela CRF (LEE; DAVIS, 1997; WALKER; DAVIS, 1997). A ideia de que a ativação do NLET possa estar envolvida na ansiedade também foi apoiada por evidências de que o bloqueio do receptor de glutamato ou a inibição optogenética no NLET provocaram efeitos do tipo ansiolíticos (FARIA et al., 2016; KIM et al., 2013), enquanto o bloqueio do receptor GABA causou efeitos opostos (GENG et al., 2016; SAJDYK et al., 2008). Além disso, a hiperpolarização via receptor 5-HT<sub>1A</sub> e despolarização mediada por 5-HT<sub>2C</sub>, evocada por fotoestimulação dos terminais BNST 5-HT, causou, respectivamente, efeitos ansiolíticos e ansiogênicos (GARCIA-GARCIA et al., 2018; MARCINKIEWCZ et al., 2016). Estudos em humanos também relataram que a ansiedade está diretamente relacionada à atividade do NLET (SOMERVILLE; WHALEN; KELLEY, 2010; YASSA et al., 2012). No entanto, a ativação dos terminais dos neurônios do NLET no hipotálamo lateral (HL) e na área tegmental ventral (ATV) evocou efeitos semelhantes a ansiolíticos em camundongos (JENNINGS et al., 2013; KIM et al., 2013), indicando a presença de neurônios no NLET que suprimem a ansiedade (YAMAUCHI et al., 2018). Além da ansiedade inata, o NLET também tem sido implicado na ansiedade evocada pelo estresse (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; GOUVEIA et al., 2016; POMRENZE et al., 2019), mas as informações disponíveis são limitadas.

Como reportado acima, componentes do sistema endocanabinóide foram identificados no NLET, incluindo diacilglicerol lipase (DAGL, síntese de 2-araquidonoilglicerol), fosfolipase D (NAPE-PLD, síntese de anandamida), ácidos graxos amido hidrolase de (FAAH, degradação de anandamida), monoacilglicerol (degradação do araquidonoilglicerol) e receptores CB<sub>1</sub> (GULYAS et al., 2004; LANGE et al., 2017; MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993; PUENTE et al., 2010, 2011). No entanto, a expressão do receptor CB<sub>2</sub> nunca foi relatada, de modo que até agora todos os efeitos relatados pelo sistema endocanabinóide no NLET foram mediados pelo receptor CB<sub>1</sub> local (BEDSE et al., 2019). Em relação às respostas emocionais, um estudo recente relatou um papel dos receptores CB<sub>1</sub> no NLET na resposta ao medo condicionado (LANGE et al., 2017). Além disso, a microinjeção intra-NLET do fitocanabinóide canabidiol

(CBD) também evocou efeito ansiolítico, mas essa resposta foi mediada pelo receptor 5-HT<sub>1A</sub> (GOMES; RESSTEL; GUIMARÃES, 2011). Apesar dessas evidências, nunca foi relatado um papel da neurotransmissão endocanabinoide presente no NLET no controle de comportamentos relacionados à ansiedade (LISBOA et al., 2017). Além disso, alguns estudos forneceram evidências de que o controle de comportamentos de ansiedade pelo sistema endocanabinoide pode ser influenciado por experiências anteriores ao estresse (CAMPOS et al., 2010), e os receptores CB<sub>1</sub> no NLET estavam relacionados à plasticidade funcional local evocada pelo estresse agudo (GLANGETAS et al., 2013). Assim, além da ansiedade inata, nós também testamos a hipótese de que os receptores endocanabinóides no NLET estão envolvidos na resposta ansiogênica evocada pelo estresse de restrição agudo.

## **2. OBJETIVO**

Este estudo teve como objetivo determinar a expressão dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET, bem como avaliar o papel específico desses receptores na ansiedade inata e na resposta ansiogênica evocada por restrição.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Animais**

Como descrito no item 3.1., Capítulo 1.

### **3.2. Extração de RNAm, síntese do c-DNA e reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)**

A transcrição reversa-qPCR (RT-qPCR) foi usada para avaliar a expressão gênica basal dos receptores endocanabinóides (receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) no NLET e no córtex pré-frontal medial (CPFm). Resumidamente, os ratos foram decapitados, os cérebros foram rapidamente removidos e congelados em solução de isopentano a -50°C, e então armazenados em um freezer a -80°C até a dissecação. Punções bilaterais (agulha de calibre 12) do CPFm e do NLET (anterior e posterior) foram realizadas nos encéfalos posicionados em um criostato a -20°C. O RNAm foi isolado usando o kit de isolamento de RNA

PicoPure (Cellco), de acordo com o protocolo do fabricante. Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicatas no sistema Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR usando sondas TaqMan para CB<sub>1</sub> (CnR1- Rn02758689\_s1) e CB<sub>2</sub> (CnR2- Rn03993699\_s1) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH-Rn075, usado como o gene de controle endógeno). As amostras foram submetidas ao modelo de protocolo qPCR seguido: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, depois 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15s e anelamento e extensão a 60°C por 1 min. Os dados foram coletados usando o software 7500 Fast SDS versão 1.5.1 (Applied Biosystems). Todas as amostras geraram ciclos com valores limiares (Ct) dentro de uma faixa linear aceitável (entre 15 e 30 ciclos). O GAPDH foi altamente estável entre todas as amostras com variação menor que 1 Ct. Os cálculos da expressão relativa dos dados de Ct (valor exponencial) foram realizados usando a fórmula  $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{GAPDH})$ , conforme descrito por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; MORSE et al., 2005).

### **3.3. Implante de cânulas guias no NLET**

Como descrito no item 3.2., Capítulo 1.

### **3.4. Drogas e soluções utilizadas**

AM251 (N- (piperidin-1-il) -5- (4-iodofenil) -1- (2,4-diclo-rofenil) -4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida) (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>) (TOCRIS cat. # 1117, West-woods Business Park, Ellisville, MO, EUA) foi dissolvido em uma solução salina contendo 30% de DMSO (DMSO 30%). JTE907 (N- (1,3-Benzodioxol-5-ilmetil) -1,2-di-hidro-7-metoxi-2-oxo-8- (pentiloxi) -3-quinolinacarboxamida) (TOCRIS cat. # 2479) (antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>) foi dissolvido em DMSO. A uretana (Sigma-Aldrich; cat. # U2500) foi dissolvida em solução salina (NaCl a 0,9%). O anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine, Schering Plough, Cotia, SP, Brasil) e a preparação poliantibiótica de estreptomicinas e penicilinas (Pentabiotico, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) foram utilizadas como fornecido pelo fabricante.

### **3.5. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central**

Como descrito no item 3.7., Capítulo 1.

### **3.6. Labirinto em cruz elevado (LCE)**

O teste de LCE foi realizado como descrito anteriormente (BUSNARDO et al., 2013b; GOUVEIA et al., 2016; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). Resumidamente, o aparelho consistiu em dois braços abertos opostos (50x10 cm) cruzados em ângulo reto por dois braços das mesmas dimensões, cercados por paredes com 40 cm de altura e sem teto. O labirinto estava localizado 50 cm acima do chão. Os ratos foram colocados individualmente no centro do aparelho e foram permitidos explorar livremente o LCE por 5 minutos. O aparelho foi limpo com uma solução de álcool (20%) antes de cada sessão para evitar que ratos subsequentes fossem influenciados por odores depositados pelo rato anterior. O comportamento foi gravado por uma câmera (Microsoft lifecam cinema HD) conectada a um microcomputador, e os comportamentos foram analisados pelo software de rastreamento comportamental ANY-maze® (Stoelting, Wood Dale, IL, EUA). Os roedores evitam naturalmente os braços abertos no LCE e os fármacos ansiolíticos geralmente aumentam a exploração desses braços sem alterar o número de entradas nos braços fechados (Carobrez e Bertoglio, 2005; Pellow e File, 1986). Portanto, as medidas comportamentais foram a frequência de entradas nos braços fechados (BF) e a porcentagem de entradas (% EBA) e de tempo (% TBA) nos braço aberto .

### **3.7. Estresse por restrição agudo**

Como descrito no item 3.8., Capítulo 1.

### **3.8. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no NLET**

Como descrito no item 3.9., Capítulo 1.

### **3.9. Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os resultados da expressão gênica foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) bifatorial, com regiões do cérebro (NLET versus CPFm) e tipo de receptor (receptores CB<sub>1</sub> versus CB<sub>2</sub>) como fatores independentes. Os parâmetros de análise comportamental foram analisados usando ANOVA monofatorial. Quando a ANOVA indicou efeito significativo, o teste post-hoc de Bonferroni foi utilizado para avaliar diferenças específicas entre os grupos experimentais.  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram trazidos para a sala experimental em suas próprias caixas. Os animais foram permitidos pelo menos 60 minutos para se adaptarem às condições da sala experimental, como som e iluminação, antes de iniciar os experimentos. A sala experimental teve a temperatura controlada (24°C) e era isolada acusticamente das outras salas.

### **4.1. Análise da expressão gênica dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET e CPFm**

Ratos *naïves* foram eutanasiados por decapitação e os cérebros foram rapidamente removidos e armazenados em um freezer a -80°C até o processamento. As divisões anterior e posterior do NLET e o CPFm foram coletadas por microdissecção e as amostras foram processadas para quantificação dos níveis de RNAm dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. A expressão dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no CPFm foi realizada como um controle positivo, uma vez que a expressão de ambos os receptores endocanabinóides foi relatada nessa estrutura cortical em estudos anteriores (BYSTROWSKA et al., 2018, 2019; NAVARRETE; PÉREZ-ORTIZ; MANZANARES, 2012; SANCHEZ-MARIN et al., 2020, 2017).

#### **4.2. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) no NLET anterior nas respostas comportamentais no LCE (ansiedade inata)**

Este protocolo teve como objetivo investigar um envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide NLET atuando através do receptor CB<sub>1</sub> na ansiedade inata no LCE. Para esse fim, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET anterior de diferentes doses (1, 30 ou 100 pmol/100nL) do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) ou veículo (100nL) (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016, 2020). Dez minutos após o tratamento do NLET, os animais foram expostos ao LCE por 5 minutos.

#### **4.3. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) no NLET anterior nas alterações comportamentais no LCE evocadas pelo estresse de restrição**

Este protocolo teve como objetivo investigar um envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no NLET atuando através do receptor CB<sub>1</sub> no efeito ansiogênico observado no LCE evocado por uma sessão aguda de estresse por restrição. Para esse fim, os animais foram divididos em três grupos experimentais: (i) grupo *naïve*, que não foi submetido ao estresse de restrição e não foi tratado farmacologicamente; (ii) grupo veículo, no qual veículo (100nL) foi microinjetado bilateralmente no NLET 10 minutos antes da exposição ao estresse de restrição; e (iii) grupo AM251, no qual o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> AM251 (100pmol/100nL) foi microinjetado bilateralmente no NLET 10 min antes da sessão de estresse de restrição. Imediatamente após o final da sessão de restrição, todos os ratos foram testados no LCE.

#### **4.4. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> (JTE907) no NLET anterior nas respostas comportamentais no LCE (ansiedade inata)**

Este protocolo teve como objetivo investigar um envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide NLET atuando através do receptor CB<sub>2</sub> na ansiedade inata no LCE. Para este fim, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET anterior de diferentes doses (0,05, 5 ou 25 pmol/100nL) do antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> (JTE907) ou veículo (100nL). As doses de JTE907 foram determinadas a partir de seus valores de ki

em relação aos valores reportados para AM251 (valores de  $K_i$ : AM251 8,1nM e JT907 0,38nM) (ALEXANDER et al., 2017; IWAMURA et al., 2001; LAN et al., 1999). Dez minutos após o tratamento com NLET, os animais foram expostos ao LCE por 5 minutos.

#### **4.5. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> (JTE907) no NLET anterior nas alterações comportamentais no LCE evocadas pelo estresse de restrição**

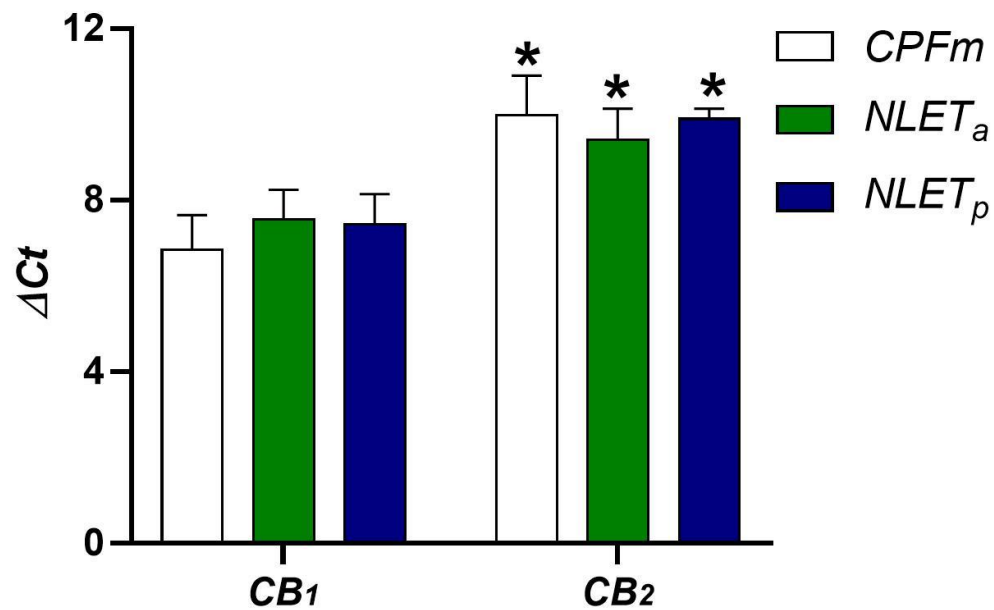
Este protocolo teve como objetivo investigar um envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide NLET, atuando através do receptor CB<sub>2</sub>, no efeito ansiogênico observado no LCE evocado pelo estresse de restrição agudo. Para esse fim, os animais foram divididos em três grupos experimentais: (i) grupo *naive*, que não foi submetido ao estresse de restrição e não foi tratado farmacologicamente; (ii) grupo veículo, no qual veículo (100nL) foi microinjetado bilateralmente no NLET 10 minutos antes da exposição ao estresse de restrição; e (iii) grupo JTE907, cujo antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> (5 pmol/100nL) foi microinjetado bilateralmente no NLET 10 minutos antes da sessão de restrição. Imediatamente após o final da sessão de restrição, todos os ratos foram testados no LCE.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Expressão gênica dos receptores endocanabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET e no CPFm**

Foi realizado um ensaio quantitativo de RT-qPCR para comparar a expressão basal dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> nas divisões anterior e posterior do NLET e no CPFm de ratos Wistar *naives* (Figura 24). A análise ANOVA bifatorial indicou um efeito significativo do tipo de receptor ( $F_{(1,42)} = 145,8$ ,  $P < 0,0001$ ) e interação do tipo receptor x regiões do cérebro ( $F_{(2,42)} = 3,2$ ,  $P = 0,05$ ), mas sem efeito significativo das regiões do cérebro ( $F_{(2,42)} = 0,51$ ,  $P = 0,6014$ ) (Figura 24). A análise post-hoc revelou que os valores de  $\Delta Ct$  do gene do receptor CB<sub>2</sub> (CNR2) foram maiores que a do gene do receptor CB<sub>1</sub> (CNR1) em todas as regiões encefálicas analisadas (Figura 24).

### (qRT-PCR) expressão gênica RNAm

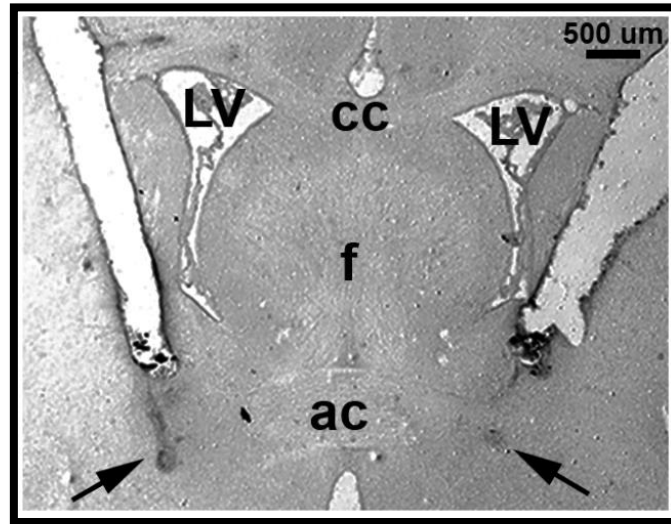


**Figura 24 - Gráfico de expressão gênica (RNAm) dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET e CPFm.** Análise da expressão gênica (RNAm) dos receptores endocanabinóides no núcleo do leito da estria terminal (NLET) e no córtex pré-frontal medial (CPFm).  $\Delta$ Ct do gene do receptor CB<sub>1</sub> (CNR1) e do gene do receptor CB<sub>2</sub> (CNR2) nas divisões CPFm (barras brancas) e anterior (NLET anterior, barras verdes) e posterior (NLET posterior, barras azuis) do NLET. Os dados representaram média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). \*  $P < 0,05$  em relação ao receptor CB<sub>1</sub> na mesma região do cérebro. ANOVA bifatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.



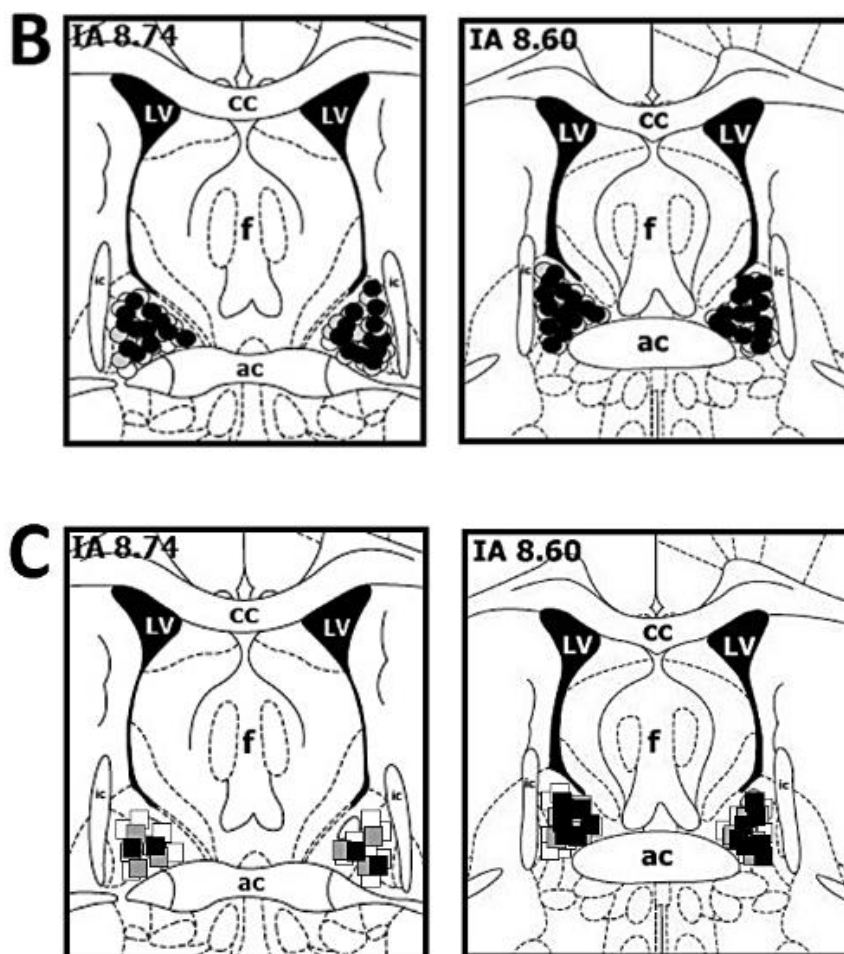
## 5.2. Papel dos receptores CB<sub>1</sub> no NLET no controle de comportamentos semelhantes à ansiedade

A figura 25 mostra uma fotomicrografia de um corte coronal histológico ilustrando o sítio de injeção no NLET.

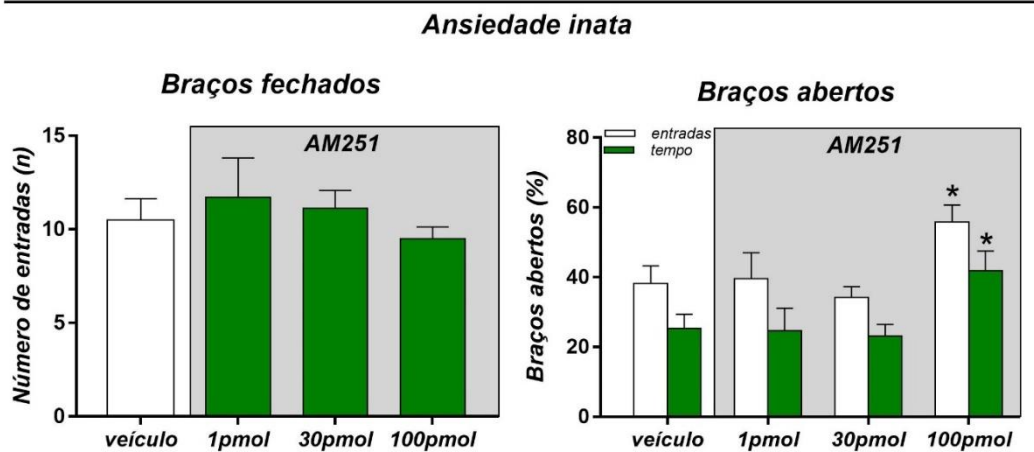


**Figura 25 - Corte histológico referente a microinjeção no NLET.** Fotomicrografia de um corte coronal histológico do encéfalo de um animal representativo, que ilustra os sítios de microinjeção no NLET e as setas indicam os sítios de microinjeção no NLET. ac: comissura anterior; cc: corpo caloso; f: fórnix, LV: ventrículo lateral.

**Ansiedade inata** - A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> AM251 (1, 30 e 100 pmol/100 nL) no NLET causou efeito significativo no percentual de tempo gasto ( $F_{(3,32)} = 3,98$ ,  $P = 0,0164$ ) e de entradas ( $F_{(3,32)} = 4,69$ ,  $P = 0,0079$ ) nos braços abertos do LCE (Figura 27). A análise post-hoc revelou que a microinjeção de AM251 no NLET na dose de 100pmol/100nL aumentou a porcentagem de tempo gasto ( $P = 0,0240$ ) e entradas ( $P = 0,0140$ ) nos braços abertos (Figura 27). O tratamento do NLET com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> não afetou o número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,32)} = 0,69$ ,  $P = 0,5607$ ) (Figura 27). A Figura 26 apresenta a representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.



**Figura 26 - Representação diagramática referentes os grupos antagonistas CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET**, baseada no atlas cerebral de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para avaliação do envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> (AM251 - antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> local e/ou receptor CB<sub>2</sub> (JTE907 antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> local (B) e avaliar a resposta ansiogênica ao estresse por restrição aguda via CB<sub>1</sub> e/ou CB<sub>2</sub> (C). Veículo: círculos brancos; (AM251) 1, 30 e 100pmol: círculos cinzentos; (JTE907) 0,05, 5 e 25pmol: círculos pretos; Veículo (estresse): quadrados brancos, (AM251) 100pmol estresse: quadrados cinzentos, (JTE907) 5pmol estresse: quadrados pretos, 3V: terceiro ventrículo; ac: comissura anterior; f: fornix; IA: coordenada interaural; ic: cápsula interna; st: estria terminal.

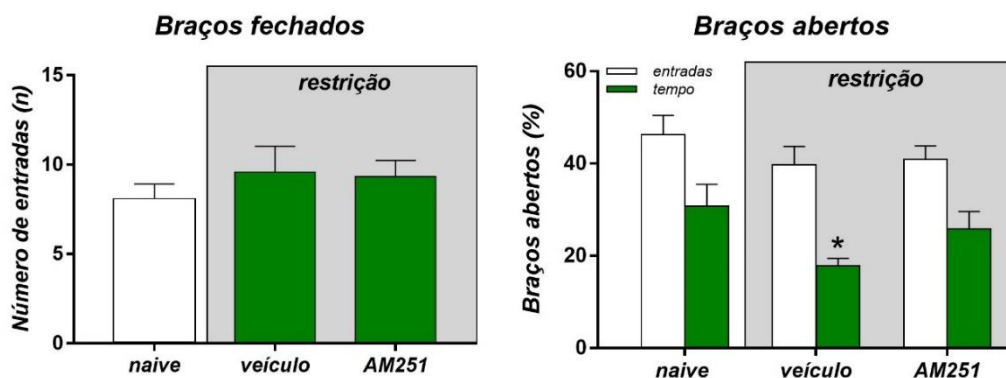
Antagonista  $CB_1$  intra-NLET

**Figura 27 - Gráficos referentes a ansiedade inata (AM251 no NLET).** Papel dos receptores  $CB_1$  na divisão anterior do núcleo leito da estria terminal (NLET) no controle de comportamentos do tipo ansiedade. Porcentagem de tempo gasto e entradas em braços abertos (gráfico à direita) e número de entradas em braços fechados (gráfico à esquerda) do labirinto em cruz elevado (LCE) em animais que receberam microinjeção bilateral no NLET de diferentes doses (1, 30 ou 100pmol/100nL) do antagonista seletivo do receptor  $CB_1$  AM251 ou veículo (100nL). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo veículo ( $n=7-11$ /grupo). ANOVA monofatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.

**Efeito ansiogênico desencadeado pela restrição** - O estresse da restrição agudo diminuiu significativamente a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE em animais tratados com veículo ( $F_{(2,28)} = 3,9$ ,  $P = 0,0333$ ), quando comparados com os animais *naive* (Figura 28). No entanto, o estresse de restrição não afetou a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(2,28)} = 0,82$ ,  $P = 0,4492$ ) e o número de entradas nos braços fechados ( $F_{(2,28)} = 0,46$ ,  $P = 0,6342$ ) (Figura 28). O tratamento do NLET com AM251 (100pmol/100nL) reverteu a diminuição causada pela restrição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE ( $P = 0,3995$ ) (Figura 28). A Figura 26 apresenta representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.

Antagonista  $CB_1$  intra-NLET

## Resposta ansiogênica pelo estresse



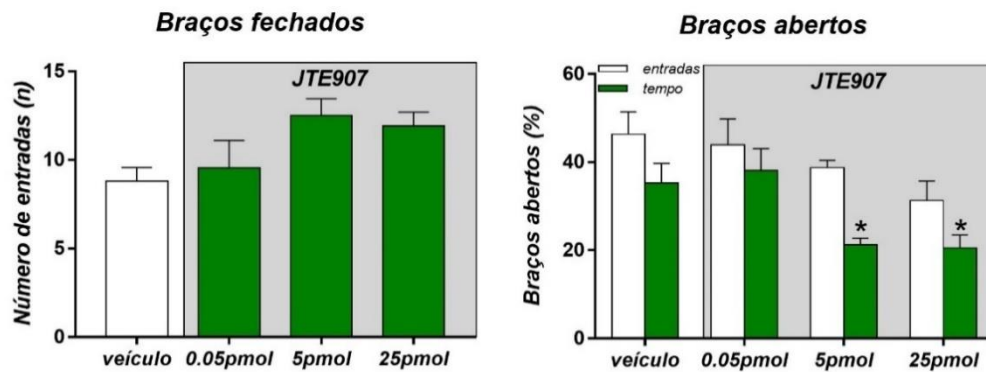
**Figura 28 - Gráficos referentes a resposta ansiogênica pelo estresse (AM251 no NLET).** Efeito da microinjeção bilateral de AM251 (100pmol/100nL) ou veículo (100nL) no NLET nas alterações comportamentais no LCE desencadeadas pelo estresse agudo de restrição. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (grupo ingênuo) foram utilizados como controle. O tratamento do NLET foi realizado 10 minutos antes do início da restrição. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo ingênuo ( $n = 9-12$ /grupo). ANOVA monofatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.

### 5.3. Papel dos receptores CB<sub>2</sub> no NLET no controle de comportamentos semelhantes à ansiedade

**Ansiedade inata** - A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> JTE907 (0,05, 5 e 25 pmol/100 nL) no NLET afetou significativamente a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,33)} = 6,7$ ,  $P = 0,0013$ ) (Figura 29). A análise post-hoc revelou que o JTE907 nas doses de 5 ( $P = 0,0178$ ) e 25 pmol/100nl ( $P = 0,0148$ ) diminuiu o tempo gasto nos braços abertos (Figura 28). O tratamento no NLET com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> não afetou a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(3,33)} = 2,1$ ,  $P = 0,1088$ ) (Figura 29). A análise indicou efeito do tratamento farmacológico do NLET no número de entradas em braços fechados ( $F_{(3,33)} = 2,8$ ,  $P = 0,0498$ ), mas a análise post-hoc não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 29). A Figura 26 apresenta representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.

Antagonista  $CB_2$  intra-NLET

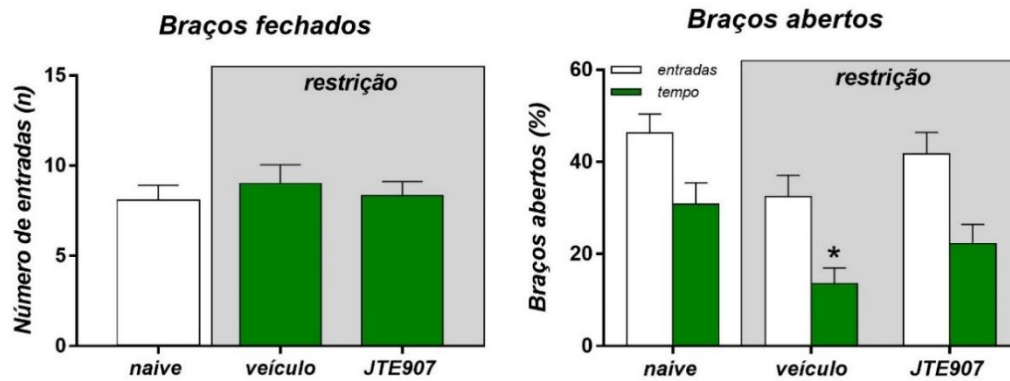
## Ansiedade inata



**Figura 29 - Gráficos referentes a ansiedade inata (JTE907 no NLET).** Papel dos receptores  $CB_2$  na divisão anterior do núcleo leito da estria terminal (NLET) no controle de comportamentos do tipo ansiedade. Porcentagem de tempo gasto e entradas em braços abertos (gráfico à direita) e número de entradas em braços fechados (gráfico à esquerda) do labirinto em cruz elevado (EPM) em animais que receberam microinjeção bilateral no NLET de diferentes doses (0,05 , 5 ou 25 pmol/100nL) do antagonista seletivo do receptor  $CB_2$  (JTE907) ou veículo (100nL). As colunas representam as médias  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo veículo ( $n=8-10$ /grupo). ANOVA monofatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.



**Efeito ansiogênico evocado por restrição** – O estresse de restrição agudo diminuiu significativamente a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE em animais tratados com veículo ( $F_{(2,25)} = 4,2$ ,  $P = 0,0254$ ), quando comparados aos animais *naïve* (Figura 30). No entanto, o estresse de restrição não afetou a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(2,25)} = 2,4$ ,  $P = 0,1076$ ) e o número de entradas nos braços fechados ( $F_{(2,25)} = 0,27$ ,  $P = 0,7598$ ) (Figura 30). A microinjeção de JTE907 (5 pmol/100nL) no NLET inibiu a diminuição causada pela restrição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE ( $P = 0,3196$ ) (Figura 30). A Figura 26 apresenta a representação diagramática dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.

*Antagonista CB<sub>2</sub> intra-NLET***Resposta ansiogênica pelo estresse**

**Figura 30 - Gráficos referentes a resposta ansiogênica pelo estresse (JTE907 no NLET).** Efeito da microinjeção bilateral de JTE907 (5 pmol/100nL) ou veículo (100nL) no NLET nas alterações comportamentais no LCE evocadas por estresse agudo de restrição. Os animais que não foram expostos ao estresse de restrição (grupo ingênuo) foram utilizados como controle. O tratamento do NLET foi realizado 10 minutos antes do início da restrição. As colunas representam as médias  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo ingênuo ( $n = 9-10$ /grupo). ANOVA monofatorial seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.

## **6. DISCUSSÃO**

Este estudo demonstra pela primeira vez a presença de receptores CB<sub>2</sub> no NLET. A análise da expressão gênica do receptor CB<sub>1</sub> também fornece novas evidências de que esse receptor está presente no NLET posterior, além da porção anterior. A análise comportamental indicou um envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> presente no NLET na expressão da ansiedade inata e da resposta ansiogênica evocada pelo estresse de restrição. Por outro lado, os dados relatados aqui sugerem que os receptores CB<sub>2</sub> no NLET suprimem a ansiedade inata. Entretanto, nossos dados fornecem evidências de que o controle exercido pelo receptor CB<sub>2</sub> depende de experiências estressantes prévia, de modo que em animais estressados esse receptor está envolvido na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Os dados aqui relatados também confirmaram a presença de ambos os receptores endocanabinóides no CPFm.

A identificação de receptores CB<sub>1</sub> no NLET está de acordo com vários relatos prévios (LANGE et al., 2017; MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993; PUENTE et al., 2010, 2011; TSOU et al., 1998). No entanto, todos esses estudos anteriores avaliaram apenas a porção anterior do NLET, de modo que o presente estudo é o primeiro a relatar a expressão do receptor CB<sub>1</sub> na divisão posterior. Até onde sabemos, os resultados aqui relatados também são os primeiros a demonstrar a presença de receptores CB<sub>2</sub> no NLET. Quantificamos a expressão dos receptores endocanabinóides no CPFm como controle positivo, de modo que a identificação dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> nessa estrutura cortical está de acordo com evidências prévias (BYSTROWSKA et al., 2018, 2019; ORTEGA-ALVARO et al., 2011; SANCHEZ-MARIN et al., 2020, 2017). Em todas as regiões encefálicas analisadas, identificamos que os valores de  $\Delta Ct$  do receptor CB<sub>2</sub> foram maiores que aqueles do receptor CB<sub>1</sub>. Considerando que os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra, nossos resultados indicam que os receptores CB<sub>1</sub> são mais expressos do que os receptores CB<sub>2</sub> no CPFm e no NLET. Esse achado também está de acordo com evidências anteriores de que os receptores CB<sub>2</sub> têm expressão mais baixa do que os receptores CB<sub>1</sub> no encéfalo (CHEN et al., 2017; MECHOULAM; PARKER, 2013).

O NLET posterior está conectado à estruturas cerebrais límbicas, e algumas evidências indicaram seu papel no controle de comportamentos relacionados à ansiedade (HENCKENS et al., 2017; KLAMPFL; BOSCH, 2019). No entanto, a maioria das informações disponíveis descreve um envolvimento do NLET anterior no controle dos comportamentos de ansiedade (DANIEL; RAINNIE, 2016; GUNGOR; PARE, 2016), de modo que o papel da porção posterior nas respostas emocionais é pouco compreendido. Além disso, todos os estudos do sistema endocanabinoide no NLET, incluindo dados anteriores de nosso grupo (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016, 2020), investigaram regiões do NLET anterior. Portanto, a fim de proporcionar um avanço nos dados disponíveis, os locais de microinjeção nos experimentos comportamentais do presente estudo atingiram o NLET anterior. No entanto, o presente estudo fornece evidências da presença do sistema endocanabinoide no NLET posterior, de modo que outros estudos serão necessários para a completa caracterização desse mecanismo neuroquímico e seu papel nas respostas emocionais e fisiológicas ao estresse.

O NLET anterior participa na expressão e supressão de comportamentos semelhantes à ansiedade em roedores. Esses papéis opostos parecem ser mediados por diferentes circuitos, tipos neuronais e sub-regiões no NLET (DANIEL; RAINNIE, 2016; GUNGOR; PARE, 2016). Por exemplo, a ativação dos terminais de neurônios do NLET na amígdala central (CeA) produziu efeitos ansiogênicos no LCE (YAMAUCHI et al., 2018), enquanto a ativação dos terminais de neurônios do NLET no HL evocou efeitos do tipo ansiolíticos no campo aberto (CA) e no LCE (KIM et al., 2013). Além disso, a ativação dos terminais glutamatérgicos do NLET na área tegmental ventral (ATV) evocou respostas ansiogênicas, enquanto a ativação das projeções GABAérgicas do NLET na ATV causou efeitos ansiolíticos (JENNINGS et al., 2013). Os neurônios do NLET podem ser classificados eletrofisiologicamente em cinco tipos (GUNGOR; PARE, 2016). Um estudo recente identificou que os neurônios do NLET que se projetam para a CeA são principalmente do tipo II, enquanto as projeções para o HL e a ATV são do tipo III (YAMAUCHI et al., 2018), indicando que diferentes tipos de neurônios também podem mediar os papéis opostos do NLET na ansiedade. A seguir, discutimos os resultados relatados no presente

estudo no contexto dessas vias do NLET envolvidas no controle de comportamentos relacionados à ansiedade.

### **6.1. Receptores CB<sub>1</sub>, NLET e ansiedade**

Os receptores CB<sub>1</sub> foram identificados em terminais glutamatérgicos e GABAérgicos no NLET (PUENTE et al., 2010), e estudos eletrofisiológicos evidenciaram que a ativação desse receptor endocanabinóide inibe as neurotransmissões excitatórias e inibitórias locais (BEDSE et al., 2019; MASSI et al., 2008; PUENTE et al., 2010). Estudos anteriores relataram que o tratamento sistêmico com AM251 aumentou a ativação de neurônios do NLET evocada pelo estresse (NEWSOM et al., 2012, 2020), sugerindo que o receptor CB<sub>1</sub> localizado nos terminais glutamatérgicos, e não nos terminais GABAérgicos, sejam ativados durante ameaças aversivas. Conseqüentemente, identificamos que o controle das alterações cardiovasculares ao estresse de restrição pelo receptor CB<sub>1</sub> no NLET foi mediado por uma interação com a neurotransmissão glutamatérgica local (ver Capítulo 1). Portanto, parece que o papel ansiogênico dos receptores CB<sub>1</sub> no NLET evidenciado no presente estudo parece ser principalmente mediado pela inibição da liberação local de glutamato. Nesse sentido, a ativação do receptor CB<sub>1</sub> no terminal glutamatérgico pode inibi-lo (BEDSE et al., 2019; MASSI et al., 2008; PUENTE et al., 2010), o que, por sua vez, pode inativar as vias ansiolíticas do NLET para o HL e/ou a ATV, aumentando assim comportamentos relacionados à ansiedade. Essa idéia é apoiada pela demonstração de que os neurônios GABAérgicos no NLET que se projetam para a ATV (ou seja, saída ansiolítica) são inibidos durante ameaças aversivas (Jennings et al., 2013), e a ativação do receptor 5-HT<sub>2C</sub> no NLET (que exibe efeito ansiogênico) inibe as aferências ansiolíticas para o HL e a ATV (MARCINKIEWCZ et al., 2016). Este mecanismo glutamatérgico proposto é diferente daquele relacionado às alterações comportamentais no LCE após o tratamento do NLET com antagonistas dos receptores glutamatérgicos, que evidenciaram um papel ansiogênico da neurotransmissão glutamatérgica local do NLET (FARIA et al., 2016; KIM et al., 2013). No entanto, a ideia de mecanismos glutamatérgicos opostos está alinhada com a evidência da presença de mecanismos ansiogênicos e ansiolíticos no NLET (DANIEL;

RAINNIE, 2016; JENNINGS et al., 2013; KIM et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2018).

Nossos resultados indicaram que os receptores CB<sub>1</sub> no NLET também estão envolvidos na expressão da resposta ansiogênica evocada pelo estresse de restrição, o que indica que o controle dos comportamentos de ansiedade por esse receptor endocanabinóide no NLET não é afetado pela experiência anterior de estresse. Um estudo anterior identificou que o efeito ansiogênico observado em animais *naive* no LCE após o tratamento do hipocampo ventral (HV) com um inibidor da captação de anandamida se transformou em efeito do tipo ansiolítico em animais submetidos ao estresse de restrição anteriormente (ou seja, a facilitação endocanabinóide inibiu a resposta ansiogênica evocada pela restrição) (CAMPOS et al., 2010), indicando assim que o controle dos comportamentos de ansiedade pelo sistema endocanabinóide no HV é influenciado por experiências anteriores de estresse. Como todos os efeitos do inibidor da captação de anandamida no HV foram mediados pelo receptor CB<sub>1</sub> (CAMPOS et al., 2010), os resultados aqui relatados, juntamente com essas evidências anteriores, indicam que a influência da experiência prévia do estresse no controle do comportamento da ansiedade pelo receptor CB<sub>1</sub> é dependente dos sítios específicos no encéfalo. Os mecanismos locais relacionados ao envolvimento do receptores CB<sub>1</sub> no NLET na resposta ansiogênica causada pela restrição são possivelmente semelhantes aos do controle da ansiedade inata (ver discussão acima) e parecem não estar relacionados ao envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> no NLET na plasticidade funcional local evocada pelo estresse (GLANGETAS et al., 2013). Assim, estudos anteriores relataram um papel dos receptores colinérgicos muscarínicos e CRF<sub>1</sub> do NLET na resposta ansiogênica evocada pelo estresse (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; GOUVEIA et al., 2016; POMRENZE et al., 2019). Nesse sentido, as evidências da expressão do receptor CB<sub>1</sub> em terminais colinérgicos (KATONA; FREUND, 2012; NYÍRI et al., 2005) e colocalização do receptor CB<sub>1</sub> e do fator de liberação de corticotropina (CRF) no NLET (COTA et al., 2007), a resposta ansiogênica evocada pela restrição parece não ser mediada pela inibição dos terminais colinérgicos e CRF no NLET, uma vez que o bloqueio dos receptores CB<sub>1</sub>

resultaria em aumento da liberação desses neurotransmissores, o que por sua vez aumentaria a resposta ansiogênica à restrição.

## 6.2. Receptores CB<sub>2</sub>, NLET e ansiedade

Assim como os receptores CB<sub>1</sub>, os receptores CB<sub>2</sub> são receptores metabotrópicos acoplados a Gi/o (CHEN et al., 2017; DHOPEHWARKAR; MACKIE, 2014). No entanto, o mecanismo de sinalização do receptor CB<sub>2</sub> parece ser diferente e mais complexo em relação ao CB<sub>1</sub>. Por exemplo, foi identificada a expressão intracelular de receptores CB<sub>2</sub> em células piramidais do CPFm de roedores, no qual reduziu a excitabilidade via abertura dependente de IP3R dos canais cloreto ativados por cálcio (DEN BOON et al., 2012). Além disso, um estudo recente forneceu evidências da presença de receptores CB<sub>2</sub> nos neurônios piramidais do hipocampo, que foram posicionados pós-sinápticamente e reduziram a excitabilidade por meio de uma ação intrínseca das células e ativação do co-transportador de sódio/bicarbonato (STEMPEL et al., 2016). Portanto, diferentemente dos receptores CB<sub>1</sub>, os receptores CB<sub>2</sub> parecem estar localizados pós-sinápticamente (CHEN et al., 2017; PATEL et al., 2017; YIN; WANG; ZHANG, 2019), o que pode explicar os efeitos opostos dos receptores endocanabinóides (como evidenciado aqui) (CHEN et al., 2017). Apesar da proposição de que os receptores CB<sub>2</sub> podem exibir menos efeitos psicotrópicos em relação aos receptores CB<sub>1</sub> (DHOPEHWARKAR; MACKIE, 2014), nossos achados estão em linha com evidências anteriores de que o receptor CB<sub>2</sub> suprime a expressão do comportamento de ansiedade (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; BUSQUETS-GARCIA et al., 2011; ISHIGURO et al., 2018; ORTEGA-ALVARO et al., 2011). Nesse sentido, o presente estudo fornece a primeira evidência do NLET como um sítio cerebral mediando esse efeito comportamental. Considerando a evidência da localização pós-sináptica dos receptores CB<sub>2</sub>, a supressão do comportamento de ansiedade pelos receptores CB<sub>2</sub> no NLET pode ser mediada pela inibição de saídas ansiogênicas para o CeA e/ou a ATV.

Curiosamente, os receptores CB<sub>2</sub> no NLET exibiram um papel oposto no controle da resposta ansiogênica evocada pela restrição (ansiogênica) em relação à resposta em animais *naïves* expostos à LCE (ansiolítico). O

envolvimento na resposta ansiogênica à restrição pode ser mediado pela inibição de mecanismos ansiolíticos do NLET. Assim, em conjunto com os dados obtidos em animais *naive* expostos ao LCE (ansiedade inata), os resultados em animais estressados fornecem evidências iniciais de que o receptor CB<sub>2</sub> são expressos nos circuitos ansiogênico e ansiolítico no NLET. Esse papel diferente do receptor CB<sub>2</sub> na ansiedade inata e na resposta ansiogênica evocada pelo estresse é suportado por evidências anteriores mencionadas acima de que os receptores CB<sub>1</sub> do HV controlam de maneira diferente a ansiedade inata e a resposta ansiogênica evocada pelo estresse (CAMPOS et al., 2010). Influência semelhante de experiências estressantes anteriores foi observada para o efeito do tratamento do CPFm com canabidiol (CBD) em comportamentos de ansiedade (FOGAÇA et al., 2014). No entanto, como os efeitos do inibidor da captação de anandamida no HV foram mediados pelo receptor CB<sub>1</sub> e os do CBD no CPFm ocorreram através do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, os resultados relatados aqui fornecem a primeira evidência de uma influência da experiência do estresse no controle do comportamento da ansiedade pelo receptor CB<sub>2</sub>. Embora os mecanismos relacionados à influência do estresse no controle comportamental pelo sistema endocanabinóide sejam desconhecidos, ele pode estar relacionado a diferenças na intensidade do protocolo, uma vez que um estudo anterior relatou que o aumento do comportamento de ansiedade no LCE em camundongos com deficiência CB<sub>1</sub> foi identificado apenas quando a intensidade da luz era alta (ou seja, mais estressante) (HALLER et al., 2004). No entanto, mais estudos são necessários para abordar os mecanismos relacionados aos diferentes papéis do receptor CB<sub>2</sub> no NLET no controle da ansiedade inata e da resposta ansiogênica evocada pelo estresse.

## **7. CONCLUSÃO**

Em resumo, o presente estudo fornece evidências da presença de receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no NLET anterior e posterior. Além disso, nossos resultados indicam que ambos os receptores endocanabinóides no NLET anterior estão envolvidos no controle de comportamentos relacionados à ansiedade. O receptor CB<sub>1</sub> no NLET medeia a expressão de comportamentos de ansiedade, independentes da experiência estressante anterior. Por outro lado, o



receptor CB<sub>2</sub> no NLET suprime a ansiedade inata, mas a experiência com o estresse transformou o controle em uma influência ansiogênica. Os dados aqui relatados também confirmaram a presença de ambos os receptores endocanabinóides no CPFm.

CONCLUSÃO FINAL

---

## **CONCLUSÃO FINAL**

Em conjunto, os dados obtidos nessa tese indicam que a neurotransmissão endocanabinóide no NLET, age via receptor CB<sub>1</sub>, interagem com as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica locais para a modulação da resposta taquicárdica durante situações aversivas. Análise das respostas comportamentais relacionadas à ansiedade sugerem que ambos os receptores endocanabinóides (CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>) presentes no NLET anterior estão envolvidos no controle de comportamentos relacionados à ansiedade inata e no controle da resposta ansiogênica desencadeada pelo estresse emocional. Por fim, os nossos achados fornecem evidências da interação entre o NLET e o HL, mediado por diminuição na liberação de GABA e ativação do receptor GABA<sub>A</sub> no HL após a ativação do receptor CB<sub>1</sub> no NLET, o que resulta em aumento na ativação neuronal nesse núcleo hipotalâmico e uma inibição da resposta taquicárdica ao estresse emocional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMI, Mariane B.; BARRETTO-DE-SOUZA, Lucas; DUARTE, Josiane O.; ALMEIDA, Jeferson; CRESTANI, Carlos C. Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 674–681, 2017. DOI: 10.1177/0269881117691468. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28198211>.

ALEXANDER, Stephen PH et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 174, p. S17–S129, 2017. DOI: 10.1111/bph.13878. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.13878>.

ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 1–39, 1988. DOI: 10.1016/0306-4522(88)90217-5.

ALLEN, G. V; CECHETTO, D. F. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area: I. Descending projections. **The Journal of comparative neurology**, [S. l.], v. 315, n. 3, p. 313–32, 1992. DOI: 10.1002/cne.903150307. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740546>.

ALMEIDA-SANTOS, A. F.; GOBIRA, P. H.; ROSA, L. C.; GUIMARAES, F. S.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C. Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 252, p. 10–17, 2013. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.05.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.027>.

ALVES, Fernando H. F.; CRESTANI, Carlos C.; CORRÊA, Fernando M. A. The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Brain Research**, [S. l.], v. 1333, p. 57–63, 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.03.077. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.077>.

ALVES, Fernando H. F.; CRESTANI, Carlos C.; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORREA, Fernando M. A. Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. **Journal of neuroscience research**, [S. l.], v. 87, n. 7, p. 1703–11, 2009. DOI: 10.1002/jnr.21974. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156861>.

BALE, Tracy L.; VALE, Wylie W. CRF AND CRF RECEPTORS : Role in Stress Responsivity and Other Behaviors . **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 525–557, 2004. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410.

BARRETTO-DE-SOUZA, Lucas; ADAMI, Mariane B.; BENINI, Ricardo; CRESTANI, Carlos C. Dual role of nitrgergic neurotransmission in the bed nucleus

of the stria terminalis in control of cardiovascular responses to emotional stress in rats. **British journal of pharmacology**, [S. l.], 2018. a. DOI: 10.1111/bph.14447. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30007000>.

BARRETTO-DE-SOUZA, Lucas; ADAMI, Mariane B.; OLIVEIRA, Leandro A.; GOMES-DE-SOUZA, Lucas; DUARTE, Josiane O.; ALMEIDA, Jeferson; CRESTANI, Carlos C. Nitric oxide-cGMP-PKG signaling in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the cardiovascular responses to stress in male rats. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 75–84, 2018. b. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2017.11.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.11.015>.

BEDSE, Gaurav; CENTANNI, Samuel W.; WINDER, Danny G.; PATEL, Sachin. **Endocannabinoid Signaling in the Central Amygdala and Bed Nucleus of the Stria Terminalis: Implications for the Pathophysiology and Treatment of Alcohol Use Disorder**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1111/acer.14159. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/acer.14159>.

BEIG, Mirza I.; DAMPNEY, Bruno W.; CARRIVE, Pascal. Both Ox1r and Ox2r orexin receptors contribute to the cardiovascular and locomotor components of the novelty stress response in the rat. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 89, p. 146–156, 2015. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.09.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390814003190>.

BENINI, Ricardo; OLIVEIRA, Leandro A.; GOMES-DE-SOUZA, Lucas; CRESTANI, Carlos C. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 151–161, 2019. DOI: 10.1080/10253890.2018.1532992. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1532992>.

BENINI, Ricardo; OLIVEIRA, Leandro A.; GOMES-DE-SOUZA, Lucas; RODRIGUES, Bruno; CRESTANI, Carlos C. Habituation of the cardiovascular response to restraint stress is inhibited by exposure to other stressor stimuli and exercise training. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 223, n. 8, 2020. DOI: 10.1242/jeb.219501.

BERTHOUD, Hans-Rudi; MÜNZBERG, Heike. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: From electrical self-stimulation to opto-genetics. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 29–39, 2011. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.04.051. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938411002101>.

BISOGNO, Tiziana; LIGRESTI, Alessia; DI MARZO, Vincenzo. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 81, n. 2 SPEC. ISS., p. 224–238, 2005. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.01.027.

BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. **Cellular and molecular neurobiology**, [S. l.], v. 23, n. 4–5, p. 527–38, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514013>.

BORNSTEIN, S. R.; CHROUSOS, G. P. Adrenocorticotropin (ACTH)- and Non-ACTH-Mediated Regulation of the Adrenal Cortex: Neural and Immune Inputs. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 84, n. 5, p. 1729–1736, 1999. DOI: 10.1210/jcem.84.5.5631. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.84.5.5631>.

BOUDABA, C.; SZABÓ, K.; TASKER, J. G. Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 22, p. 7151–60, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929424>.

BRISKI, Karen; GILLEN, Eileen. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 401–408, 2001. DOI: 10.1016/S0361-9230(01)00532-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923001005329>.

BURT, Julia; ALBERTO, Christian O.; PARSONS, Matthew P.; HIRASAWA, Michiru. Local network regulation of orexin neurons in the lateral hypothalamus. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 3, p. R572–R580, 2011. DOI: 10.1152/ajpregu.00674.2010. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00674.2010>.

BUSNARDO, Cristiane; ALVES, Fernando H. F.; CRESTANI, Carlos C.; SCOPINHO, América A.; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORREA, Fernando M. A. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 1611–1622, 2013. a. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.11.002.

BUSNARDO, Cristiane; ALVES, Fernando H. F.; CRESTANI, Carlos C.; SCOPINHO, América A.; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORREA, Fernando M. A. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 1611–22, 2013. b. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.11.002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201369>.

BUSNARDO, Cristiane; CRESTANI, Carlos C.; TAVARES, Rodrigo F.; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORREA, Fernando M. A. Cardiovascular responses to l-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. **Brain Research**, [S. l.], v. 1344, p. 87–95, 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.05.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.023>.

BUSQUETS-GARCIA, Arnau; PUIGHERMANAL, Emma; PASTOR, Antoni; DE LA TORRE, Rafael; MALDONADO, Rafael; OZAITA, Andrés. Differential Role of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Memory and Anxiety-like Responses. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 479–486, 2011. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.04.022. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322311004409>.

BYSTROWSKA, Beata; FRANKOWSKA, Małgorzata; SMAGA, Irena; NIEDZIELSKA-ANDRES, Ewa; POMIERNY-CHAMIOŁO, Lucyna; FILIP, Małgorzata. Cocaine-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking Provokes Changes in the Endocannabinoid and N-Acylethanolamine Levels in Rat Brain Structures. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 1125, 2019. DOI: 10.3390/molecules24061125. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1125>.

BYSTROWSKA, Beata; FRANKOWSKA, Małgorzata; SMAGA, Irena; POMIERNY-CHAMIOŁO, Lucyna; FILIP, Małgorzata. Effects of Cocaine Self-Administration and Its Extinction on the Rat Brain Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. **Neurotoxicity Research**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 547–558, 2018. DOI: 10.1007/s12640-018-9910-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12640-018-9910-6>.

CALHOON, Gwendolyn G.; TYE, Kay M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015. DOI: 10.1038/nn.4101. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nn.4101>.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; GUIMARÃES, F. S.; LEMOS, J. I. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. **Neuroscience**, [S. l.], v. 167, n. 2, p. 238–46, 2010. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.062. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167262>.

CARRIVE, Pascal. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 1251–4, 2006. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04519.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184510>.

CARRIVE, Pascal. Orexin, Stress and Central Cardiovascular Control. A Link with Hypertension? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 74, p. 376–392, 2017. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.044. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763416301592>.

CH'NG, Sarah; FU, Jingjing; BROWN, Robyn M.; MCDUGALL, Stuart J.; LAWRENCE, Andrew J. The intersection of stress and reward: BNST modulation of aversive and appetitive states. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, [S. l.], n. August 2017, p. 108–125, 2018. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.01.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.01.005>.

CHACHLAKI, Konstantina; PREVOT, Vincent. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], p. bph.14800, 2019. DOI: 10.1111/bph.14800. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bph.14800>.

CHAN, J. Y. H.; CHAN, S. H. H.; LI, F. C. H.; TSAI, C. Y.; CHENG, H. L.; CHANG, A. Y. W. Phasic cardiovascular responses to mevinphos are mediated through differential activation of cGMP/PKG cascade and peroxyntirite via nitric oxide generated in the rat rostral ventrolateral medulla by NOS I and II isoforms.



**Neuropharmacology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 161–72, 2005. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.08.012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617736>.

CHEN, De-jie; GAO, Ming; GAO, Fen-fei; SU, Quan-xi; WU, Jie. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 312–316, 2017. DOI: 10.1038/aps.2016.149. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2016.149>.

CHOI, Dennis C.; FURAY, Amy R.; EVANSON, Nathan K.; OSTRANDER, Michelle M.; ULRICH-LAI, Yvonne M.; HERMAN, James P. Bed Nucleus of the Stria Terminalis Subregions Differentially Regulate Hypothalamic – Pituitary – Adrenal Axis Activity: Implications for the Integration of Limbic Inputs. **Animals**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 2025–2034, 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007.

COTA, Daniela et al. Requirement of Cannabinoid Receptor Type 1 for the Basal Modulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function. **Endocrinology**, [S. l.], v. 148, n. 4, p. 1574–1581, 2007. DOI: 10.1210/en.2005-1649. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2005-1649>.

CRAVEN, Kimberley B.; ZAGOTTA, William N. CNG and HCN channels: two peas, one pod. **Annual review of physiology**, [S. l.], v. 68, p. 375–401, 2006. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460277>.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H. F.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 268–278, 2009. a. DOI: 10.1080/10253890802331477. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10253890802331477>.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H. F.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. a. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 268–278, 2009. b. DOI: 10.1080/10253890802331477. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18850495>.

CRESTANI, Carlos; ALVES, Fernando; GOMES, Felipe; RESSTEL, Leonardo; CORREA, Fernando; HERMAN, James. Mechanisms in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Involved in Control of Autonomic and Neuroendocrine Functions: A Review. **Current Neuropharmacology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 141–159, 2013. a. DOI: 10.2174/1570159X11311020002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997750>.

CRESTANI, Carlos C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 7, n. June, 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00251. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00251/abstract>.

CRESTANI, Carlos C.; ALVES, Fernando H. F.; BUSNARDO, Cristiane; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORREA, Fernando M. A. N-Methyl-d-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neuroscience**

**Research**, [S. I.], v. 67, n. 4, p. 317–326, 2010. DOI: 10.1016/j.neures.2010.05.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2010.05.001>.

CRESTANI, Carlos C.; ALVES, Fernando Hf; GOMES, Felipe V; RESSTEL, Leonardo Bm; CORREA, Fernando Ma; HERMAN, James P. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. **Current neuropharmacology**, [S. I.], v. 11, n. 2, p. 141–59, 2013. b. DOI: 10.2174/1570159X11311020002. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3637669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, [S. I.], v. 64, n. 2, p. 477–505, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700534>.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; WATSON, S. J. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. **The Journal of comparative neurology**, [S. I.], v. 332, n. 1, p. 1–20, 1993. DOI: 10.1002/cne.903320102. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685778>.

DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Autonomic Neuroscience**, [S. I.], v. 142, n. 1–2, p. 3–10, 2008. DOI: 10.1016/j.autneu.2008.07.005. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070208001288>.

DAMPNEY, Roger A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, [S. I.], v. 309, n. 5, p. R429-43, 2015. DOI: 10.1152/ajpregu.00051.2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26041109>.

DANIEL, Sarah E.; RAINNIE, Donald G. Stress Modulation of Opposing Circuits in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **Neuropsychopharmacology**, [S. I.], v. 41, n. 1, p. 103–125, 2016. DOI: 10.1038/npp.2015.178. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npp2015178>.

DAVIS, Michael; WALKER, David L.; MILES, Leigh; GRILLON, Christian. Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. **Neuropsychopharmacology**, [S. I.], v. 35, n. 1, p. 105–135, 2010. DOI: 10.1038/npp.2009.109. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npp2009109>.

DE OLMOS, J.; BELTAMINO, C.A.; ALHEID, G. F. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. In: **Paxinos G, editor. The rat nervous system**, [S. I.], v. 3 ed, n. Elsevier: Amsterdam, p. 509–603, 2004, 2004.

DECAVEL, Chantal; VAN DEN POL, Anthony N. GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**,

[S. I.], v. 302, n. 4, p. 1019–1037, 1990. DOI: 10.1002/cne.903020423. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.903020423>.

DEN BOON, F. S. et al. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. I.], v. 109, n. 9, p. 3534–3539, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1118167109. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1118167109>.

DEOLINDO, Milena V.; REIS, Daniel G.; CRESTANI, Carlos C.; TAVARES, Rodrigo F.; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORRÊA, Fernando M. A. NMDA receptors in the lateral hypothalamus have an inhibitory influence on the tachycardiac response to acute restraint stress in rats. **The European journal of neuroscience**, [S. I.], v. 38, n. 3, p. 2374–81, 2013. DOI: 10.1111/ejn.12246. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668726>.

DEVANE, William a et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science (New York, N.Y.)**, [S. I.], v. 258, n. 5090, p. 1946–9, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470919>.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behavior, and Immunity**, [S. I.], v. 11, n. 4, p. 286–306, 1997.

DHABHAR, Firdaus S. The power of positive stress—a complementary commentary. **Stress**, [S. I.], v. 22, n. 5, p. 526–529, 2019. DOI: 10.1080/10253890.2019.1634049. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1634049>.

DHOPESHWARKAR, Amey; MACKIE, Ken. CB 2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target—What Does the Future Hold? **Molecular Pharmacology**, [S. I.], v. 86, n. 4, p. 430–437, 2014. DOI: 10.1124/mol.114.094649. Disponível em: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.114.094649>.

DINCHEVA, Iva et al. FAAH genetic variation enhances fronto-amygdala function in mouse and human. **Nature Communications**, [S. I.], v. 6, n. 1, p. 6395, 2015. DOI: 10.1038/ncomms7395. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncomms7395>.

DINH, T. P.; CARPENTER, D.; LESLIE, F. M.; FREUND, T. F.; KATONA, I.; SENSI, S. L.; KATHURIA, S.; PIOMELLI, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. I.], v. 99, n. 16, p. 10819–24, 2002. DOI: 10.1073/pnas.152334899. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/99/16/10819>.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain research. Brain research reviews**, [S. I.], v. 38, n. 1–2, p. 192–246, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750933>.

DONG, Hong-Wei; SWANSON, Larry W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. **The Journal of comparative neurology**, [S. I.], v. 468, n. 2, p. 277–98, 2004. DOI:

10.1002/cne.10949. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14648685>.

DOS REIS, Daniel Gustavo; FORTALEZA, Eduardo Albino Trindade; TAVARES, Rodrigo Fiacadori; CORRÊA, Fernando Morgan Aguiar. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 362–72, 2014. DOI: 10.3109/10253890.2014.930429. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903268>.

DUARTE, Josiane O.; GOMES, Karina S.; NUNES-DE-SOUZA, Ricardo L.; CRESTANI, Carlos C. Role of the lateral preoptic area in cardiovascular and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 175, n. December 2016, p. 16–21, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.030. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.030>.

DUARTE, Josiane O.; PLANETA, Cleopatra S.; CRESTANI, Carlos C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [S. l.], v. 40, p. 52–59, 2015. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2014.11.004. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.004>.

ELPHICK, Maurice R.; EGERTOVA, Michaela. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 356, n. 1407, p. 381–408, 2001. DOI: 10.1098/rstb.2000.0787. Disponível em:  
<http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2000.0787>.

FARIA, M. P.; LAVERDE, C. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenesis induced by social defeat in male mice: Role of nitric oxide, NMDA, and CRF1 receptors in the medial prefrontal cortex and BNST. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 166, p. 107973, 2020. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.107973. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390820300393>.

FARIA, M. P.; MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 79, p. 74–83, 2016. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2016.01.002. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.01.002>.

FASSINI, Aline; SCOPINHO, América A.; ALVES, Fernando H. F.; FORTALEZA, Eduardo A. T.; CORRÊA, Fernando M. A. The medial preoptic area modulates autonomic function under resting and stress conditions. **Neuroscience**, [S. l.], v. 364, p. 164–174, 2017. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.09.026. Disponível em:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645221730670X>.

FERREIRA-JUNIOR, Nilson C.; FEDOCE, Alessandra G.; ALVES, Fernando H. F.; CORRÊA, Fernando M. A.; RESSTEL, Leonardo B. M. Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, [S. l.], v. 302, n. 7, p. R876-85, 2012. DOI: 10.1152/ajpregu.00330.2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22204950>.

FOGAÇA, M. V.; REIS, F. M. C. V.; CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 410–419, 2014. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2013.10.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X1300309X>.

FOX, Andrew S.; SHACKMAN, Alexander J. The central extended amygdala in fear and anxiety: Closing the gap between mechanistic and neuroimaging research. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 693, p. 58–67, 2019. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.11.056. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394017309655>.

FRANCISCHETTI, Emilio Antonio; DE ABREU, Virginia Genelhu. O sistema endocanabinóide: Nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 548–558, 2006. DOI: 10.1590/s0066-782x2006001700023.

FURLONG, Teri M.; MCDOWALL, Lachlan M.; HORIUCHI, Jouji; POLSON, Jaimie W.; DAMPNEY, Roger A. L. The effect of air puff stress on c-Fos expression in rat hypothalamus and brainstem: central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1429–1438, 2014. DOI: 10.1111/ejn.12521. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/ejn.12521>.

FURLONG, Teri M.; VIANNA, Daniel M. L.; LIU, Lu; CARRIVE, Pascal. Hypocretin /orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 30, n. 8, p. 1603–1614, 2009. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06952.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2009.06952.x>.

GARCIA-GARCIA, A. L.; CANETTA, S.; STUJENSKE, J. M.; BURGHARDT, N. S.; ANSORGE, M. S.; DRANOVSKY, A.; LEONARDO, E. D. Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT1A receptor-dependent manner. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1990–1997, 2018. DOI: 10.1038/mp.2017.165. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/mp2017165>.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, [S. l.], v. 336, n. 6197, p. 385–8, 1988. DOI: 10.1038/336385a0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904125>.

GARTHWAITE, John. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **The European journal of neuroscience**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 2783–802, 2008. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588525>.

GARTHWAITE, John. Nitric oxide as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. [S. l.], 2019. DOI: 10.1111/bph.14532.

GENG, Fei et al. Neuregulin 1-ErbB4 signaling in the bed nucleus of the stria terminalis regulates anxiety-like behavior. **Neuroscience**, [S. l.], v. 329, p. 182–192, 2016. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.05.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452216301671>.

GLANGETAS, Christelle; GIRARD, Delphine; GROU, Laurent; MARSICANO, Giovanni; CHAOULOFF, Francis; GEORGES, François. Stress switches cannabinoid type-1 (CB1) receptor-dependent plasticity from LTD to LTP in the bed nucleus of the stria terminalis. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 50, p. 19657–63, 2013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3175-13.2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336729>.

GOMES-DE-SOUZA, Lucas; BENINI, Ricardo; COSTA-FERREIRA, Willian; CRESTANI, Carlos C. GABAA but not GABAB receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardic response to emotional stress in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2019.03.001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30878320>.

GOMES-DE-SOUZA, Lucas; COSTA-FERREIRA, Willian; OLIVEIRA, Leandro A.; BENINI, Ricardo; CRESTANI, Carlos C. Cannabinoid receptor type 1 in the bed nucleus of the stria terminalis modulates cardiovascular responses to stress via local N-methyl-D-aspartate receptor/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/protein kinase G signaling. **Journal of Psychopharmacology**, [S. l.], v. 01, 2020. DOI: 10.1177/0269881119897556.

GOMES-DE-SOUZA, Lucas; OLIVEIRA, Leandro A.; BENINI, Ricardo; RODELLA, Patrícia; COSTA-FERREIRA, Willian; CRESTANI, Carlos C. Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 173, n. 19, p. 2833–44, 2016. DOI: 10.1111/bph.13560. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27441413>.

GOMES, F. V.; REIS, D. G.; ALVES, F. H.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S.; RESSTEL, L. B. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. **Journal of Psychopharmacology**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 104–113, 2012. DOI: 10.1177/0269881110389095.

GOMES, Felipe V.; ALVES, Fernando H. F.; GUIMARÃES, Francisco S.; CORREA, Fernando M. A.; RESSTEL, Leonardo B. M.; CRESTANI, Carlos C. Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT1A receptor. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 1096–1104, 2013. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.09.007.

GOMES, Felipe V.; RESSTEL, Leonardo B. M.; GUIMARÃES, Francisco S. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 213, n. 2–3, p. 465–473, 2011. DOI: 10.1007/s00213-010-2036-z.

GONG, Jian-ping; ONAIVI, Emmanuel S.; ISHIGURO, Hiroki; LIU, Qing-rong; TAGLIAFERRO, Patricia A.; BRUSCO, Alicia; UHL, George R. Cannabinoid CB2 receptors : Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain research**, [S. l.], v. 71, p. 10–23, 2006. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.11.035.

GOUVEIA, Marianna K.; MIGUEL, Tarciso T.; BUSNARDO, Cristiane; SCOPINHO, América A.; CORRÊA, Fernando M. A.; NUNES-DE-SOUZA, Ricardo L.; CRESTANI, Carlos C. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 101, p. 379–88, 2016. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26477570>.

GRAY, T. S.; MAGNUSON, D. J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. **The Journal of comparative neurology**, [S. l.], v. 262, n. 3, p. 365–74, 1987. DOI: 10.1002/cne.902620304. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3655018>.

GRIPPO, Angela J.; BELTZ, Terry G.; WEISS, Robert M.; JOHNSON, Alan Kim. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 309–316, 2006. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.07.010.

GRIPPO, Angela J.; MOFFITT, Julia A.; JOHNSON, Alan Kim. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 282, n. 5 51-5, p. 1333–1341, 2002. DOI: 10.1152/ajpregu.00614.2001.

GRIPPO, Angela J.; MOFFITT, Julia A.; JOHNSON, Alan Kim. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosomatic Medicine**, [S. l.], v. 70, n. 4, p. 435–443, 2008. DOI: 10.1097/PSY.0b013e31816ff7dd.

GRITTI, I.; MAINVILLE, L.; JONES, B. E. Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. **The Journal of comparative neurology**, [S. l.], v. 339, n. 2, p. 251–68, 1994. DOI: 10.1002/cne.903390206. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300907>.

GUIMARÃES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; DE LUCCA, A. C. B. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [S. l.], v. 29, n. 8, p. 1313–22, 2005. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.026. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095696>.

GULYAS, A. I.; CRAVATT, B. F.; BRACEY, M. H.; DINH, T. P.; PIOMELLI, D.; BOSCIA, F.; FREUND, T. F. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 441–458, 2004. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03428.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2004.03428.x>.

GUNGOR, N. Z.; PARE, D. Functional Heterogeneity in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 36, n. 31, p. 8038–8049, 2016. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0856-16.2016. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0856-16.2016>.

HALLER, J.; VARGA, B.; LEDENT, C.; BARNÁ, I.; FREUND, T. F. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 1906–1912, 2004. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03293.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2004.03293.x>.

HAO, Sijia et al. The Lateral Hypothalamic and BNST GABAergic Projections to the Anterior Ventrolateral Nucleus The Lateral Hypothalamic and BNST GABAergic Projections to the Anterior Ventrolateral Periaqueductal Gray Regulate Feeding. **Cell Reports**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 616–624.e5, 2019. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.051. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.051>.

HEITLAND, I.; KLUMPERS, F.; OOSTING, R. S.; EVERS, D. J. J.; LEON KENEMANS, J.; BAAS, J. M. P. Failure to extinguish fear and genetic variability in the human cannabinoid receptor 1. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. e162–e162, 2012. DOI: 10.1038/tp.2012.90. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/tp201290>.

HENCKENS, M. J. A. G. et al. CRF receptor type 2 neurons in the posterior bed nucleus of the stria terminalis critically contribute to stress recovery. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 1691–1700, 2017. DOI: 10.1038/mp.2016.133. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/mp2016133>.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 87, n. 5, p. 1932–6, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2308954>.

HERMAN, James P.; MCKLVEEN, Jessica M.; GHOSAL, Sriparna; KOPP, Brittany; WULSIN, Aynara; MAKINSON, Ryan; SCHEIMANN, Jessie; MYERS, Brent. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 603–621, 2016. DOI: 10.1002/cphy.c150015.Regulation. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065163><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4867107>.

HILL, M. N.; TASKER, J. G. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroscience**, [S. l.], v. 204, p. 5–16, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.030. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22214537>.

HILL, Matthew N.; MCEWEN, Bruce S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 791–797, 2010. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.11.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.001>.



HOFMANN, F.; FEIL, R.; KLEPPISCH, T.; SCHLOSSMANN, J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. **Physiological reviews**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 1–23, 2006. DOI: 10.1152/physrev.00015.2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371594>.

HOSOYA, Y.; MATSUSHITA, M. Cells of origin of the descending afferents to the lateral hypothalamic area in the rat, studied with the horseradish peroxidase method. **Neuroscience letters**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 231–6, 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189023>.

HOTT, Sara C.; GOMES, Felipe V.; ULIANA, Daniela L.; VALE, Gabriel T.; TIRAPELLI, Carlos R.; RESSTEL, Leonardo B. M. Bed nucleus of the stria terminalis NMDA receptors and nitric oxide modulate contextual fear conditioning in rats. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 112, p. 135–143, 2017. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.05.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.022>.

HOTT, Sara C.; GOMES, Felipe V.; FABRI, Denise R. S.; REIS, Daniel G.; CRESTANI, Carlos C.; CÔRREA, Fernando M. A.; RESSTEL, Leonardo B. M. Both  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 167, n. 1, p. 207–21, 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01985.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506532>.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological reviews**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 161–202, 2002. a. DOI: 10.1124/pr.54.2.161.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 161–202, 2002. b. DOI: 10.1124/pr.54.2.161.

HOWLETT, Allyn C.; BREIVOGEL, Christopher S.; CHILDERS, Steven R.; DEADWYLER, Samuel A.; HAMPSON, Robert E.; PORRINO, Linda J. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 Years of progress. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 47, n. SUPPL. 1, p. 345–358, 2004. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.07.030.

ISHIGURO, Hiroki; HORIUCHI, Yasue; TABATA, Koichi; LIU, Qing-Rong; ARINAMI, Tadao; ONAIVI, Emmanuel. Cannabinoid CB2 Receptor Gene and Environmental Interaction in the Development of Psychiatric Disorders. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1836, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081836. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/8/1836>.

IWAMURA, H.; SUZUKI, H.; UEDA, Y.; KAYA, T.; INABA, T. In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [S. l.], v. 296, n. 2, p. 420–5, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160626>.

IWATA, J.; LEDOUX, J. E.; REIS, D. J. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. **Brain research**, [S. l.], v. 368, n. 1, p.

161–6, 1986. DOI: 10.1016/0006-8993(86)91055-3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3955355>.

JENNINGS, J. H.; RIZZI, G.; STAMATAKIS, A. M.; UNG, R. L.; STUBER, G. D. The Inhibitory Circuit Architecture of the Lateral Hypothalamus Orchestrates Feeding. **Science**, [S. l.], v. 341, n. 6153, p. 1517–1521, 2013. DOI: 10.1126/science.1241812. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1241812>.

JONES, Kenneth R.; MYERS, Brent; HERMAN, James P. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 104, n. 2, p. 266–71, 2011. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.03.021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443894>.

KANO, Masanobu; OHNO-SHOSAKU, Takako; HASHIMOTODANI, Yuki; UCHIGASHIMA, Motokazu; WATANABE, Masahiko. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 309–380, 2009. DOI: 10.1152/physrev.00019.2008.

KATONA, István; FREUND, Tamás F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annual review of neuroscience**, [S. l.], v. 35, p. 529–58, 2012. DOI: 10.1146/annurev-neuro-062111-150420. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524785>.

KAYABA, Yuji; NAKAMURA, Akira; KASUYA, Yoshitoshi; OHUCHI, Takashi; YANAGISAWA, Masashi; KOMURO, Issei; FUKUDA, Yasuichiro; KUWAKI, Tomoyuki. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 285, n. 3, p. R581–R593, 2003. DOI: 10.1152/ajpregu.00671.2002. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00671.2002>.

KIM, Sung-yon et al. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. **Nature**, [S. l.], p. 2–6, 2013. DOI: 10.1038/nature12018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12018>.

KIVIMÄKI, Mika; STEPTOE, Andrew. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 215–229, 2018. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.189. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.189>.

KLAMPFL, Stefanie M.; BOSCH, Oliver J. When mothers neglect their offspring: an activated CRF system in the BNST is detrimental for maternal behavior. **Archives of Women's Mental Health**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 409–415, 2019. DOI: 10.1007/s00737-018-0897-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00737-018-0897-z>.

KONADHODE, Roda Rani; PELLURU, Dheeraj; SHIROMANI, Priyattam J. Neurons containing orexin or melanin concentrating hormone reciprocally regulate wake and sleep. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [S. l.], v. 8, 2015. DOI: 10.3389/fnsys.2014.00244. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2014.00244/abstract>.

KOREM, Nachshon; ZER-AVIV, Tomer Mizrahi; GANON-ELAZAR, Eti; ABUSH, Hila; AKIRAV, Irit. Targeting the endocannabinoid system to treat anxiety-related disorders. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 27, n. 3, 2016. DOI: 10.1515/jbcpp-2015-0058. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/jbcpp.2016.27.issue-3/jbcpp-2015-0058/jbcpp-2015-0058.xml>.

KUBO, Takao; NUMAKURA, Hiroyuki; ENDO, Shuji; HAGIWARA, Yukihiro; FUKUMORI, Ryuji. Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 569–574, 2001. DOI: 10.1016/S0361-9230(01)00729-8. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923001007298>.

KUPFERSCHMIDT, D. A.; KLAS, P. G.; ERB, S. Cannabinoid CB 1 receptors factor on the reinstatement of cocaine seeking and expression of cocaine-induced behavioural sensitization. [S. l.], 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01983.x.

KUPFERSCHMIDT, D. A.; NEWMAN, A. E. Review antagonism of cannabinoid 1 receptors reverses the anxiety-like behavior induced by central injections of corticotropin-releasing factor and cocaine withdrawal. **NSC**, [S. l.], v. 204, p. 125–133, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.07.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.022>.

KVETNANSKY, R.; MCCARTY, R.; THOA, N. B.; LAKE, C. R.; KOPIN, I. J. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. **The American journal of physiology**, [S. l.], v. 236, n. 3, p. H457-62, 1979. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/426081>.

LAN, R.; LIU, Q.; FAN, P.; LIN, S.; FERNANDO, S. R.; MCCALLION, D.; PERTWEE, R.; MAKRIYANNIS, A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. **Journal of medicinal chemistry**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 769–76, 1999. DOI: 10.1021/jm980363y. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10052983>.

LANGE, M. D. et al. Cannabinoid CB1 receptors in distinct circuits of the extended amygdala determine fear responsiveness to unpredictable threat. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 1422–1430, 2017. DOI: 10.1038/mp.2016.156. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/mp2016156>.

LEBOW, M. A.; CHEN, A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. **Molecular psychiatry**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 450–63, 2016. DOI: 10.1038/mp.2016.1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26878891>.

LEE, Younglim; DAVIS, Michael. Role of the Hippocampus, the Bed Nucleus of the Stria Terminalis, and the Amygdala in the Excitatory Effect of Corticotropin-Releasing Hormone on the Acoustic Startle Reflex. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 16, p. 6434–6446, 1997. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-16-06434.1997. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06434.1997>.

LIGRESTI, Alessia; CASCIO, Maria Grazia; DI MARZO, Vincenzo.

Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. **Current drug targets. CNS and neurological disorders**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 615–23, 2005. DOI: 10.2174/156800705774933104. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375679>.

LISBOA, S. F.; GOMES, F. V.; TERZIAN, A. L. B.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; RESSTEL, L. B. M.; GUIMARÃES, F. S. The Endocannabinoid System and Anxiety. *In*: [s.l: s.n.]. p. 193–279. DOI: 10.1016/bs.vh.2016.09.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672916300486>.

LISBOA, Sabrina F.; RESSTEL, Leonardo B. M.; AGUIAR, Daniele C.; GUIMARÃES, Francisco S. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 593, n. 1–3, p. 73–8, 2008. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.07.032. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691568>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>.

LUITEN, P. G. M.; TER HORST, G. J.; STEFFENS, A. B. The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 1–54, 1987. DOI: 10.1016/0301-0082(87)90004-9. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0301008287900049>.

LUTZ, Beat; MARSICANO, Giovanni; MALDONADO, Rafael; HILLARD, Cecilia J. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], 2015. DOI: 10.1038/nrn4036.

MACKIE, K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. **International journal of obesity (2005)**, [S. l.], v. 30 Suppl 1, p. S19-23, 2006. DOI: 10.1038/sj.ijo.0803273. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570100>.

MARCINKIEWCZ, Catherine A. et al. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. **Nature**, [S. l.], v. 537, n. 7618, p. 97–101, 2016. DOI: 10.1038/nature19318. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature19318>.

MASSI, Léma; ELEZGARAI, Izaskun; PUENTE, Nagore; REGUERO, Leire; GRANDES, Pedro; MANZONI, Olivier J.; GEORGES, François. Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 28, n. 42, p. 10496–508, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2291-08.2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923026>.

MATSUDA, L. A.; BONNER, T. I.; LOLAIT, S. J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. **The Journal of comparative neurology**, [S. l.], v. 327, n. 4, p. 535–50, 1993. DOI: 10.1002/cne.903270406. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440779>.

MCEWEN, B. Allostasis and Allostatic Load Implications for Neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 108–124, 2000. DOI: 10.1016/S0893-133X(99)00129-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2012.45>.

MCKINNEY, Michele K.; CRAVATT, Benjamin F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. **Annual review of biochemistry**, [S. l.], v. 74, p. 411–32, 2005. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133450. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952893>.

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual review of psychology**, [S. l.], v. 64, p. 21–47, 2013. DOI: 10.1146/annurev-psych-113011-143739. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804774>.

MESSINA, Michelina M.; OVERTON, J. Michael. Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. **Regulatory Peptides**, [S. l.], v. 139, n. 1–3, p. 23–30, 2007. DOI: 10.1016/j.regpep.2006.08.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167011506001613>.

MILES, Olivia W.; MAREN, Stephen. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in PTSD: Insights from preclinical models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 13, n. April, p. 1–14, 2019. DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00068.

MOISIADIS, Vasilis G.; MATTHEWS, Stephen G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 391–402, 2014. DOI: 10.1038/nrendo.2014.73. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.73>.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; TERZIAN, A. L. B.; GUIMARÃES, F. S.; WOTJAK, C. T. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety—two sides of one coin? **Neuroscience**, [S. l.], v. 204, p. 186–192, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.046. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452211009882>.

MOREIRA, Fabrício A.; CRIPPA, José Alexandre S. The psychiatric side-effects of rimonabant. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 145–153, 2009. DOI: 10.1590/S1516-44462009000200012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462009000200012&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462009000200012&lng=en&tlng=en).

MORENA, Maria; PATEL, Sachin; BAINS, Jaideep S.; HILL, Matthew N. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 80–102, 2016. DOI: 10.1038/npp.2015.166. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.166>.

MORSE, David L.; CARROLL, Danielle; WEBERG, Lyndon; BORGSTROM, Mark C.; RANGER-MOORE, James; GILLIES, Robert J. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 342, n. 1, p. 69–77, 2005. DOI: 10.1016/j.ab.2005.03.034. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269705002332>.

MOTTA, Simone Cristina; CANTERAS, Newton Sabino. Restraint stress and social defeat: What they have in common. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 146, p. 105–110, 2015. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.03.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938415001559>.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, [S. l.], v. 365, n. 6441, p. 61–5, 1993. DOI: 10.1038/365061a0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689702>.

MYERS, Brent; MARK DOLGAS, C.; KASCKOW, John; CULLINAN, William E.; HERMAN, James P. Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain structure & function**, [S. l.], v. 219, n. 4, p. 1287–303, 2014. DOI: 10.1007/s00429-013-0566-y. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23661182>.

MYERS, Brent; MCKLVEEN, Jessica M.; HERMAN, James P. Implications for the energetics of stress. [S. l.], v. 35, n. 2, p. 180–196, 2015. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.12.003.Glucocorticoid.

MYERS, Brent; MCKLVEEN, Jessica M.; MORANO, Rachel; ULRICH-LAI, Yvonne M.; SOLOMON, Matia B.; WILSON, Steven P.; HERMAN, James P. Vesicular Glutamate Transporter 1 Knockdown in Infralimbic Prefrontal Cortex Augments Neuroendocrine Responses to Chronic Stress in Male Rats. **Endocrinology**, [S. l.], v. 158, n. 10, p. 3579–3591, 2017. DOI: 10.1210/en.2017-00426. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28938481>.

MYERS, Brent; ULRICH-LAI, Yvonne M. Physiology & Behavior. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 172, p. 1–2, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.01.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.014>.

NAVARRETE, Francisco; PÉREZ-ORTIZ, José M.; MANZANARES, Jorge. Cannabinoid CB2 receptor-mediated regulation of impulsive-like behaviour in DBA/2 mice. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 165, n. 1, p. 260–273, 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01542.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01542.x>.

NEWSOM, R. J.; GARCIA, R. J.; STAFFORD, J.; OSTERLUND, C.; O'NEILL, C. E.; DAY, H. E. W.; CAMPEAU, S. Remote CB1 receptor antagonist administration reveals multiple sites of tonic and phasic endocannabinoid neuroendocrine regulation. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 113, p. 104549, 2020. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2019.104549. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453019312909>.

NEWSOM, R. J.; OSTERLUND, C.; MASINI, C. V.; DAY, H. E.; SPENCER, R. L.; CAMPEAU, S. Cannabinoid receptor type 1 antagonism significantly modulates basal and loud noise induced neural and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses in male Sprague-Dawley rats. **Neuroscience**, [S. l.], v. 204, p. 64–73, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.043. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138156>.

NYÍRI, Gábor; SZABADITS, Eszter; CSERÉP, Csaba; MACKIE, Ken; SHIGEMOTO, Ryuichi; FREUND, Tamás F. GABA B and CB 1 cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 3034–3042, 2005. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04146.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2005.04146.x>.

OKAMURA, H. et al. Neurons containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by in situ hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. **Neuroscience**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 675–699, 1990. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90252-Y. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030645229090252Y>.

OLIVEIRA, Leandro A.; ALMEIDA, Jeferson; BENINI, Ricardo; CRESTANI, Carlos C. CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Pharmacological research**, [S. l.], v. 95–96, p. 53–62, 2015. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.03.012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25829333>.

OLIVEIRA, Leandro A.; GOMES-DE-SOUZA, Lucas; BENINI, Ricardo; CRESTANI, Carlos C. Control of cardiovascular responses to stress by CRF in the bed nucleus of stria terminalis is mediated by local NMDA/nNOS/sGC/PKG signaling. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 89, n. July 2017, p. 168–176, 2018. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2018.01.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.01.010>.

ONAIVI, Emmanuel S. et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1074, p. 514–536, 2006. DOI: 10.1196/annals.1369.052.

ORTEGA-ALVARO, Antonio; ARACIL-FERNÁNDEZ, Auxiliadora; GARCÍA-GUTIÉRREZ, María S.; NAVARRETE, Francisco; MANZANARES, Jorge. Deletion of CB2 Cannabinoid Receptor Induces Schizophrenia-Related Behaviors in Mice. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 1489–1504, 2011. DOI: 10.1038/npp.2011.34. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npp201134>.

OSCAR, Charles Gonzaga; MÜLLER-RIBEIRO, Flávia Camargos de Figueirêdo; DE CASTRO, Lidiane Gonzaga; MARTINS LIMA, Augusto; CAMPAGNOLE-SANTOS, Maria José; SANTOS, Robson Augusto Souza; XAVIER, Carlos Henrique; FONTES, Marco Antônio Peliky. Angiotensin-(1–7) in the basolateral amygdala attenuates the cardiovascular response evoked by acute emotional stress. **Brain Research**, [S. l.], v. 1594, p. 183–189, 2015. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899314015534>.

PACHER, Pál; BÁTKAI, Sándor; KUNOS, George. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological reviews**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 389–462, 2006. DOI: 10.1124/pr.58.3.2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968947>.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an

elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 79–83, 2000. DOI: 10.1590/S0100-879X2000000100011.

PATEL, Sachin; HILL, Mathew N.; CHEER, Joseph F.; WOTJAK, Carsten T.; HOLMES, Andrew. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 76, p. 56–66, 2017. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.033. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763416304699>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press, San Diego**, [S. l.], v. 3rd, 1997.

POMRENZE, Matthew B.; TOVAR-DIAZ, Jorge; BLASIO, Angelo; MAIYA, Rajani; GIOVANETTI, Simone M.; LEI, Kelly; MORIKAWA, Hitoshi; HOPF, F. Woodward; MESSING, Robert O. A Corticotropin Releasing Factor Network in the Extended Amygdala for Anxiety. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1030–1043, 2019. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2143-18.2018. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2143-18.2018>.

PUENTE, Nagore; CUI, Yihui; LASSALLE, Olivier; LAFOURCADE, Mathieu; GEORGES, François; VENANCE, Laurent; GRANDES, Pedro; MANZONI, Olivier J. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1542–1547, 2011. DOI: 10.1038/nn.2974. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2974>.

PUENTE, Nagore; ELEZGARAI, Izaskun; LAFOURCADE, Mathieu; REGUERO, Leire; MARSICANO, Giovanni; GEORGES, François; MANZONI, Olivier J.; GRANDES, Pedro. Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. **PloS one**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. e8869, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0008869. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111610>.

RADLEY, Jason J.; GOSSELINK, Kristin L.; SAWCHENKO, Paul E. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 29, n. 22, p. 7330–40, 2009. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494154>.

RADLEY, Jason J.; JOHNSON, Shane B. Anteroventral bed nuclei of the stria terminalis neurocircuitry: Towards an integration of HPA axis modulation with coping behaviors - Curt Richter Award Paper 2017. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 89, p. 239–249, 2018. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.12.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306453017312969>.

REISIGER, Anne-ruth et al. Nicotine Self-Administration Induces CB1-Dependent LTP in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Stephanie Caille. [S. l.], v. 34, n. 12, p. 4285–4292, 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3149-13.2014.

RESSTEL, L. B. M.; ALVES, F. H. F.; REIS, D. G.; CRESTANI, C. C.; CORRÊA, F. M. A.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible



inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. **Neuroscience**, [S. l.], v. 154, n. 3, p. 869–876, 2008. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.007.

RODER, S.; CIRIELLO, J. Contribution of bed nucleus of the stria terminalis to the cardiovascular responses elicited by stimulation of the amygdala. **Journal of the autonomic nervous system**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 61–75, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227965>.

ROLAND, B. L.; SAWCHENKO, P. E. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 332, n. 1, p. 123–143, 1993. DOI: 10.1002/cne.903320109. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.903320109>.

ROM, Oren; REZNICK, Abraham Z. The Stress Reaction: A Historical Perspective. *In: Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration*. [s.l.: s.n.]. v. 6p. 1–4. DOI: 10.1007/5584\_2015\_195. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/5584\\_2015\\_195](http://link.springer.com/10.1007/5584_2015_195).

RYBALKIN, Sergei D.; YAN, Chen; BORNFELDT, Karin E.; BEAVO, Joseph A. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circulation research**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. 280–91, 2003. DOI: 10.1161/01.RES.0000087541.15600.2B. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933699>.

SAJDYK, TJ; JOHNSON, PL; FITZ, SD; SHEKHAR, A. Chronic inhibition of GABA synthesis in the bed nucleus of the stria terminalis elicits anxiety-like behavior. **Journal of Psychopharmacology**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 633–641, 2008. DOI: 10.1177/0269881107082902. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/mp2011182>.

SANCHEZ-MARIN, L. et al. Impact of intermittent voluntary ethanol consumption during adolescence on the expression of endocannabinoid system and neuroinflammatory mediators. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 33, p. 126–138, 2020. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2020.01.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X20300353>.

SANCHEZ-MARIN, Laura; PAVON, Francisco J.; DECARA, Juan; SUAREZ, Juan; GAVITO, Ana; CASTILLA-ORTEGA, Estela; RODRIGUEZ DE FONSECA, Fernando; SERRANO, Antonia. Effects of Intermittent Alcohol Exposure on Emotion and Cognition: A Potential Role for the Endogenous Cannabinoid System and Neuroinflammation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 11, 2017. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2017.00015/full>.

SANDERS, S. K.; MORZORATI, S. L.; SHEKHAR, A. Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala. **Brain Research**, [S. l.], v. 699, n. 2, p. 250–259, 1995. DOI: 10.1016/0006-8993(95)00915-D. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689939500915D>.

SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Regulation of anxiety by GABA receptors in the rat amygdala. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 701–706, 1995. DOI: 10.1016/0091-3057(95)00153-N. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009130579500153N>.

SANTOS, Abel Matos; CASTRO, Come D. E. Stress. *[S. l.]*, v. 4, p. 675–690, 1998.

SAPER, C. B.; LOEWY, A. D.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain research**, *[S. l.]*, v. 117, n. 2, p. 305–12, 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/62600>.

SCHADT, J. C.; HASSER, E. M. Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. **The American journal of physiology**, *[S. l.]*, v. 274, n. 3 Pt 2, p. R814-21, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530250>.

SCOPINHO, América A.; LISBOA, Sabrina F. S.; GUIMARÃES, Francisco S.; CORRÊA, Fernando M. A.; RESSTEL, Leonardo B. M.; JOCA, Sâmia R. L. Dorsal and Ventral Hippocampus Modulate Autonomic Responses but Not Behavioral Consequences Associated to Acute Restraint Stress in Rats. *[S. l.]*, v. 8, n. 10, p. 2–11, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0077750.

SGOIFO, Andrea; CARNEVALI, Luca; GRIPPO, Angela J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, *[S. l.]*, v. 39, p. 51–60, 2014. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.12.005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24373860>.

SICKLE, Marja D. Van et al. Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB 2 Receptors. **Science reports**, *[S. l.]*, v. 310, n. 2005, 2014. DOI: 10.1126/science.1115740.

SILBERMAN, Yuval; WINDER, Danny G. Emerging role for corticotropin releasing factor signaling in the bed nucleus of the stria terminalis at the intersection of stress and reward. **Frontiers in Psychiatry**, *[S. l.]*, v. 4, n. May, p. 1–12, 2013. DOI: 10.3389/fpsy.2013.00042.

SILVA, Michelle; AGUIAR, Daniele C.; DINIZ, Cassiano R. A.; GUIMARÃES, Francisco Silveira; JOCA, Sâmia R. L. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. **Cellular and molecular neurobiology**, *[S. l.]*, v. 32, n. 3, p. 443–53, 2012. DOI: 10.1007/s10571-011-9775-1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120186>.

SMITH, Daniel G.; DAVIS, Richard J.; RORICK-KEHN, Linda; MORIN, Michelle; WITKIN, Jeffrey M.; MCKINZIE, David L.; NOMIKOS, George G.; GEHLERT, Donald R. Melanin-Concentrating Hormone-1 Receptor Modulates Neuroendocrine, Behavioral, and Corticolimbic Neurochemical Stress Responses in Mice. **Neuropsychopharmacology**, *[S. l.]*, v. 31, n. 6, p. 1135–1145, 2006. DOI: 10.1038/sj.npp.1300913. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/1300913>.

SMITH, Daniel G.; HEGDE, Laxminarayan G.; WOLINSKY, Toni D.; MILLER, Silke; PAPP, Mariusz; PING, Xiaoli; EDWARDS, Tanya; GERALD, Christophe P.; CRAIG, Douglas A. The effects of stressful stimuli and hypothalamic–pituitary–adrenal axis activation are reversed by the melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847 in rodents. **Behavioural Brain Research**, *[S. l.]*, v. 197, n. 2, p. 284–291, 2009. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.08.026.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808004750>.

SOARES, José M.; SAMPAIO, Adriana; MARQUES, Paulo; FERREIRA, Luís M.; SANTOS, Nadine C.; MARQUES, Fernanda; PALHA, Joana A.; CERQUEIRA, João J.; SOUSA, Nuno. Plasticity of resting state brain networks in recovery from stress. **Frontiers in Human Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. DEC, p. 1–10, 2013. DOI: 10.3389/fnhum.2013.00919.

SOMERVILLE, Leah H.; WHALEN, Paul J.; KELLEY, William M. Human Bed Nucleus of the Stria Terminalis Indexes Hypervigilant Threat Monitoring. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 68, n. 5, p. 416–424, 2010. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.04.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322310003458>.

STANLEY, B. G.; URSTADT, K. R.; CHARLES, J. R.; KEE, T. Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 40–6, 2011. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.04.046. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550353>.

STEMPEL, A. Vanessa et al. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. **Neuron**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 795–809, 2016. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.03.034. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627316300253>.

STUBER, Garret D.; WISE, Roy A. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 198–205, 2016. DOI: 10.1038/nn.4220. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nn.4220>.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and biophysical research communications**, [S. l.], v. 215, n. 1, p. 89–97, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575630>.

TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL, L. B. M. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **Journal of neuroscience research**, [S. l.], v. 87, n. 11, p. 2601–7, 2009. DOI: 10.1002/jnr.22070. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19326445>.

TER HORST, G. J.; LUITEN, P. G.; KUIPERS, F. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguous nuclei in the rat. **Journal of the autonomic nervous system**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 59–75, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6470410>.

TSOU, K.; BROWN, S.; SAÑUDO-PEÑA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 393–411, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460749>.

ULRICH-LAI, Yvonne M.; HERMAN, James P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009. DOI: 10.1038/nrn2647. Disponível em:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2647>.

VERTES, Robert P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 32–58, 2004. DOI: 10.1002/syn.10279. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14579424>.

VIANNA, Daniel M. L.; CARRIVE, Pascal. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **The European journal of neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 2505–12, 2005. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932607>.

WADDELL, Jaylyn; MORRIS, Richard W.; BOUTON, Mark E. Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: Aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. **Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 324–336, 2006. DOI: 10.1037/0735-7044.120.2.324. Disponível em: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.120.2.324>.

WALKER, D. L.; MILES, L. A.; DAVIS, M. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 1291–308, 2009. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.06.022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595731>.

WALKER, David L.; DAVIS, Michael. Double Dissociation between the Involvement of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and the Central Nucleus of the Amygdala in Startle Increases Produced by Conditioned versus Unconditioned Fear. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 23, p. 9375–9383, 1997. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09375.1997. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.17-23-09375.1997>.

WIRTZ, Petra H.; VON KÄNEL, Roland. Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease. **Current Cardiology Reports**, [S. l.], v. 19, n. 11, 2017. DOI: 10.1007/s11886-017-0919-x.

YAMAUCHI, Naoki; TAKAHASHI, Daiki; SUGIMURA, Yae K.; KATO, Fusao; AMANO, Taiju; MINAMI, Masabumi. Activation of the neural pathway from the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis to the central amygdala induces anxiety-like behaviors. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 48, n. 9, p. 3052–3061, 2018. DOI: 10.1111/ejn.14165. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejn.14165>.

YASSA, Michael A.; HAZLETT, Richard L.; STARK, Craig E. L.; HOEHN-SARIC, Rudolf. Functional MRI of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis during conditions of uncertainty in generalized anxiety disorder. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 1045–1052, 2012. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2012.04.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022395612001276>.

YIN, An-qi; WANG, Feng; ZHANG, Xia. Integrating endocannabinoid signaling in the regulation of anxiety and depression. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.],

v. 40, n. 3, p. 336–341, 2019. DOI: 10.1038/s41401-018-0051-5. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41401-018-0051-5>.

ZHANG, Z. Q.; JULIEN, C.; BARRÈS, C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. **Journal of the autonomic nervous system**, [S. l.], v. 60, n. 1–2, p. 23–30, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884692>.

ZHONG, Ming-Kui; SHI, Zhen; ZHOU, Li-Min; GAO, Juan; LIAO, Zhao-Hui; WANG, Wei; GAO, Xing-Ya; ZHU, Guo-Qing. Regulation of cardiac sympathetic afferent reflex by GABA(A) and GABA(B) receptors in paraventricular nucleus in rats. **The European journal of neuroscience**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 3226–32, 2008. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06261.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554298>.

ZHOU, Hong; SUN, Hai-jian; CHANG, Jin-rui; DING, Lei; GAO, Qing; TANG, Chao-shu; ZHU, Guo-qing; ZHOU, Ye-bo. Cardiac sympathetic afferent reflex response to intermedin microinjection into paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and  $\gamma$ -amino butyric acid in hypertensive rats. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 239, n. 10, p. 1352–1359, 2014. DOI: 10.1177/1535370214533882. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370214533882>.

ZHOU, Li; ZHU, Dong-Ya. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric oxide: biology and chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 223–30, 2009. DOI: 10.1016/j.niox.2009.03.001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298861>.

ZHU, W.; UMEGAKI, H.; SUZUKI, Y.; MIURA, H.; IGUCHI, A. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in hippocampal cholinergic system-mediated activation of the hypothalamo--pituitary--adrenocortical axis in rats. **Brain research**, [S. l.], v. 916, n. 1–2, p. 101–6, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597596>.

ANEXOS

---

**ANEXOS com os artigos publicados com os dados desta tese intitulados:**

*1 - Cannabinoid receptor type 1 in the bed nucleus of the stria terminalis modulates cardiovascular responses to stress via local N-methyl-D-aspartate receptor/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/ protein kinase G signaling.*

*2 - GABAA but not GABAB receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardic response to emotional stress in rats.*

# Cannabinoid receptor type 1 in the bed nucleus of the stria terminalis modulates cardiovascular responses to stress via local N-methyl-D-aspartate receptor/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/protein kinase G signaling

Lucas Gomes-de-Souza<sup>1,2</sup>, Willian Costa-Ferreira<sup>1,2</sup>,  
Leandro A Oliveira<sup>1,2</sup>, Ricardo Benini<sup>1,2</sup> and Carlos C Crestani<sup>1,2</sup> 



*Journal of Psychopharmacology*  
1–12

© The Author(s) 2020

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/0269881119897556

journals.sagepub.com/home/jop



## Abstract

**Background:** Endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in the control of cardiovascular responses to stress. However, the local mechanisms involved in this regulation are not known.

**Aims:** The purpose of this study was to assess an interaction of bed nucleus of the stria terminalis endocannabinoid neurotransmission with local nitric signaling, as well as to investigate the involvement of local N-methyl-D-aspartate glutamate receptor and nitric oxide signaling in the control of cardiovascular responses to acute restraint stress by bed nucleus of the stria terminalis endocannabinoid neurotransmission in rats.

**Methods:** The first protocol evaluated the effect of intra-bed nucleus of the stria terminalis microinjection of the selective cannabinoid receptor type 1 receptor antagonist AM251 in nitrite/nitrate content in the bed nucleus of the stria terminalis following restraint stress. The other protocols evaluated the impact of local pretreatment with the selective N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonist LY235959, the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor N $\omega$ -propyl-L-arginine, the soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, or the protein kinase G inhibitor KT5823 in restraint-evoked cardiovascular changes following bed nucleus of the stria terminalis treatment with AM251.

**Results:** Bilateral microinjection of AM251 into the bed nucleus of the stria terminalis increased local nitric oxide release during restraint stress. Bed nucleus of the stria terminalis treatment with the cannabinoid receptor type 1 receptor antagonist also enhanced the tachycardia caused by restraint stress, but without affecting arterial pressure increase and sympathetic-mediated cutaneous vasoconstriction. The facilitation of restraint-evoked tachycardia following bed nucleus of the stria terminalis treatment with the cannabinoid receptor type 1 receptor antagonist was completely inhibited by local pretreatment with LY235959, N $\omega$ -propyl-L-arginine, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, or KT5823.

**Conclusions:** Our results provide evidence that bed nucleus of the stria terminalis endocannabinoid neurotransmission inhibits local N-methyl-D-aspartate/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/protein kinase G signaling, and this mechanism is involved in the control of the cardiovascular responses to stress.

## Keywords

Restraint, bed nucleus of the stria terminalis, endocannabinoid, glutamate, nitric oxide

## Introduction

The bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is a limbic fore-brain structure activated during aversive situations that has been implicated in physiological and behavioral responses to stress (Crestani et al., 2013; Miles and Maren, 2019; Myers, 2017; Radley and Johnson, 2018). Regarding stress-evoked cardiovascular responses, previous studies have indicated that the control of stress-evoked cardiovascular adjustments by the BNST seem to depend on the type of stress (Crestani et al., 2013). Accordingly, non-selective synaptic blockade in the BNST enhanced the tachycardic response to restraint stress (unconditioned aversive stimulus) (Crestani et al., 2009), whereas blood pressure and heart rate (HR) increases induced by contextual fear conditioning were attenuated (Resstel et al., 2008). Despite

these pieces of evidence, the local neurochemical mechanisms within the BNST involved in the control of stress-evoked cardiovascular responses are not completely understood.

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Brazil

<sup>2</sup>Joint Federal University of São Carlos (UFScar)-UNESP Graduate Program in Physiological Sciences, São Carlos, Brazil

### Corresponding author:

Carlos C Crestani, Laboratory of Pharmacology, Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP, Rodovia Araraquara-Jau Km 01 (Campus Universitário), Campus Ville, Araraquara, SP, 14800-903, Brazil.  
Email: carlos.crestani@unesp.br



The endocannabinoid system has been reported as a prominent neurochemical mechanism in the brain involved in physiological and behavioral responses during aversive threats (Hill and McEwen, 2010; Lutz et al., 2015; Morena et al., 2016). Accordingly, some studies have pointed out an involvement of local endocannabinoid neurotransmission in the BNST control of stress responses (Bedse et al., 2019). The first direct evidence was obtained by demonstration that systemic treatment with a selective cannabinoid receptor type 1 (CB<sub>1</sub>) receptor antagonist enhanced BNST neuronal activation evoked by an aversive stimulus (Newsom et al., 2012). Further studies demonstrated that local microinjection of cannabidiol (a phytocannabinoid of *Cannabis sativa*) into the BNST affected the cardiovascular responses evoked by either restraint stress or contextual fear conditioning, but these effects were mediated by activation of local serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> (Gomes et al., 2012, 2013). The role of local BNST endocannabinoid neurotransmission in control of stress-evoked cardiovascular changes was reported more recently. In this sense, a recent study identified involvement of CB<sub>1</sub> receptors within the BNST in the anxiogenic response evoked by unpredictable threat in mice (Lange et al., 2017). In addition, we previously reported that a selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist microinjected into the BNST dose-dependently enhanced the HR increase evoked by restraint stress, while local increase of either anandamide or 2-arachidonoylglycerol (2-AG) evoked the opposite effects (Gomes-de-Souza et al., 2016). Taken together, these results indicate a prominent role of local endocannabinoid neurotransmission within the BNST in stress responses.

Previous studies reported that the CB<sub>1</sub> receptor acts presynaptically, inhibiting local glutamatergic inputs within the BNST (Centanni et al., 2019; Glangetas et al., 2013; Lange et al., 2017; Massi et al., 2008; Puente et al., 2010). In this sense, a facilitatory influence of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor within the BNST in the control of cardiovascular responses during aversive threats was reported (Adami et al., 2017; Barretto-de-Souza et al., 2018; Hott et al., 2017). Taken together, these results support the hypothesis that the inhibitory influence of BNST endocannabinoid neurotransmission in the control of cardiovascular responses to restraint stress might be mediated by an inhibition of local glutamatergic neurotransmission. However, a possible interaction between these local neurochemical mechanisms in BNST control of stress responses has never been evaluated.

Activation of the NMDA glutamate receptor is the best characterized mechanism for activation of the neuronal isoform of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) enzyme in the brain (Chachlaki and Prevot, 2019; Garthwaite, 2008, 2019). Accordingly, a recent study identified that control of cardiovascular responses to restraint stress by NMDA receptor in the BNST is mediated by activation of local nNOS (Barretto-de-Souza et al., 2018). Nevertheless, although reports of interaction between endocannabinoid and glutamatergic neurotransmissions within the BNST (Centanni et al., 2019; Glangetas et al., 2013; Massi et al., 2008; Puente et al., 2010), an interaction between endocannabinoid and nitrergic neurotransmission has never been reported.

Based on the evidence presented above, this study aimed to evaluate the hypothesis that the inhibitory influence of BNST endocannabinoid neurotransmission in the cardiovascular responses to acute restraint stress is mediated by an interaction with local NMDA glutamate receptor/nNOS signaling. We also

evaluated the role of signaling mechanisms related to nitric oxide (NO) effects, such as soluble guanylate cyclase (sGC) and protein kinase G (PKG) (Chachlaki and Prevot, 2019; Garthwaite, 2019).

## Material and methods

### Animals

A total of 143 male Wistar rats weighing 240–260 g (60 days old) were used. Animals were obtained from the animal breeding facility of São Paulo State University (UNESP) (Botucatu, SP, Brazil), and were housed in plastic cages in a temperature-controlled room at 24°C in the Animal Facility of the Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP. They were kept under a 12:12 h light–dark cycle (lights on between 07:00–19:00) with free access to water and standard laboratory food. Housing conditions and experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Use of Animals of the School of Pharmaceutical Sciences/UNESP (approval #61/2015), which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare.

### Surgical preparation

Five days before the trial, rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]). After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was exposed and stainless-steel guide cannulas (26G, 12 mm long) were bilaterally implanted into the BNST at a position 1 mm above the site of injection using a stereotaxic apparatus (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA). Stereotaxic coordinates for cannula implantation into the BNST were: antero-posterior=+8.6 mm from interaural line; lateral=4 mm from the medial suture; dorso-ventral=−5.8 mm from the skull, with a lateral inclination of 23° (Paxinos and Watson, 1997). Cannulas were fixed to the skull with dental cement and one metal screw. After surgery, the animals received a poly-antibiotic containing streptomycins and penicillins (560 mg/mL/kg, intramuscular [i.m.]) to prevent infection and the non-steroidal anti-inflammatory flunixin meglumine (0.5 mg/mL/kg, subcutaneous [s.c.]) for post-operation analgesia.

One day before the trial, rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.), and a catheter (a 4 cm segment of PE-10 bound to a 13 cm segment of PE-50) (Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA) filled with a solution of heparin (50 UI/mL, Hepamax-S, Blausiegel, Cotia, SP, Brazil) diluted in saline (0.9% NaCl) was inserted into the femoral artery for cardiovascular recording. The catheter was tunneled under the skin and exteriorized on the animal's dorsum. After surgery, the non-steroidal anti-inflammatory flunixin meglumine (0.5 mg/mL/kg, s.c.) was administered for post-operation analgesia. The animals were kept in individual cages during the postoperative period and cardiovascular recording.

### Blood pressure and heart rate (HR) recording

The catheter implanted into the femoral artery was connected to a pressure transducer (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, Utah, USA). Pulsatile arterial pressure was recorded

using an amplifier (Bridge Amp, ML224, ADInstruments, New South Wales, Australia) and an acquisition board (PowerLab 4/30, ML866/P, ADInstruments, New South Wales, Australia) connected to a personal computer. Mean arterial pressure (MAP) and HR values were derived from the pulsatile arterial pressure recording.

### *Tail cutaneous temperature measurement*

Increased vasomotor sympathetic activity during aversive threats decreases cutaneous blood flow (Blessing, 2003), which in turn lowers the skin temperature (Busnardo et al., 2019; Gomes-de-Souza et al., 2016). Therefore, a decrease in tail cutaneous temperature was evaluated as an indirect measurement of vasomotor sympathetic response in cutaneous beds during restraint stress. For this, a thermal camera Multi-Purpose Thermal Imager was used (IRI4010, InfraRed Integrated Systems Ltd, Northampton, UK). For analyzing the images, the temperature was measured on five points along the animal's tail, and a mean of the values was calculated for each recording (Busnardo et al., 2019; Gomes-de-Souza et al., 2016).

### *Drug microinjection into the BNST*

The needles (33G, Small Parts, Miami Lakes, Florida, USA) used for microinjection into the BNST were 1 mm longer than the guide cannulas and were connected to a 2  $\mu$ L syringe (7002-KH, Hamilton Co., Reno, Nevada, USA) via PE-10 tubing (Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA). Intra-cerebral microinjections were performed within a five-second period, and the needle was left in the guide cannula for one minute after the microinjection before being removed. Microinjection was performed without restraining the animals, and drugs were administered in a final volume of 100 nL per side (Crestani et al., 2009; Gomes-de-Souza et al., 2016; Gomes et al., 2013).

### *Drugs and solutions*

LY235959 (selective NMDA glutamate receptor antagonist) (TOCRIS, Westwoods Business Park, Ellisville, Missouri, USA; cat. # 1019), N $\omega$ -propyl-L-arginine hydrochloride (NPLA) (selective nNOS inhibitor) (TOCRIS; cat. #1200), 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA; cat. #T48402) and urethane (Sigma-Aldrich; cat. #U2500) were dissolved in saline (NaCl 0.9%). AM251 (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide) (selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist) (TOCRIS cat. #1117), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (inhibitor of sGC) (TOCRIS, cat. #0880) and KT5823 (inhibitor of PKG) (TOCRIS, cat. #1289) were dissolved in a solution of saline containing 20% of dimethyl sulfoxide (DMSO). Flunixin meglumine (Banamine, Schering Plough, Cotia, SP, Brazil) and the polyantibiotic preparation of streptomycins and penicillins (Pentabiotico, Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) were used as provided.

### *Restraint stress*

The acute restraint stress consisted of introducing the animals into plastic cylindrical tubes (diameter=6.5 cm, length=15 cm),

which were ventilated by half-inch holes that comprised approximately 20% of the tube. The animals were maintained for a period of 60 min in the restraint tube (Crestani et al., 2009; Gomes-de-Souza et al., 2016; Gomes et al., 2013). Each animal was submitted to only one session of stress in order to avoid habituation (Benini et al., 2019).

### *Measurement of nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>)*

The animals were decapitated, and their brains were quickly removed, frozen in isopentane on dry ice, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until dissection of the BNST. For microdissection of the BNST, frozen brains were serially sliced at 50  $\mu$ m in the coronal plane until the BNST region in a cryostat (CM1900, Leica, Wetzlar, Germany) kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Microdissection of the BNST was performed from the brain fixed in the cryostat using a blunt 14-gauge needle. The coordinate for dissection was approximately from +0.20 mm to  $-0.80$  mm related to bregma, according to coordinates from Paxinos and Watson (1997).

The quantification of nitrite (NO<sub>2</sub>) and nitrate (NO<sub>3</sub>) (NO<sub>x</sub>; spontaneous oxidation products) was utilized as an indirect measurement of NO production (Camargo et al., 2013; Oliveira et al., 2018). For this, the samples were homogenized into lysis buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.6; NaCl 137 mM, 10% glycerol) containing proteases and phosphatases inhibitors. The NO<sub>x</sub> levels were measured from homogenized samples accordingly to the methodology previously described (Camargo et al., 2013). Briefly, for conversion of NO<sub>3</sub> into NO<sub>2</sub>, homogenized samples were incubated overnight at 37°C with solution containing nitrate reductase (#N7265, Sigma-Aldrich) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (#33461, Sigma-Aldrich) (0.4 U/mL and 1 mg/mL, respectively, diluted in monopotassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) buffer 1 M pH 7.4). Then, the NO<sub>2</sub> level was determined by adding 15  $\mu$ L of Griess reagent (1% sulphanilamide with 5% phosphoric acid in distilled water + 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in distilled water, v/v). After 10 min of incubation at room temperature, absorbance was read at 540 nm, and the results were calculated based on a standard curve of sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). The total content of protein in each sample was measured using the Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). Measurements of nitrite were performed in duplicate, and results were expressed as  $\mu\text{M NO}_x/\mu\text{g protein}$ .

### *Experimental protocols*

Animals were brought to the experimental room in their own cages. Animals were allowed at least 60 min to adapt to the experimental room conditions, such as sound and illumination, before starting the experiments. The experimental room was temperature controlled (24°C), brightly lit and acoustically isolated from the other rooms. Cardiovascular recording began at least 30 min before the onset of the restraint and was performed throughout the session of stress. The tail skin temperature was measured 10, 5, and 0 min before the restraint for baseline values, and at 10, 20, 40, and 60 min during restraint (Gomes-de-Souza et al., 2016). Each animal received a single pharmacological treatment and was submitted to one session of restraint. All experiments

were performed during the morning period (light phase of the light-dark cycle) to minimize the influence of circadian rhythms.

**Effect of AM251 microinjection into the BNST on local NOx levels during acute restraint stress.** This experiment aimed to investigate whether AM251 increases NMDA/nNOS signaling within the BNST during acute restraint stress, thus resulting in increased local NO formation. For this, animals were treated with either vehicle (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or AM251 (30 and 100 pmol/100 nL), and 10 min later were submitted to a 60-minute session of restraint stress. Immediately after the restraint session, the animals were euthanized, and the brain was obtained for evaluation of NOx levels in the BNST.

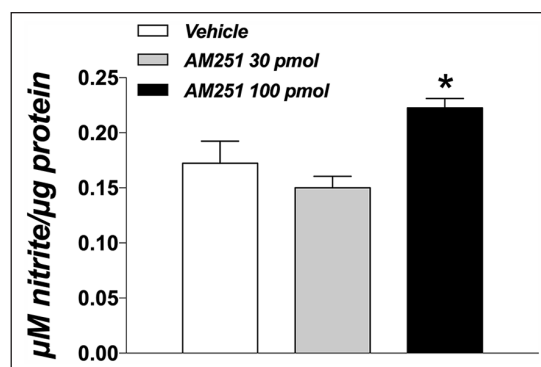
**Involvement of local NMDA/nNOS/sGC/PKG signaling in the changes of cardiovascular responses to restraint stress evoked by AM251 microinjection into the BNST.** The aim of this experiment was to investigate the involvement of local NMDA glutamate receptor, nNOS, sGC, and PKG in control of the cardiovascular responses to acute restraint stress by the CB<sub>1</sub> receptor within the BNST. For this, independent sets of rats were pretreated into the BNST with either the selective NMDA receptor antagonist LY235959 (0.5 nmol/100 nL), the selective nNOS inhibitor NPLA (0.2 nmol/100 nL), the sGC inhibitor ODQ (0.5 nmol/100 nL), the selective PKG inhibitor KT5823 (0.01 nmol/100 nL/site), or vehicle (saline or DMSO 20%, 100 nL/site) (Barretto-de-Souza et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Five minutes later, the animals received either vehicle (DMSO 20%, 100 nL/site) or AM251 (100 pmol/100 nL) into the BNST (Gomes-de-Souza et al., 2016). Five minutes after the second pharmacological treatment of the BNST, animals in all experimental groups underwent the 60-minute session of restraint stress.

### Histological determination of the microinjection sites

At the end of each experiment, animals were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.), and 1% Evan's blue dye was microinjected into the brain at the same volume of drug injection (i.e. 100 nL) as a marker of the microinjection site. They were then perfuse-fixed with intracardiac 0.9% NaCl followed by 10% formalin. Afterwards, the brains were removed and post-fixed in 10% formalin solution for at least 48 h at 4°C. Then, serial 40 µm thick sections of the BNST region were cut using a cryostat (CM1900, Leica, Wetzlar, Germany). The sites of injection were analyzed according to coordinates from Paxinos and Watson (1997).

### Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). NOx levels and basal cardiovascular parameters were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). Restraint-evoked cardiovascular changes were obtained for each measure by calculating the difference between the values recorded during the restraint stress and the baseline value obtained by the mean of points recorded across the 10 min before the restraint onset. The time-course curves of MAP, HR, and tail skin temperature



**Figure 1.** Levels of nitrogen oxides (NOx) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) following exposure to a 60-minute session of restraint stress in animals that received bilateral microinjection of vehicle (saline containing 20% of dimethyl sulfoxide (DMSO), 100 nL,  $n=10$ ) or AM251 (30 pmol/100 nL,  $n=11$ ; or 100 pmol/100 nL,  $n=10$ ) into the BNST. Columns represent the mean and bars the standard error of the mean (SEM). \* $p<0.05$  versus vehicle group, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test.

changes were analyzed using two-way ANOVA, with treatment as main factor and time as repeated measurement. When statistical differences were identified by one- and two-way ANOVA, the Bonferroni post-hoc test was performed to assess specific differences between the experimental groups. Results of statistical tests with  $p<0.05$  were considered significant.

## Results

### Effect of AM251 microinjection into the BNST on local NOx levels during acute restraint stress

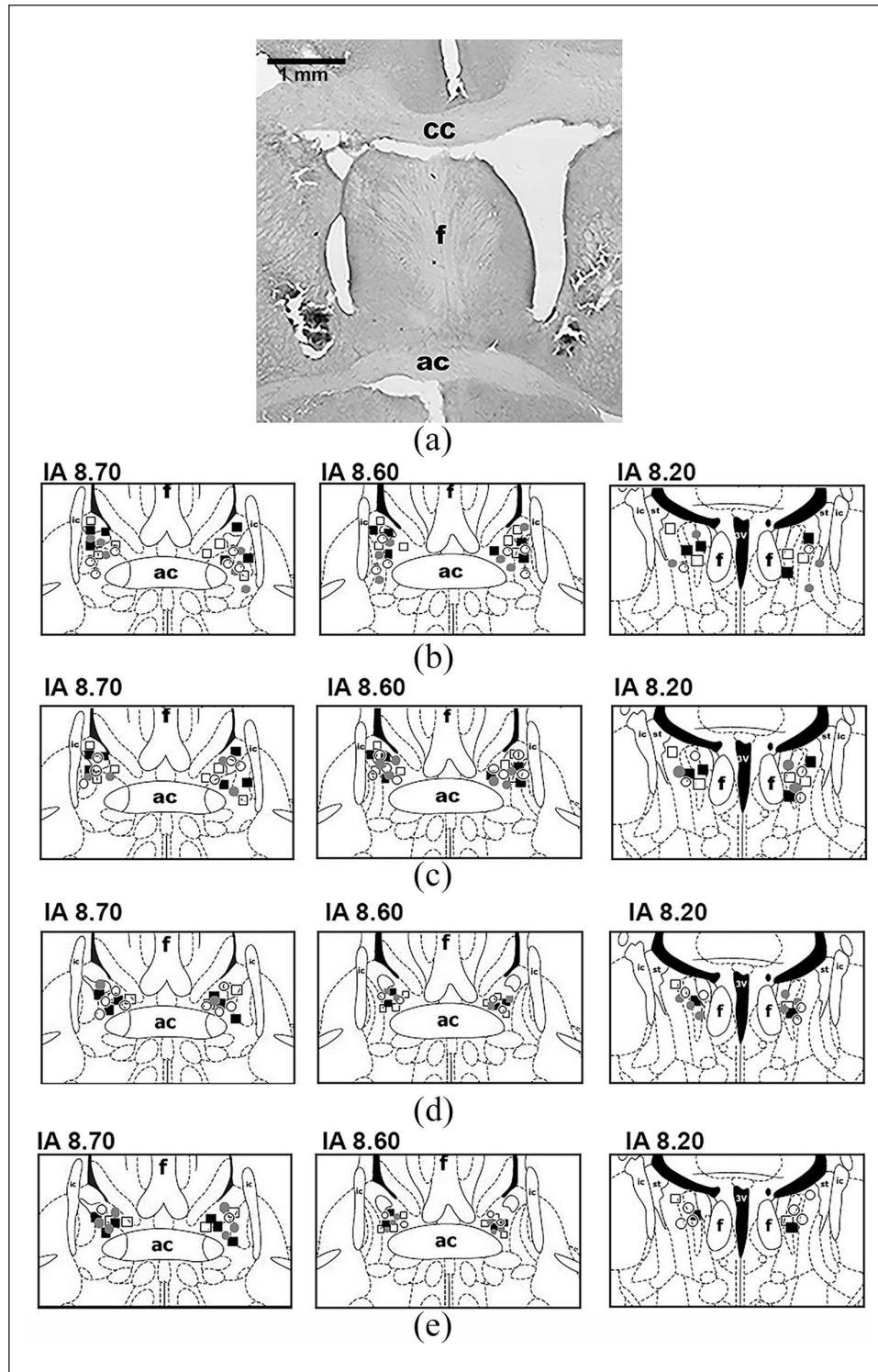
Bilateral microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251 (30 and 100 pmol/100 nL) into the BNST affected the local NOx levels following exposure to acute restraint stress ( $F_{(2,28)}=7.222$ ,  $p<0.003$ ) (Figure 1). Post-hoc analysis revealed that AM251 at the dose of 100 pmol ( $p<0.03$ ), but not 30 pmol ( $p>0.05$ ), enhanced NOx levels within the BNST during restraint stress (Figure 1).

### Involvement of local NMDA/nNOS/sGC/PKG signaling in the control of cardiovascular responses to restraint stress by BNST endocannabinoid neurotransmission

A photomicrograph of a coronal brain section depicting bilateral microinjection sites into the BNST of a representative animal is presented in Figure 2(a). In addition, Figure 2 shows diagrammatic representations showing the bilateral microinjection sites into the BNST of all animals used in this experiment.

**NMDA receptor.** Bilateral microinjections of the selective NMDA glutamate receptor antagonist LY235959 (0.5 nmol/100 nL) and/or AM251 (100 pmol/100 nL) into the BNST did not





**Figure 2.** (a) Photomicrograph of a coronal brain section from a representative rat showing bilateral sites of microinjection into the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). (b)–(e) Diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997) indicating the microinjection sites into the BNST of all animals used for evaluation of the involvement of local N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor; (b) neuronal nitric oxide synthase (nNOS); (c) soluble guanylate cyclase (sGC); (d) and protein kinase G (PKG); (e) on modulation of restraint-evoked cardiovascular responses by the cannabinoid receptor type 1 ( $CB_1$ ) receptor within the BNST. Vehicle+vehicle: white circles; vehicle+AM251: white squares; NMDA receptor/nNOS/sGC/PKG antagonist/inhibitor+vehicle: grey circles; NMDA receptor/nNOS/sGC/PKG antagonist/inhibitor+AM251: black squares.

3V: third ventricle; ac: anterior commissure; cc: corpus callosum; f: fornix; IA: interaural coordinate; ic: internal capsule; st: stria terminalis.

**Table 1.** Basal parameters of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and tail skin temperature (T) after pharmacological treatments of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST).

Groups	<i>n</i>	MAP (mm Hg)	HR (bpm)	T (°C)
<b>(a)</b>				
<b>SAL+DMSO</b>	8	100±2	363±9	28.3±0.3
<b>SAL+AM251</b>	8	100±1	338±10	29.4±0.4
<b>LY235959+DMSO</b>	8	99±2	366±11	29.1±0.5
<b>LY235959+AM251</b>	7	108±2	380±13	30.5±0.5
		$F_{(3,27)}=3.4$ $p<0.03$	$F_{(3,27)}=2.4$ $p>0.05$	$F_{(3,27)}=2.2$ $p>0.05$
<b>(b)</b>				
<b>SAL+DMSO</b>	8	100±2	363±9	28.3±0.3
<b>SAL+AM251</b>	8	100±1	338±10	29.4±0.4
<b>NPLA+DMSO</b>	8	109±3	373±13	29.5±0.3
<b>NPLA+AM251</b>	7	104±3	392±7	28.2±0.2
		$F_{(3,27)}=2.8$ $p>0.05$	$F_{(3,27)}=3.3$ $p<0.03$	$F_{(3,27)}=3.4$ $p<0.02$
<b>(c)</b>				
<b>DMSO+DMSO</b>	6	104±5	404±15	30.0±0.2
<b>DMSO+AM251</b>	6	114±2	403±15	29.3±0.4
<b>ODQ+DMSO</b>	8	106±2	378±7	29.5±0.5
<b>ODQ+AM251</b>	6	103±2	386±6	29.1±0.4
		$F_{(3,22)}=2.2$ $p>0.05$	$F_{(3,22)}=1.5$ $p>0.05$	$F_{(3,22)}=0.6$ $p>0.05$
<b>(d)</b>				
<b>DMSO+DMSO</b>	6	104±5	404±15	30.0±0.2
<b>DMSO+AM251</b>	6	114±2	403±15	29.3±0.4
<b>KT5823+DMSO</b>	6	109±2	388±17	30.4±0.5
<b>KT5823+AM251</b>	6	105±3	376±5	28.8±0.4
		$F_{(3,20)}=1.6$ $p>0.05$	$F_{(3,20)}=1.3$ $p>0.05$	$F_{(3,20)}=2.7$ $p>0.05$

Bpm: beats per minute; DMSO: dimethyl sulfoxide; NPLA: N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine hydrochloride; ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; SAL: saline. Values are mean±standard error of the mean (SEM), one-way analysis of variance (ANOVA).

affect the baseline values of either HR or tail skin temperature (Table 1(a)). One-way ANOVA indicated effect of pharmacological treatments on MAP, but post-hoc analysis did not reveal any specific difference between the experimental groups ( $p>0.05$ ) (Table 1(a)).

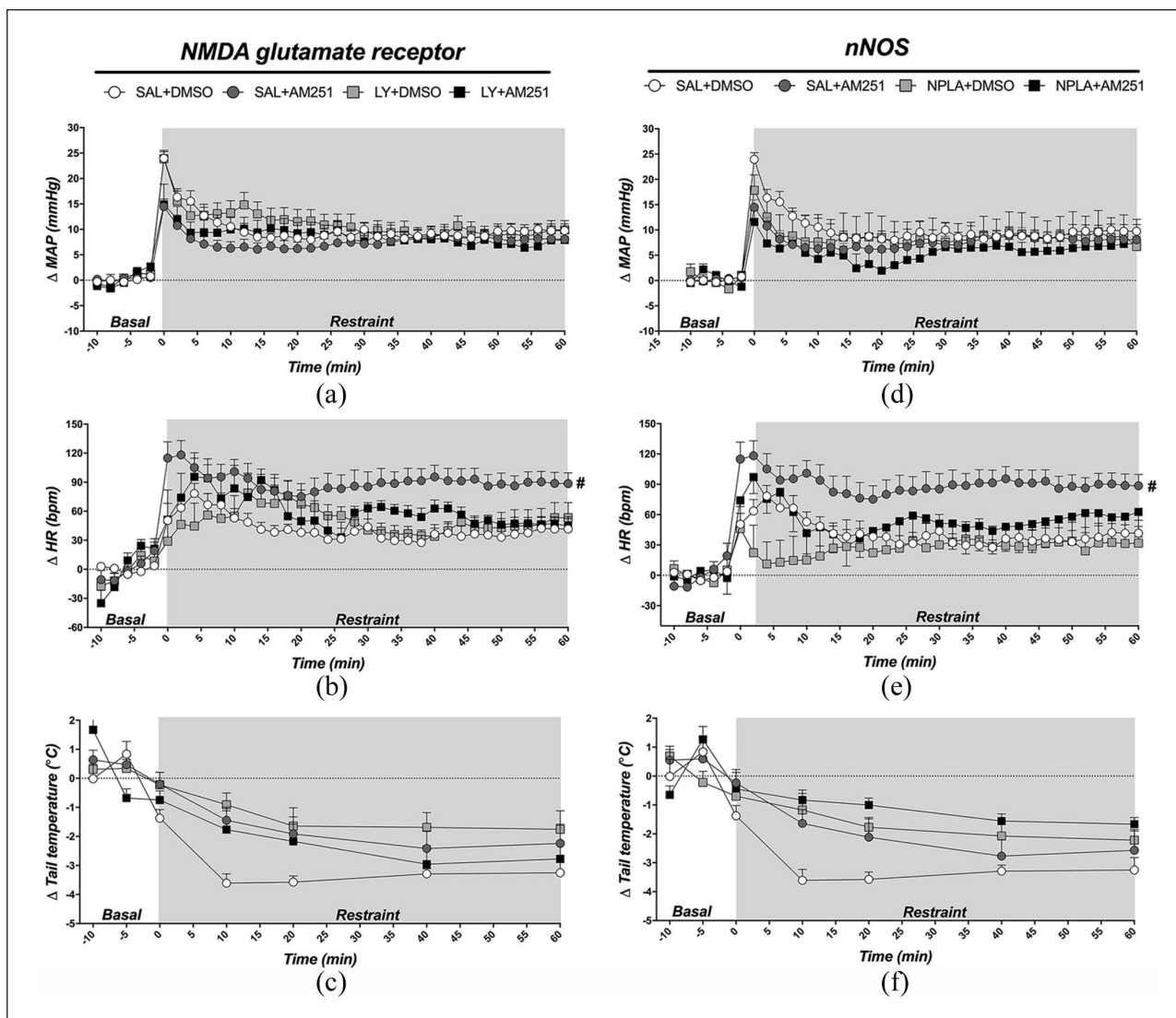
Acute restraint stress caused a sustained increase on both MAP (time:  $F_{(35,945)}=40$ ,  $p<0.0001$ ) and HR (time:  $F_{(35,945)}=20$ ,  $p<0.0001$ ), and decreased the tail skin temperature (time:  $F_{(6,162)}=59$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 3(a)–(c)). In addition, analysis indicated effect of BNST pharmacological treatments on HR ( $F_{(3,27)}=5$ ,  $p<0.01$ ) and tail skin temperature ( $F_{(3,27)}=4$ ,  $p<0.03$ ), but not on MAP ( $F_{(3,27)}=1$ ,  $p>0.05$ ) (Figure 3(a)–(c)). Two-way ANOVA also indicated a time×treatment interaction for both MAP ( $F_{(105,945)}=2$ ,  $p<0.0002$ ), HR ( $F_{(105,945)}=2$ ,  $p<0.0001$ ) and tail skin temperature ( $F_{(18,162)}=3$ ,  $p<0.0002$ ) (Figure 3(a)–(c)). Post-hoc analysis revealed that BNST treatment with AM251 (SAL+AM251 group) enhanced the restraint-evoked tachycardia ( $p<0.006$ ), and this effect was inhibited by local pretreatment with LY235959 (LY+AM251 group) ( $p>0.05$ ) (Figure 3(b)).

*nNOS*. Bilateral microinjection of the selective nNOS inhibitor NPLA (0.2 nmol/100 nL) and/or AM251 (100 pmol/100 nL) into the BNST did not affect baseline values of MAP (Table 1(b)). One-way ANOVA indicated effect of pharmacological treatments on both HR and tail skin temperature, but post-hoc analysis did not reveal any specific difference between the experimental groups in these parameters (HR:  $p>0.05$ ; skin temperature:  $p>0.05$ ) (Table 1(b)).

Acute restraint stress caused a sustained increase on both MAP (time:  $F_{(35,945)}=20$ ,  $p<0.0001$ ) and HR (time:  $F_{(35,945)}=15$ ,  $p<0.0001$ ), and decreased the tail skin temperature (time:  $F_{(6,162)}=48$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 3(d)–(f)). In addition, analysis indicated effect of BNST pharmacological treatments on HR ( $F_{(3,27)}=4$ ,  $p<0.03$ ) and tail skin temperature ( $F_{(3,27)}=3.8$ ,  $p<0.02$ ), but not on MAP ( $F_{(3,27)}=0.6$ ,  $p>0.05$ ) (Figure 3(d)–(f)). Two-way ANOVA also indicated a time×treatment interaction for HR ( $F_{(105,945)}=1.5$ ,  $p<0.0004$ ) and tail skin temperature ( $F_{(18,162)}=3$ ,  $p<0.0001$ ), but not for MAP ( $F_{(105,945)}=0.9$ ,  $p>0.05$ ) (Figure 3(d)–(f)). Post-hoc analysis revealed that BNST treatment with AM251 (SAL+AM251 group) enhanced the restraint-evoked tachycardia ( $p<0.05$ ), and this effect was inhibited by local pretreatment of the BNST with NPLA (NPLA+AM251 group) ( $p>0.05$ ) (Figure 3(e)).

*sGC*. Bilateral microinjection of the selective sGC inhibitor ODQ (0.5 nmol/100 nL) and/or AM251 (100 pmol/100 nL) into the BNST did not affect baseline values of either MAP, HR, or tail skin temperature (Table 1 (c)). However, acute restraint stress caused a sustained increase on both MAP (time:  $F_{(35,770)}=27$ ,  $p<0.0001$ ) and HR (time:  $F_{(35,770)}=17$ ,  $p<0.0001$ ), and decreased the tail skin temperature (time:  $F_{(6,132)}=62$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 4(a)–(c)). In addition, analysis indicated effect of BNST pharmacological treatments on HR ( $F_{(3,22)}=4$ ,  $p<0.01$ ), but without affecting MAP ( $F_{(3,22)}=0.5$ ,  $p>0.05$ ) and tail skin temperature ( $F_{(3,22)}=1$ ,  $p>0.05$ ) values (Figure 4(a)–(c)). Two-way ANOVA also indicated significant time×treatment interaction for HR ( $F_{(105,770)}=1.4$ ,  $p<0.007$ ) and skin temperature ( $F_{(18,132)}=1.8$ ,  $p<0.03$ ), but not for MAP ( $F_{(105,770)}=0.6$ ,  $p>0.05$ ) (Figure 4(a)–(c)). Post-hoc analysis revealed that AM251 into the BNST (DMSO+AM251 group) increased restraint-evoked tachycardia ( $p<0.02$ ), and this effect was inhibited in animals pretreated with ODQ into the BNST (ODQ+AM251 group) ( $p>0.05$ ) (Figure 4(b)).

*PKG*. Bilateral microinjections of the selective PKG inhibitor KT5823 (0.01 nmol/100 nL) and/or AM251 (100 pmol/100 nL) into the BNST did not affect baseline values of either MAP, HR, or tail skin temperature (Table 1 (d)). However, acute restraint stress caused a sustained increase on HR (time:  $F_{(35,700)}=20$ ,  $p<0.0001$ ) and MAP (time:  $F_{(35,700)}=18$ ,  $p<0.0001$ ), and decreased the tail skin temperature (time:  $F_{(6,120)}=54$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 4(d)–(f)). In addition, analysis indicated effect of BNST pharmacological treatments on HR ( $F_{(3,20)}=3$ ,  $p<0.05$ ), but not on MAP ( $F_{(3,20)}=2$ ,  $p>0.05$ ) and skin temperature ( $F_{(3,20)}=2$ ,  $p>0.05$ ) values (Figure 4(d)–(f)). Two-way ANOVA also indicated significant time×treatment interaction for HR ( $F_{(105,700)}=1.5$ ,  $p<0.005$ ) and skin temperature ( $F_{(18,120)}=2.8$ ,  $p<0.0007$ ), but not for MAP ( $F_{(105,700)}=1.1$ ,  $p>0.05$ ) (Figure 4(d)–(f)). Post-hoc analysis revealed that AM251 into the BNST (DMSO+AM251 group) enhanced restraint-evoked tachycardia ( $p<0.03$ ), and this effect was inhibited in animals locally pretreated with KT5823 (KT5823+AM251 group) ( $p>0.05$ ) (Figure 4(e)).



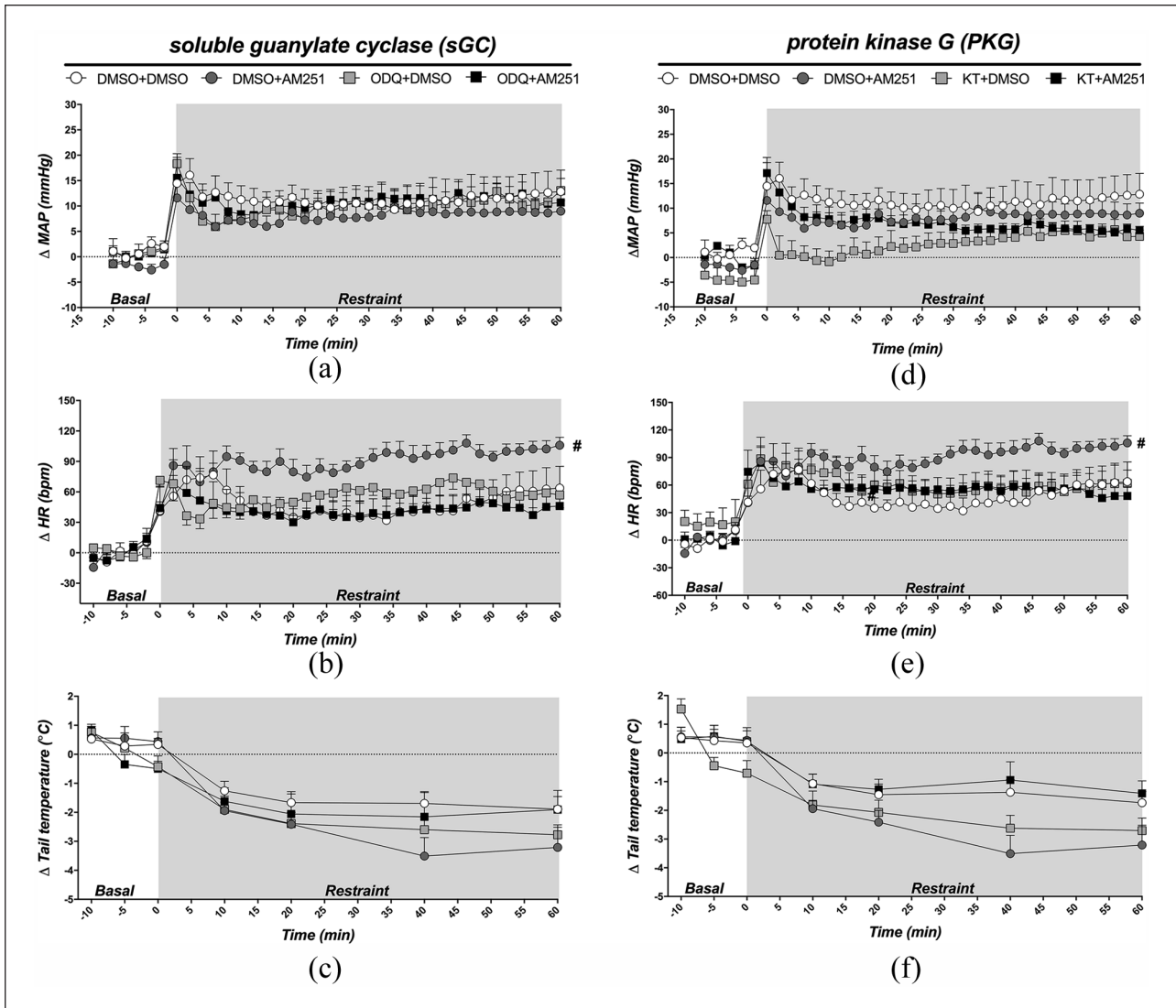
**Figure 3.** (a)–(c) Time-course curves of changes on mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP), heart rate ( $\Delta$ HR), and tail skin temperature ( $\Delta$ tail temperature) evoked by acute restraint stress in animals treated bilaterally into the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) with vehicle (SAL) (saline, 100 nL) or the selective N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor antagonist LY235959 (LY) (0.5 nmol/100 nL), followed by a second microinjection of vehicle (dimethyl sulfoxide (DMSO)) (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or AM251 (100 pmol/100 nL). (d)–(f) Time-course curves of  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ HR, and  $\Delta$ tail temperature evoked by acute restraint stress in animals treated bilaterally into the BNST with vehicle (SAL) (saline, 100 nL) or the selective neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor N $\omega$ -propyl-L-arginine (NPLA) (0.2 nmol/100 nL), followed by a second microinjection of vehicle (DMSO) (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or AM251 (100 pmol/100 nL). The onset of stress was at  $t=0$ . Circles represent the mean and the bars the standard error of the mean (SEM). # $p<0.05$  over the whole restraint period compared to SAL+DMSO group, analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test.

Microinjection of the antagonist/inhibitors (i.e. LY235959, NPLA, ODQ or KT5823) and/or AM251 into structures surrounding the BNST did not affect the restraint-evoked cardiovascular responses (data not shown).

## Discussion

The results obtained in this study are the first to indicate an interaction between endocannabinoid and nitergic neurotransmissions within the BNST. In addition, this study provides new

evidence of an involvement of local NMDA glutamatergic receptor and nNOS/sGC/PKG signaling in the control of cardiovascular responses during the stress by the endocannabinoid neurotransmission within the BNST. Indeed, we identified that bilateral microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251 into the BNST increased local NO formation during an acute session of restraint stress, as evidenced by increased local NOx levels. We also observed that bilateral BNST treatment with AM251 enhanced the restraint-evoked tachycardic response, but without affecting the blood pressure increase and the drop in tail



**Figure 4.** (a)–(c) Time-course curves of changes on mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP), heart rate ( $\Delta$ HR), and tail skin temperature ( $\Delta$ tail temperature) evoked by acute restraint stress in animals treated bilaterally into the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) with vehicle (dimethyl sulfoxide (DMSO)) (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or the selective soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (0.5 nmol/100 nL), followed by a second microinjection of vehicle (DMSO) (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or AM251 (100 pmol/100 nL). (d)–(f) Time-course curves of  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ HR, and  $\Delta$ tail temperature evoked by acute restraint stress in animals treated bilaterally into the BNST with vehicle (DMSO) (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or the selective protein kinase G (PKG) inhibitor KT5823 (KT) (0.01 nmol/100 nL), followed by a second microinjection of vehicle (DMSO) (saline containing 20% of DMSO, 100 nL) or AM251 (100 pmol/100 nL). The onset of stress was at  $t=0$ . Circles represent the mean and the bars the standard error of the mean (SEM). # $p < 0.05$  over the whole restraint period compared to SAL+DMSO group, analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test.

skin temperature. The effect of AM251 in restraint-evoked tachycardia was prevented by BNST pretreatment with either the selective NMDA glutamatergic receptor antagonist LY235959, the selective nNOS inhibitor NPLA, the sGC inhibitor ODQ or the PKG inhibitor KT5823.

The two major endocannabinoids are the arachidonylethanolamide/anandamide (AEA) and 2-AG (Mechoulam and Parker, 2013; Pacher, 2006). Two cannabinoid receptors were identified, the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors (Howlett, 2002; Pacher, 2006). The endocannabinoids are synthesized “on demand” in post-synaptic neurons through Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent mechanisms

(Kano et al., 2009) and act as retrograde messengers by activating CB<sub>1</sub> receptors onto presynaptic terminals, which in turn suppresses neurotransmitter release (Katona and Freund, 2012; Mechoulam and Parker, 2013). There is evidence of expression of the CB<sub>2</sub> receptor in the brain, but its role in physiological and pathological conditions is yet to be established (Mechoulam and Parker, 2013; Morena et al., 2016). The endocannabinoids are rapidly taken back from synapses by a membrane transport process that is not still fully characterized (Mechoulam and Parker, 2013; Morena et al., 2016). In the cell, AEA is hydrolyzed by the fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme while the 2-AG is



hydrolyzed by the monoacylglycerol lipase (MAGL) enzyme (Dinh et al., 2002; McKinney and Cravatt, 2005).

The CB<sub>1</sub> receptor is widely expressed throughout the central nervous system (Herkenham et al., 1990; Howlett et al., 2004; Tsou et al., 1998), including in the BNST (Matsuda et al., 1993; Tsou et al., 1998). In this sense, we identified previously that bilateral microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251 into the BNST dose-dependently increased the restraint-evoked tachycardic response, but without affecting the blood pressure increase and the decrease in tail cutaneous temperature (Gomes-de-Souza et al., 2016). Conversely, local BNST treatment with inhibitors of anandamide (i.e. a FAAH inhibitor) and 2-AG (i.e. a MAGL inhibitor) hydrolysis attenuated the HR increase during restraint stress, and this effect was prevented by local pretreatment with AM251 (Gomes-de-Souza et al., 2016). Taken together, these results indicated an inhibitory influence of the CB<sub>1</sub> receptor activation within the BNST on cardiovascular responses to stress, which seem to be mediated by local release of both AEA and 2-AG. Therefore, the facilitation of HR response following BNST treatment with AM251 identified in the present study is in line with results reported previously. In addition, the inhibitory control of stress-evoked cardiovascular changes by BNST CB<sub>1</sub> receptor corroborates the proposition that endocannabinoid neurotransmission acts on the central nervous system by suppressing stress responses (Hill and Tasker 2012; Morena et al. 2016).

Studies using electrophysiology techniques identified that endocannabinoids act pre-synaptically via the CB<sub>1</sub> receptor inhibiting local glutamatergic afferences within the BNST (Centanni et al., 2019; Glangetas et al., 2013; Lange et al., 2017; Massi et al., 2008; Puente et al., 2010). These findings are further supported by evidence of the presence of CB<sub>1</sub> receptors in glutamatergic terminals within the BNST (Massi et al., 2008; Puente et al., 2010). This inhibitory influence of CB<sub>1</sub> receptor in local glutamatergic neurotransmission within the BNST was proposed to be implicated in reward circuitry, nicotine self-administration, alcohol abstinence and stress-evoked neuroplasticity and defensive behavior (Bedse et al., 2019; Glangetas et al., 2013; Lange et al., 2017; Massi et al., 2008; Reisiger et al., 2014). However, to the best of our knowledge, results reported here provide the first evidence that endocannabinoid-glutamatergic neurotransmission interaction within the BNST is involved in control of the physiological responses to stress. Our results are further supported by recent evidence that glutamatergic neurotransmission into the BNST plays a facilitatory influence in cardiovascular responses to restraint stress (Adami et al., 2017; Barretto-de-Souza et al., 2018), so that as evidenced in the present study inhibition of glutamatergic neurotransmission by local CB<sub>1</sub> receptors is expected to decrease these responses.

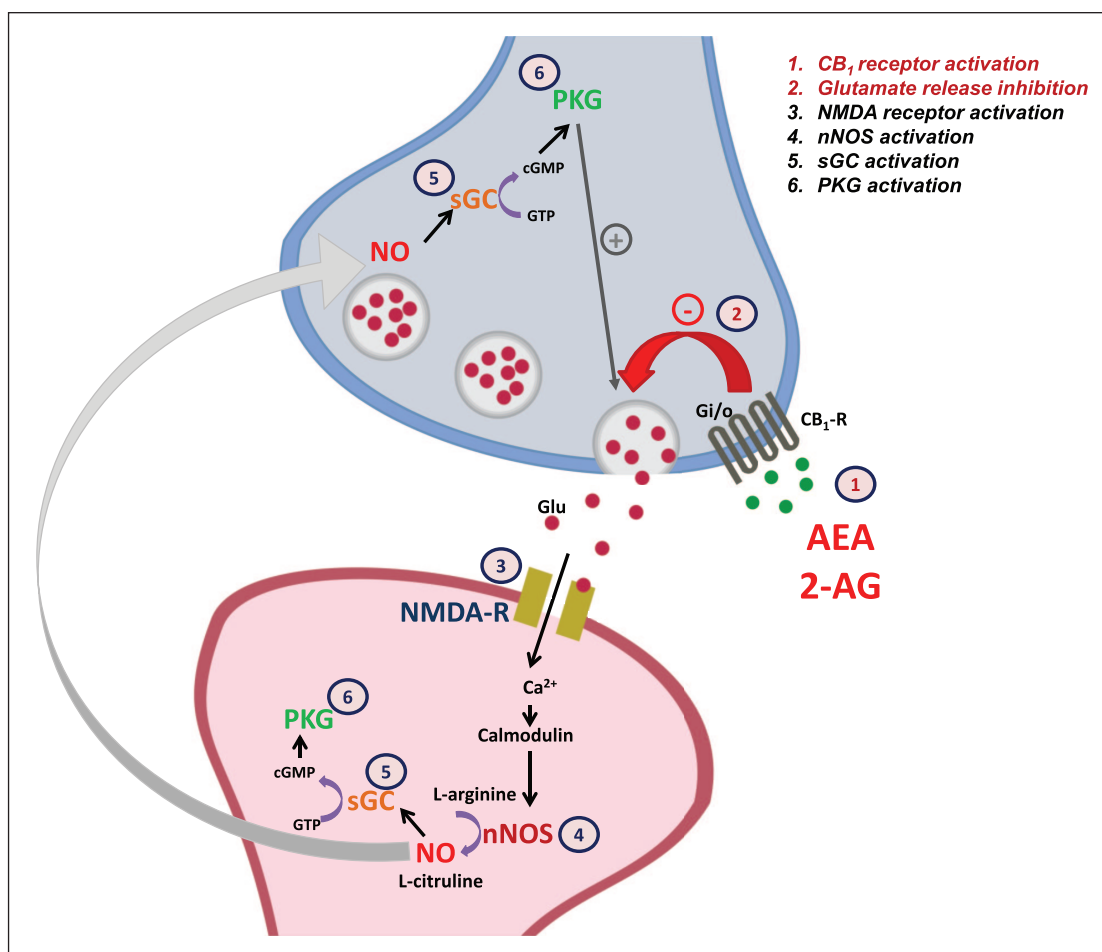
Activation of the NMDA glutamatergic receptor in postsynaptic neurons results in NO formation through a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism and activation of the nNOS (Chachlaki and Prevot, 2019; Garthwaite, 2008, 2019). Accordingly, we recently reported that the facilitatory influence of the NMDA receptor within the BNST in stress-evoked cardiovascular responses is mediated by local nNOS activation (Barretto-de-Souza et al., 2018). Although these pieces of evidence, the endocannabinoid-glutamate neurotransmission interaction was never explored in terms of an involvement of NO signaling. In fact, to the best of our knowledge, our findings provide the first evidence of an

interaction between local endocannabinoid neurotransmission and nitrergic signaling within the BNST. The identification that modulation of stress-evoked cardiovascular changes by BNST NMDA receptor is mediated by local nNOS activation (Barretto-de-Souza et al., 2018) strongly support the idea that the endocannabinoid interaction with the NMDA receptor and the nitrergic signaling is part of a same signaling pathway (i.e. NMDA receptor/nNOS/sGC/PKG signaling). In this sense, taken together, results reported here suggest that activation of CB<sub>1</sub> receptor in excitatory terminals within the BNST inhibits glutamate release, which in turn reduces NMDA receptor activation, postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx and nNOS activation. Figure 5 presents a schematic representation outlining the proposed mechanism of interaction between CB<sub>1</sub> receptor and NMDA-nNOS-sGC/PKG signaling within the BNST.

The NMDA receptor/nNOS/sGC/PKG signaling pathway seems to be the target of other local neurochemical mechanisms within the BNST controlling the stress responses. Indeed, corticotropin-releasing factor (CRF) neurotransmission within the BNST, a neurochemical mechanism involved in control of cardiovascular responses to stress (Crestani et al., 2013; Oliveira et al., 2015), acts presynaptically increasing local glutamatergic neurotransmission (Silberman and Winder, 2013). This CRF-glutamate interaction, as well as CRF-NO signaling interaction, was recently demonstrated to be involved in restraint-evoked cardiovascular responses (Oliveira et al., 2018). An interaction between endocannabinoid and CRF neurotransmissions within the BNST has never been reported. However, despite the evidence that the opposite control of cardiovascular changes to restraint by CRF (facilitatory) and endocannabinoid (inhibitory) neurotransmission within the BNST is mediated by interaction with the same target (i.e. glutamatergic and nitrergic neurotransmissions), we cannot exclude the possibility that inhibition of local CRF release by CB<sub>1</sub> receptor within the BNST also affect the cardiovascular responses to restraint stress. Accordingly, colocalization of CB<sub>1</sub> receptor and CRF was found within the BNST (Cota et al., 2007). Conversely, some studies have indicated that endocannabinoid neurotransmission might mediate the effects following CRF neurotransmission activation (Kupferschmidt et al., 2012a, 2012b). Therefore, further studies are necessary to investigate a direct interaction between CRF and endocannabinoid neurotransmission within the BNST.

The BNST is proposed as a relay station connecting corticolimbic structures such as medial prefrontal cortex (MPFC), insular cortex (IC), hippocampus and amygdala with primary effectors of physiological and behavioral responses in the hypothalamus and brainstem (Crestani et al., 2013; Myers, 2017; Radley and Johnson, 2018; Ulrich-Lai and Herman, 2009). Inputs from MPFC, IC, hippocampus, and basolateral amygdala (BLA) are mainly glutamatergic (Ch'ng et al., 2018; Myers, 2017). Previous results provided evidence that CB<sub>1</sub> receptors inhibited excitatory presynaptic terminals within the BNST coming from the infralimbic region of the MPFC, IC, and BLA (Centanni et al., 2019; Glangetas et al., 2013; Lange et al., 2017; Massi et al., 2008). A facilitatory influence of the infralimbic cortex and IC in the restraint-evoked HR response was reported (Alves et al., 2010; Tavares et al., 2009). Regarding the BLA, activation of this amygdaloid nucleus evokes stress-like cardiovascular and behavioral changes (Sanders et al., 1995; Sanders and Shekhar, 1995), and a recent study identified that angiotensin-(1-7) (a





**Figure 5.** Schematic representation illustrating the proposed mechanism of interaction between the cannabinoid receptor type 1 (CB<sub>1</sub>) receptor and the N-methyl-D-aspartate (NMDA)/neuronal nitric oxide synthase (nNOS)/soluble guanylate cyclase (sGC)/protein kinase G (PKG) signaling within the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Activation of the CB<sub>1</sub> receptor on excitatory presynaptic terminals (a) inhibits glutamate release (b), which in turn decreases activation of NMDA glutamate receptor (NMDA-R) (c), nNOS (d), sGC (e), and PKG (f). See text for further details. 2-AG: 2-arachidonoylglycerol; AEA: anandamide; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; Gi/o: Gi/o protein; Glu: glutamate; GTP: guanosine triphosphate; NO: nitric oxide.

counter-regulatory peptide for the pro-stress effects of angiotensin II) into the BLA decreased cardiovascular responses to air jet stress (Oscar et al., 2015). In this sense, it is possible that interaction with NMDA receptor reported in the present study is related to inhibition of excitatory information within the BNST coming from these corticolimbic structures, which in turn reduces HR response. However, as stated above, glutamatergic inputs to the BNST also originate from the hippocampus (Ch'ng et al., 2018; Myers, 2017), and this structure was reported to play a facilitatory role in HR responses to restraint stress (Scopinho et al., 2013). Thus, we cannot exclude the possibility that the endocannabinoid-glutamate neurotransmission interaction reported here is mediated by inhibition of information coming from hippocampus. Therefore, further studies are necessary to elucidate the central network related to the effects reported in the present study.

In summary, the results reported in the present study provide evidence of an interaction of BNST endocannabinoid neurotransmission with local nitric oxide neurochemical mechanisms. In addition, our data suggest that the inhibitory influence of the CB<sub>1</sub>

receptor within the BNST on the tachycardic response evoked by aversive stimuli is mediated by inhibition of the local NMDA receptor/nNOS/sGC/PKG signaling pathway.

### Author contributions

LGS and CCC conceived and designed this research; LGS, WCF, LAO, and RB performed the experiments and analyzed the data; LGS, WCF, LAO, RB, and CCC interpreted the results of experiments; LGS prepared the figures and drafted the manuscript; LGS and CCC edited and revised the manuscript; CCC approved the final version of the manuscript.

### Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was

supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grants #2015/05922-9 and 2017/19249-0), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant #456405/2014-3 and 431339/2018-0) and Scientific Support and Development Program of School of Pharmaceutical Sciences (UNESP). CCC is a CNPq research fellow (process #305583/2015-8 and 304108/2018-9).

## ORCID iD

Carlos C Crestani  <https://orcid.org/0000-0002-1942-858X>

## References

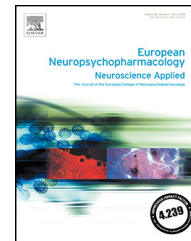
- Adami MB, Barretto-De-Souza L, Duarte JO, et al. (2017) Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *J Psychopharmacol* 31: 674–681.
- Alves FHF, Crestani CC and Corrêa FMA (2010) The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Brain Res* 1333: 57–63.
- Barretto-de-Souza L, Adami MB, Benini R, et al. (2018) Dual role of nitergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in controlling cardiovascular responses to emotional stress in rats. *Br J Pharmacol* 175: 3773–3783.
- Bedse G, Centanni SW, Winder DG, et al. (2019) Endocannabinoid signaling in the central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: Implications for the pathophysiology and treatment of alcohol use disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 43: 2014–2027.
- Benini R, Oliveira LA, Gomes-de-Souza L, et al. (2019) Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: Influence of length, frequency and number of aversive sessions. *Stress* 22: 151–161.
- Blessing WW (2003) Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell Mol Neurobiol* 23: 527–538.
- Busnardo C, Crestani CC, Scopinho AA, et al. (2019) Nitergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 90: 16–27.
- Camargo LHA, Alves FHF, Biojone C, et al. (2013) Involvement of N-methyl-d-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats. *Euro J Pharmacol* 713: 16–24.
- Centanni SW, Morris BD, Luchsinger JR, et al. (2019) Endocannabinoid control of the insular-bed nucleus of the stria terminalis circuit regulates negative affective behavior associated with alcohol abstinence. *Neuropsychopharmacology* 44: 526–537.
- Ch'ng S, Fu J, Brown RM, et al. (2018) The intersection of stress and reward: BNST modulation of aversive and appetitive states. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 87: 108–125.
- Chachlaki K and Prevot V (2019) Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. *Br J Pharmacol*. Epub ahead of print 26 July 2019. doi: 10.1111/bph.14800
- Cota D, Steiner MA, Marsicano G, et al. (2007) Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148: 1574–1581.
- Crestani C, Alves F, Gomes F, et al. (2013) Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: A review. *Curr Neuropharmacol* 11: 141–159.
- Crestani CC, Alves FHF, Tavares RF, et al. (2009) Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress* 12: 268–278.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, et al. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci* 99: 10819–10824.
- Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27: 2783–2802.
- Garthwaite J (2019) NO as a multimodal transmitter in the brain: Discovery and current status. *Br J Pharmacol* 176: 197–211.
- Glangetas C, Girard D, Groc L, et al. (2013) Stress switches cannabinoid type-1 (CB1) receptor-dependent plasticity from LTD to LTP in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 33: 19657–19663.
- Gomes-de-Souza L, Oliveira LA, Benini R, et al. (2016) Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 173: 2833–2844.
- Gomes FV, Alves FHF, Guimarães FS, et al. (2013) Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT1A receptor. *Eur Neuropsychopharmacol* 23: 1096–1104.
- Gomes FV, Reis DG, Alves FHF, et al. (2012) Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT 1A receptors. *J Psychopharmacol* 26: 104–113.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, et al. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1932–1936.
- Hill MN and McEwen BS (2010) Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 791–797.
- Hill MN and Tasker JG (2012) Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204: 5–16.
- Hott SC, Gomes F V, Uliana DL, et al. (2017) Bed nucleus of the stria terminalis NMDA receptors and nitric oxide modulate contextual fear conditioning in rats. *Neuropharmacology* 112: 135–143.
- Howlett AC (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161–202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, et al. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1): 345–358.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, et al. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89: 309–380.
- Katona I and Freund TF (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 35: 529–558.
- Kupferschmidt DA, Klas P and Erb S (2012a) Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of corticotropin-releasing factor on the reinstatement of cocaine seeking and expression of cocaine-induced behavioural sensitization. *Br J Pharmacol* 167: 196–206.
- Kupferschmidt DA, Newman AE, Boonstra R, et al. (2012b) Antagonism of cannabinoid 1 receptors reverses the anxiety-like behavior induced by central injections of corticotropin-releasing factor and cocaine withdrawal. *Neuroscience* 204: 125–133.
- Lange MD, Daldrup T, Remmers F, et al. (2017) Cannabinoid CB1 receptors in distinct circuits of the extended amygdala determine fear responsiveness to unpredictable threat. *Mol Psychiatry* 22: 1422–1430.
- Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, et al. (2015) The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat Rev Neurosci* 16: 705–718.
- Massi L, Elezgarai I, Puente N, et al. (2008) Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. *J Neurosci* 28: 10496–10508.
- Matsuda LA, Bonner TI and Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327: 535–550.
- McKinney MK and Cravatt BF (2005) Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 74: 411–432.
- Mechoulam R and Parker LA (2013) The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol* 64: 21–47.

- Miles OW and Maren S (2019) Role of the bed nucleus of the stria terminalis in PTSD: Insights from preclinical models. *Front Behav Neurosci* 13: 68.
- Morena M, Patel S, Bains JS, et al. (2016) Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology* 41: 80–102.
- Myers B (2017) Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. *Physiol Behav* 172: 49–59.
- Newsom RJ, Osterlund C, Masini CV, et al. (2012) Cannabinoid receptor type 1 antagonism significantly modulates basal and loud noise induced neural and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses in male Sprague–Dawley rats. *Neuroscience* 204: 64–73.
- Oliveira LA, Almeida J, Benini R, et al. (2015) CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Pharmacol Res* 95–96: 53–62.
- Oliveira LA, Gomes-de-Souza L, Benini R, et al. (2018) Control of cardiovascular responses to stress by CRF in the bed nucleus of stria terminalis is mediated by local NMDA/nNOS/sGC/PKG signaling. *Psychoneuroendocrinology* 89: 168–176.
- Oscar CG, Müller-Ribeiro FC, de Castro LG, et al. (2015) Angiotensin-(1-7) in the basolateral amygdala attenuates the cardiovascular response evoked by acute emotional stress. *Brain Res* 1594: 183–189.
- Pacher P (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58: 389–462.
- Paxinos G and Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed. San Diego: Academic Press.
- Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, et al. (2010) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One* 5: e8869.
- Radley JJ and Johnson SB (2018) Anteroventral bed nuclei of the stria terminalis neurocircuitry: Towards an integration of HPA axis modulation with coping behaviors - Curt Richter Award Paper 2017. *Psychoneuroendocrinology* 89: 239–249.
- Reisiger A-R, Kaufling J, Manzoni O, et al. (2014) Nicotine self-administration induces CB1-dependent LTP in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 34: 4285–4292.
- Resstel LBM, Alves FHF, Reis DG, et al. (2008) Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154: 869–876.
- Sanders SK, Morzorati SL and Shekhar A (1995) Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala. *Brain Res* 699: 250–259.
- Sanders SK and Shekhar A (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 701–706.
- Scopinho AA, Lisboa SF, Guimarães FS, et al. (2013) Dorsal and ventral hippocampus modulate autonomic responses but not behavioral consequences associated to acute restraint stress in rats. *PLoS One* 8: e77750.
- Silberman Y and Winder DG (2013) Emerging role for corticotropin releasing factor signaling in the bed nucleus of the stria terminalis at the intersection of stress and reward. *Front Psychiatry* 4: 42.
- Tavares RF, Corrêa FMA and Resstel LBM (2009) Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87: 2601–2607.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, et al. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393–411.
- Ulrich-Lai YM and Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397–409.



ELSEVIER

[www.elsevier.com/locate/euroneuro](http://www.elsevier.com/locate/euroneuro)



# GABA<sub>A</sub> but not GABA<sub>B</sub> receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardic response to emotional stress in rats



Lucas Gomes-de-Souza<sup>a,b</sup>, Ricardo Benini<sup>a,b</sup>,  
Willian Costa-Ferreira<sup>a,b</sup>, Carlos C. Crestani<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rodovia Araraquara-Jau Km 01 (Campus Universitário), Campus Ville, 14800-903 Araraquara, SP, Brazil*

<sup>b</sup> *Joint UFSCar-UNESP Graduate Program in Physiological Sciences, São Carlos, SP, Brazil*

Received 28 October 2018; received in revised form 5 February 2019; accepted 2 March 2019

## KEYWORDS

Restraint stress;  
Hypothalamus;  
GABAergic neurotransmission;  
Blood pressure;  
Heart rate;  
Sympathetic activity

## Abstract

The lateral hypothalamus (LH) has been described as one of the hypothalamic areas involved in the behavioral and physiological responses triggered by aversive stimuli. Previous studies indicated involvement of the LH in cardiovascular responses to stress. Despite this evidence, the local neurochemical mechanisms involved in LH control of stress responses is still poorly understood. Therefore, in the present study, we investigated the role of GABAergic neurotransmission within the LH in cardiovascular responses induced by an acute session of restraint stress in rats. For this, we evaluated the effect of bilateral microinjection of selective antagonists of either GABA<sub>A</sub> or GABA<sub>B</sub> receptors into the LH on arterial pressure increase, heart rate (HR) increase and reduction in tail skin temperature induced by restraint stress. We found that microinjection of the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 into the LH decreased the increase in HR caused by restraint stress, but without affecting the increase in arterial pressure increase or the reduction in tail skin temperature. Conversely, LH treatment with the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 did not affect the restraint-evoked cardiovascular changes. These

\* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rodovia Araraquara-Jau Km 01 (Campus Universitário), Campus Ville, 14800-903 Araraquara, SP, Brazil.

E-mail address: [crestani@fcar.unesp.br](mailto:crestani@fcar.unesp.br) (C.C. Crestani).

findings indicate that GABAergic neurotransmission in the LH, acting through activation of local GABA<sub>A</sub> receptors, plays a facilitatory role in the tachycardic response observed during aversive threats.

© 2019 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

## Introduction

Physiological adjustments play a prominent role in survival and welfare by maintaining homeostasis during aversive situations (Crestani, 2016; Sterling, 2012; Ulrich-Lai and Herman, 2009). Changes in autonomic activity evoke immediate responses during stress, including increased arterial pressure and heart rate (HR); redistribution of blood flow, including reduced cutaneous and visceral perfusion and increased blood flow to the skeletal muscles; and modulation of baroreflex activity (Crestani, 2016; Dampney, 2015; Dampney et al., 2008). Increased sympathetic activity reduces cutaneous blood flow (Blessing, 2003), which in turn decrease skin temperature during aversive threats (Busnardo et al., 2019; Vianna and Carrive, 2005).

Cardiovascular responses during aversive threats are triggered by overlapping circuits in the central nervous system (CNS) (Dampney, 2015; Fontes et al., 2011; Myers, 2017; Ulrich-Lai and Herman, 2009). The lateral hypothalamus (LH) is a complex diencephalic area which has been found to be activated by several aversive stimuli (Briski and Gillen, 2001; Cullinan et al., 1995; Furlong et al., 2014; Motta and Canteras, 2015). Accordingly, the LH has been linked to the central network that regulates the stress responses (Myers, 2017; Ulrich-Lai and Herman, 2009). Regarding the cardiovascular changes, initial studies provided functional evidence of a role of this hypothalamic area in control of arterial pressure response evoked by conditioned aversive stimuli (Iwata et al., 1986; LeDoux et al., 1988). The influence of the LH in the control of cardiovascular responses to unconditioned aversive threats was reported only recently (Deolindo et al., 2013). In this sense, acute bilateral LH neurotransmission inhibition, caused by local treatment with the nonselective synaptic blocker CoCl<sub>2</sub>, enhanced tachycardia evoked by an acute session of restraint stress, but without affecting the pressor response (Deolindo et al., 2013). This effect was mimicked by local treatment with a selective NMDA glutamatergic receptor antagonist, thus indicating the involvement of local glutamatergic neurotransmission in LH control of cardiovascular responses to restraint stress (Deolindo et al., 2013). However, despite reports that the control of physiological and behavioral responses by the LH reflects a balance of local excitatory and inhibitory inputs (Stanley et al., 2011), the role of local inhibitory neurochemical mechanisms in LH control of stress responses has never been evaluated.

GABA has been shown to be a dominant neurotransmitter in the hypothalamus (Decavel and Van Den Pol, 1990). Accordingly, inhibitory control of LH neurons by local GABAergic (inter)neurons has been described previously (Burt et al., 2011; Konadhode et al., 2015). GABAergic inputs from limbic structures involved in the control of stress-evoked responses was also reported within the LH (Gritti et al., 1994; Jennings et al., 2013). Despite these findings,

the role of LH GABAergic neurotransmission in the control of stress responses has not been investigated. Therefore, this study aimed to evaluate the hypothesis that GABAergic neurotransmission within the LH is involved in the control of cardiovascular responses evoked by an acute session of restraint stress in rats. To test this hypothesis, animals received intra-LH bilateral microinjections of selective GABA<sub>A</sub> or GABA<sub>B</sub> receptor antagonists.

## Experimental procedures

### Animals

Twenty male Wistar rats weighing 240–260 g (60-days-old) were used. Animals were obtained from the animal breeding facility of the São Paulo State University (UNESP) (Botucatu, SP, Brazil), and were housed in plastic cages in a temperature-controlled room at 24 °C in the Animal Facility of the Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences - UNESP. They were kept under a 12:12 h light-dark cycle (lights on between 7:00 am and 7:00 pm) with free access to water and standard laboratory food. Housing conditions and experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Use of Animals of the School of Pharmaceutical Sciences/UNESP (approval # 61/2015), which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare.

### Surgical preparation

Five days before the trial, rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.). After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was exposed and stainless-steel guide cannulas (26 G, 13 mm-long) were bilaterally implanted into the LH at a position 1 mm above the site of injection, using a stereotaxic apparatus (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Stereotaxic coordinates for cannula implantation into the LH were: antero-posterior = +6.2 mm from interaural line; lateral = 1.8 mm from the medial suture; dorso-ventral = -7.6 mm from the skull (Paxinos and Watson, 1997). Cannulas were fixed to the skull with dental cement and one metal screw. After surgery, the animals received a poly-antibiotic containing streptomycins and penicillins (560 mg/ml/kg, i.m.) to prevent infection and the non-steroidal anti-inflammatory flunixin meglumine (0.5 mg/ml/kg, s.c.) for post-operation analgesia.

One day before the trial, rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.), and a catheter (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) filled with a solution of heparin (50 UI/ml, Hepamax-S®, Blausiegel, Cotia, SP, Brazil) diluted in saline (0.9% NaCl) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for cardiovascular recording. Catheter was tunneled under the cutaneous



and exteriorized on the animal's dorsum. After surgery, the non-steroidal anti-inflammatory flunixin meglumine (0.5 mg/ml/kg, s.c.) was administered for post-operation analgesia. The animals were kept in individual cages during the postoperative period and cardiovascular recording.

### Blood pressure and heart rate recording

The catheter implanted into the femoral artery was connected to a pressure transducer (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, USA). Pulsatile arterial pressure was recorded using an amplifier (Bridge Amp, ML224, ADInstruments, Australia) and an acquisition board (PowerLab 4/30, ML866/P, ADInstruments, NSW, Australia) connected to a personal computer. Mean arterial pressure (MAP) and HR values were derived from the pulsatile arterial pressure recording.

### Tail cutaneous temperature measurement

Tail cutaneous temperature was recorded using a thermal camera (IRI4010, Infra Red Integrated Systems Ltd., Northampton, UK). The analysis was performed using a software for thermographic analysis, and temperature was represented by color intensity variations (Busnardo et al., 2019; Vianna and Carrive, 2005). For image analysis, the temperature was measured on five points along the animal's tail, and the mean value was calculated for each recording (Adami et al., 2017; Gomes-de-Souza et al., 2016).

### Drugs and solutions

SR95531 (selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist) (Tocris, Westwoods Business, Park Ellisville, MO, USA), CGP35348 (selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist) (Tocris), tribromoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and urethane (Sigma-Aldrich) were dissolved in saline (NaCl 0.9%). Flunixin meglumine (Banamine®; Schering-Plough, Cotia, SP, Brazil) and the poly-antibiotic preparation (Pentabiotico®; Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) were used as provided.

### Drug microinjection into the lateral hypothalamus

The needles (33 G, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) used for microinjection into the LH were 1 mm longer than the guide cannulas and were connected to a 2  $\mu$ L syringe (7002-KH, Hamilton Co., Reno, NV, USA) using a PE-10 tubing (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA). Needles were carefully inserted into the guide cannulas without restraining the animals, and drugs were injected in the final volume of 100 nL (Crestani et al., 2009; Deolindo et al., 2013).

### Restraint stress

Each rat was placed in a plastic cylindrical restraint tube (diameter 6.5 cm, length 15 cm), ventilated by holes (1 cm diameter) that made up approximately 20% of the tube surface. Restraint lasted 60 min (Deolindo et al., 2013), and

immediately after the end of the stress exposure rats were returned to their home cages. Each rat was submitted to only one session of restraint in order to avoid habituation.

### Experimental protocols

Animals were brought to the experimental room in their own cages. Animals were allowed at least 60 min to adapt to the experimental room conditions, such as sound and illumination, before the experiment was commenced. The experimental room was temperature-controlled (24 °C) and acoustically isolated from the other rooms.

Independent sets of animals received bilateral microinjections into the LH of the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 (0.01 nmol/100 nL,  $n = 6$ ), the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 (10 nmol/100 nL,  $n = 7$ ) or vehicle (saline, 100 nL,  $n = 7$ ). The drug dosage was selected according to the  $K_i$  value of the drug (Heaulme et al., 1986; Olpe et al., 1990), as well as the dosage used in previous studies that performed intra-hypothalamic microinjections (Zhong et al., 2008; Zhou et al., 2014). Ten minutes after LH pharmacological treatment, the animals underwent a 60 min session of restraint stress.

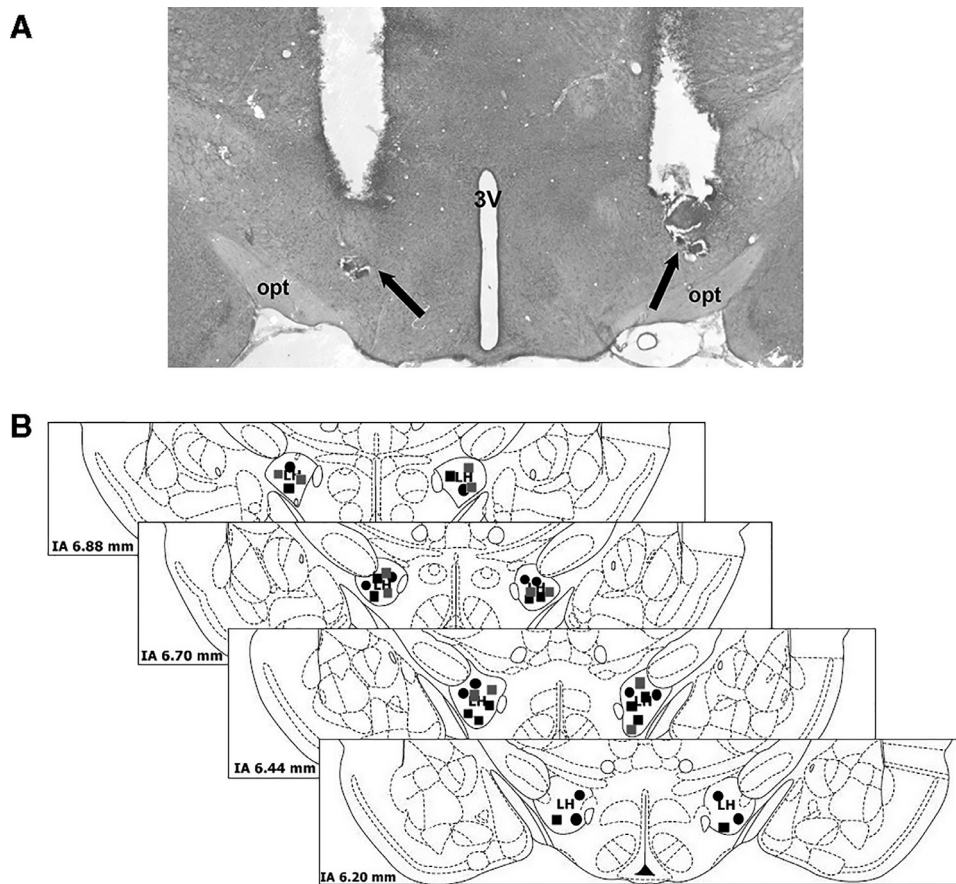
Cardiovascular recording began at least 30 min before the onset of restraint and was performed throughout the session of stress. The tail cutaneous temperature was measured 10, 5 and 0 min before the restraint for baseline values, and at 10, 20, 40 and 60 min during restraint (Busnardo et al., 2019; Gomes-de-Souza et al., 2016). Each animal received a single pharmacological treatment and was submitted to one session of restraint.

### Histological determination of the microinjection sites

At the end of experiments, rats were anesthetized with urethane (250 mg/ml/200 g body weight, i.p.) and 100 nL of 1% Evan's blue dye was injected into the brain as a marker of the injection site. Then, the chest was surgically opened, the descending aorta occluded, the right atrium severed and the brain perfused with 0.9% NaCl followed by 10% formalin through the left ventricle. Afterwards, the brain was removed and post-fixed in 10% formalin for at least 48 h at 4 °C. Serial 40  $\mu$ m-thick sections of the LH region were cut using a cryostat (CM1900, Leica, Wetzlar, Germany). The actual placement of the microinjection needles was determined according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997) by analyzing the serial sections under a light microscopy.

### Data analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Basal values of MAP, HR and tail cutaneous temperature before and after LH pharmacological treatment were compared using the Student's  $t$ -test. Time-course curves of cardiovascular and cutaneous temperature changes were analyzed using the two-way ANOVA, with treatment as a main factor and time as a repeated measure, followed by Bonferroni's *post hoc*



**Fig. 1** (A) Photomicrograph of a coronal brain section from a representative rat showing bilateral injection sites into the lateral hypothalamus (LH). (B) Diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997) indicating the microinjection sites of vehicle (black circles), the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 (grey squares) and the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 (black squares) into the LH. IA - interaural coordinate; opt - optic chiasm.

test. The mean of the values during the first 10 min of the restraint session (onset), and during the remaining restraint stress period (plateau) were also calculated. These values were compared using the two-way ANOVA, with treatment as a main factor and time (onset vs plateau) as a repeated measure, followed by Bonferroni's *post hoc* test. Results of statistical tests with  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

Diagrammatic representations showing the bilateral injection sites into the LH of all animals used in the present study are presented in Fig. 1. A photomicrograph of a coronal brain section depicting microinjection sites into the LH of a representative animal is also presented in Fig. 1.

Bilateral microinjection of either the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 (0.01 nmol/100 nL,  $n=6$ ) or the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 (10 nmol/100 nL,  $n=7$ ) into the LH did not alter the baseline values of MAP, HR and tail cutaneous temperature; when compared with animals locally treated with vehicle (100 nL,  $n=7$ ) (Table 1). However, analysis of the time-course curves indicated that restraint stress evoked increase in

MAP (time factor:  $F_{(35,595)} = 21.11$ ,  $P < 0.0001$ ) and HR (time factor:  $F_{(35,595)} = 13.42$ ,  $P < 0.0001$ ), and decreased the tail skin temperature (time factor:  $F_{(6102)} = 11.8$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2). Analysis also indicated main effect of the LH pharmacological treatments (treatment factor:  $F_{(2,17)} = 3.60$ ,  $P=0.049$ ) and treatment x time interaction ( $F_{(70,595)} = 1.60$ ,  $P=0.002$ ) for the HR values (Fig. 2). Nevertheless, analysis did not indicate effect of treatment (MAP:  $F_{(2,17)} = 1.24$ ,  $P=0.313$ ; skin temperature:  $F_{(2,17)} = 0.68$ ,  $P=0.515$ ) or treatment x time interaction (MAP: ( $F_{(70,595)} = 0.78$ ,  $P=0.897$ ); skin temperature:  $F_{(12,102)} = 1.35$ ,  $P=0.202$ ) for the MAP and tail skin temperature responses (Fig. 2). *Post-hoc* analysis of the HR response revealed that LH treatment with SR95531 ( $P=0.039$ ), but not with CGP35348 ( $P=0.875$ ), decreased the restraint-evoked tachycardic response (Fig. 2).

Analysis of the mean responses during the onset (10 first minutes) and plateau period of restraint stress indicated main effect of treatment ( $F_{(2,34)} = 6.69$ ,  $P=0.003$ ) and time ( $F_{(1,34)} = 4.85$ ,  $P=0.034$ ), but without treatment x time interaction ( $F_{(2,34)} = 0.62$ ,  $P=0.540$ ) for the HR values (Fig. 2). Nevertheless, analysis did not indicate effect of either treatment (MAP:  $F_{(2,34)} = 2.97$ ,  $P=0.065$ ; skin temperature:  $F_{(2,34)} = 1.22$ ,  $P=0.307$ ) or time (MAP:  $F_{(1,34)} = 2.54$ ,  $P=0.120$ ; skin temperature:  $F_{(1,34)} = 2.79$ ,

**Table 1** Basal parameters of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and tail skin temperature before and after pharmacological treatment of the lateral hypothalamus (LH) with the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 ( $n=6$ ), the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 ( $n=7$ ) or vehicle (control,  $n=7$ ).

Groups	MAP (mmHg)		HR (bpm)		Tail skin temperature (°C)	
	before	after	before	after	before	after
Control	97 ± 5 $t=0.2, P=0.78$	99 ± 4	362 ± 2 $t=0.6, P=0.55$	389 ± 3	29 ± 0.6 $t=0.1, P=0.85$	29 ± 0.4
SR95531	111 ± 2 $t=0.6, P=0.51$	113 ± 2	375 ± 9 $t=2.2, P=0.05$	404 ± 9	30 ± 0.7 $t=1.2, P=0.2$	29 ± 0.1
CGP35348	108 ± 2 $t=0.5, P=0.61$	106 ± 2	413 ± 1 $t=0.1, P=0.88$	409 ± 2	28 ± 0.5 $t=0.1, P=0.88$	28 ± 0.6

Mean ± SEM, Student's *t*-test.

$P=0.104$ ), or treatment  $\times$  time interaction (MAP:  $F_{(2,34)} = 0.17, P=0.840$ ; skin temperature:  $F_{(2,34)} = 0.47, P=0.627$ ) for the MAP and tail skin temperature responses (Fig. 2). *Post-hoc* analysis of the HR response revealed that LH treatment with SR95531 (onset:  $P=0.016$ , plateau:  $P=0.047$ ), but not with CGP35348 (onset:  $P=0.192$ , plateau:  $P=0.994$ ), decreased the restraint-evoked tachycardic response during both onset and plateau period of the restraint stress session (Fig. 2).

## Discussion

Our results provide the first evidence supporting the involvement of GABAergic neurotransmission within the LH in the control of stress responses. Specifically, we observed that bilateral microinjection of the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 into the LH decreased the HR increase during restraint stress, but without affecting the pressor response or the reduction in tail cutaneous temperature. Nevertheless, LH treatment with the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 did not affect the restraint-evoked cardiovascular changes evaluated in the present study.

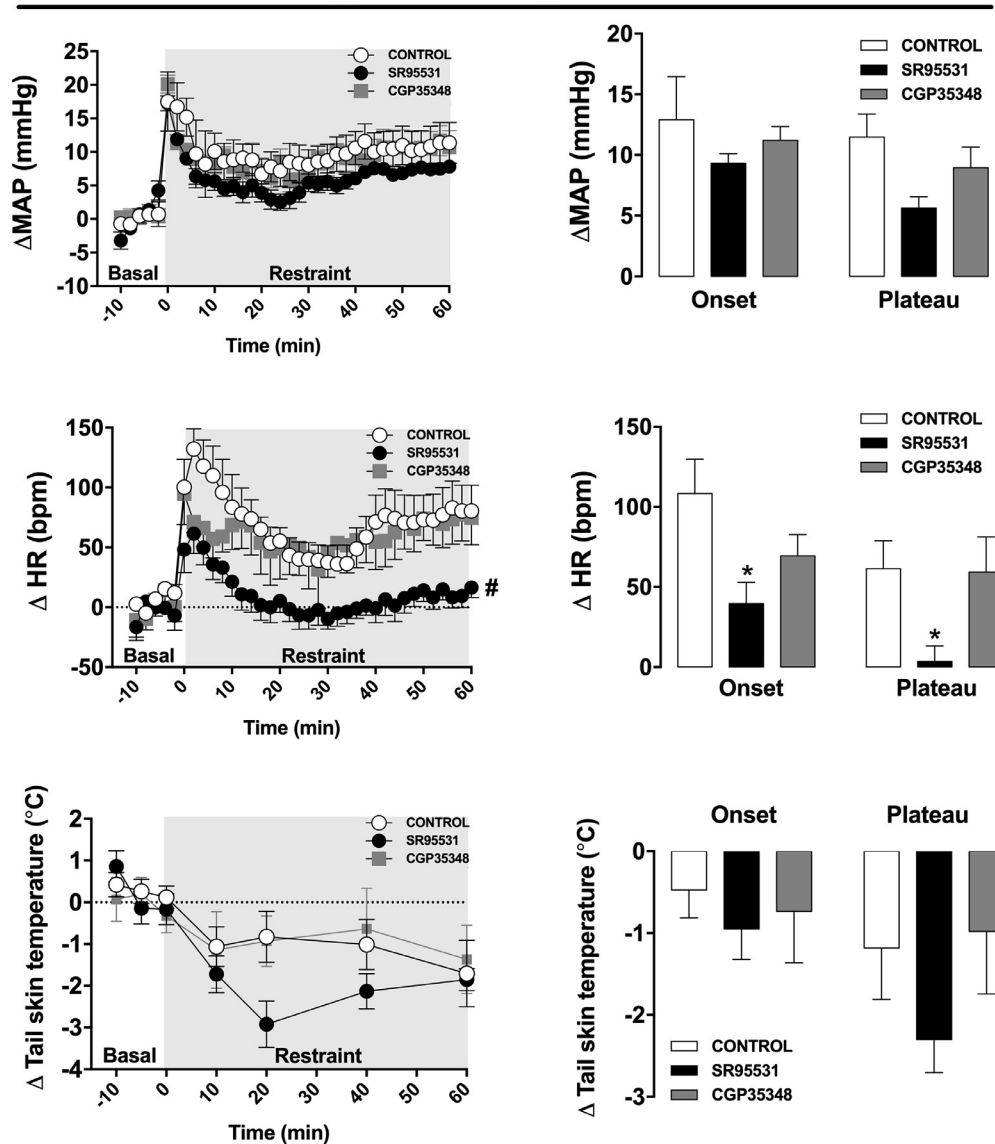
Deolindo et al. (2013) reported that acute bilateral LH neurotransmission inhibition caused by local treatment with the nonselective synaptic blocker CoCl<sub>2</sub> enhanced tachycardia evoked by restraint stress without affecting the pressor response. This effect was mimicked by LH treatment with a selective NMDA receptor antagonist (Deolindo et al., 2013), thus supporting the role of local glutamatergic neurotransmission. Taken together, these results provided evidence of an inhibitory role of the LH in the control of the cardiac responses to stress, which is mediated, at least partly, by local glutamatergic neurotransmission. The results reported in the present study provide further evidence of the inhibitory role of the LH in the control of the tachycardic response to stress. Indeed, we identified that antagonism of local inhibitory neurotransmission (i.e., GABAergic neurotransmission), which increase local neuronal activation (Jones et al., 2011), decreased the restraint-evoked HR increase. More importantly, the results reported in the present study provide the first evidence of activation of GABAergic neurotransmission within the LH during aversive threats, which is involved in the processing of stress responses via activation of the GABA<sub>A</sub> receptor. In this sense, since the enhanced

tachycardia observed following the nonselective synaptic blockade within the LH by local microinjection of CoCl<sub>2</sub> is mimicked by local treatment with a glutamate receptor antagonist (Deolindo et al., 2013), it seems that GABA release within the LH during stress modulates the effects mediated by activation of local glutamatergic inputs rather than mediates the LH control of stress-evoked responses. In this sense, similar to the control of behavioral responses (Stanley et al., 2011), the role of the LH in stress-evoked cardiovascular responses seems to be the resulted of the balance in activation of glutamatergic and GABAergic inputs to the LH.

The LH has been linked to the central network that regulates the cardiovascular responses to stress by connecting limbic structures, such as the hippocampus and the central amygdala, to effector structures in the hypothalamus, brainstem and sympathetic neurons in the intermediolateral column (Myers, 2017). In this sense, GABAergic inputs within the LH were identified from limbic structures such as the preoptic area, the anterior hypothalamic area (AHA) and the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Gritti et al., 1994; Jennings et al., 2013). Accordingly, all of these regions contain a high density of GABA-producing neurons (Boudaba et al., 1996; Cullinan et al., 1993; Okamura et al., 1990; Radley et al., 2009), and most projections for other limbic structures are GABAergic (Boudaba et al., 1996; Myers et al., 2014; Roland and Sawchenko, 1993). Previous studies reported that activation of either glutamate receptors within the BNST or angiotensinergic AT<sub>1</sub> receptors within the AHA during restraint stress enhanced restraint-evoked cardiovascular responses (Adami et al., 2017; Kubo et al., 2001). Therefore, it is possible that control of restraint-evoked cardiovascular responses demonstrated in the present study by LH GABA<sub>A</sub> receptors is part of the neural circuitry related to BNST and AHA control, since activation of GABAergic inputs from the BNST and AHA might inhibit neuronal activation within the LH, which in turn facilitates cardiovascular responses. On the other hand, recent studies have reported that local neurotransmission inhibition in preoptic nuclei (that is, medial and lateral) enhanced restraint-evoked tachycardia, thus indicating an inhibitory role (Duarte et al., 2017; Fassini et al., 2017). Although these findings preclude the idea of an involvement of LH GABAergic neurotransmission in networks related to preoptic area control of cardiovascular responses to stress, the possible role of local excitatory neurochemical



## GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> Antagonists



**Fig. 2** Effect of lateral hypothalamus (LH) treatment with selective GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor antagonists in cardiovascular changes evoked by acute restraint stress. (Left) Time course curves of changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP), heart rate ( $\Delta$ HR), and tail skin temperature ( $\Delta$  tail skin temperature) induced by restraint stress in animals that received bilateral microinjection of vehicle (control, 100 nL;  $n = 7$  ○), the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531 (0.01 nmol/100 nL;  $n = 6$  ●) or the selective GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP35348 (10 nmol/100 nL;  $n = 7$  ■) into the LH. Shaded area indicates the period of restraint. Circles represent the mean and bars the standard error of the mean (SEM). #  $P < 0.05$  over the whole restraint period compared to vehicle-treated animals, two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (Right) Mean  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ HR and  $\Delta$  tail temperature during onset (10 first minutes) and plateau phase of restraint stress in animals subjected to LH treatment with vehicle (white bars,  $n = 7$ ), SR95531 (black bars,  $n = 6$ ) or CGP35348 (grey bars,  $n = 7$ ). Columns represent the mean and bars the SEM. \*  $P < 0.05$  versus vehicle-treated group, two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

mechanisms in control of cardiovascular responses to stress by preoptic nuclei has never been reported. Despite these findings, further studies are necessary to elucidate the central network related to LH GABAergic neurotransmission control of stress-evoked cardiovascular responses.

The LH is a heterogenous area containing distinct cell types, including excitatory and inhibitory amino acids; as well as neuropeptides, being orexin and melanin-concentrating hormone (MCH) predominantly found in the

LH (Berthoud and Münzberg, 2011; Stuber and Wise, 2016). Orexin neurons project to hypothalamic and brainstem autonomic regions, as well as to sympathetic neurons in the spinal cord (Carrive, 2017). Previous studies reported decreased cardiovascular responses to several psychological stressors in orexin knockout mice, as well as following systemic injection of orexin receptor antagonists (Beig et al., 2015; Furlong et al., 2009; Kayaba et al., 2003). The facilitatory influence of orexin in stress-evoked

cardiovascular responses precludes the idea of an involvement in the effects reported here, since disinhibition of orexin neurons evoked by LH treatment with the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist is expected to increase, rather than decrease, cardiovascular responses to restraint stress. This is further supported by evidence that orexin neurons are not involved in cardiovascular responses evoked by restraint stress (Furlong et al., 2009). Regarding the MCH, despite reports that MCH receptor antagonists decrease stress-induced hyperthermia (Smith et al., 2009, 2006), its specific role in cardiovascular responses during aversive threats has never been documented. However, observations that intracerebroventricular administration of MCH decreased blood pressure and HR in non-stressed animals (Messina and Overton, 2007) suggests that the facilitatory influence of LH GABAergic neurotransmission in restraint-evoked tachycardic response might be mediated by inhibition of local MCH neurons. In addition to neuropeptides, we cannot exclude the prominent role of neurons expressing amino acids, since in addition to identification of the abundant expression of glutamatergic and GABAergic neurons within the LH, markers of these amino acids were identified in orexin and MCH neurons (Stuber and Wise, 2016). Despite these findings, further studies are necessary to elucidate the local neuronal population involved in control of stress-evoked cardiovascular responses.

Both the sympathetic and parasympathetic nervous system are involved in cardiovascular responses during aversive threats (Crestani, 2016). Regarding the HR increase, it was previously reported that antagonism of muscarinic cholinergic receptors facilitated, while  $\beta_1$ -adrenoceptor blockade decreased this response (Carrive, 2006; Dos Reis et al., 2014), thus indicating coactivation of both sympathetic and parasympathetic tone to the heart during stress. In this sense, there is anatomic evidence of projections from the LH to brainstem regions containing parasympathetic neurons, such as the dorsal motor nucleus and the nucleus ambiguus (Luiten et al., 1987; ter Horst et al., 1984). Accordingly, previous studies indicated that the inhibitory control of HR response to restraint stress by NMDA glutamate receptors within the LH was mediated by facilitation of parasympathetic tone to the heart (Deolindo et al., 2013). Therefore, the facilitatory influence of LH GABA<sub>A</sub> receptor in restraint-evoked tachycardia might be mediated by inhibition of facilitatory drive to parasympathetic neurons in the brainstem. However, considering that the LH connects directly, and indirectly via regions in the ventrolateral medulla, to sympathetic neurons in the intermedialateral column (Allen and Cechetto, 1992; Saper et al., 1976), we cannot exclude the possibility that control by LH GABAergic neurotransmission is also mediated by inhibition of inhibitory drive to sympathetic neurons.

In summary, the findings reported in the present study reveal the involvement of GABAergic neurotransmission within the LH in control of cardiovascular changes observed during aversive threats. Specifically, our results provide evidence that activation of GABA<sub>A</sub>, but not GABA<sub>B</sub>, receptors within the LH plays a facilitatory role in stress-evoked tachycardia, but without affecting the arterial pressure increase and the sympathetically-mediated cutaneous vasoconstriction.

## Contributors

L.G.S. and C.C.C. conceived and designed this research; L.G.S., R.B. and W.C.F. performed the experiments and analysed the data; L.G.S., R.B. and W.C.F. and C.C.C. interpreted the results of experiments; L.G.S. prepared the figures and drafted the manuscript; L.G.S. and C.C.C. edited and revised the manuscript; C.C.C. approved the final version of the manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Role of funding source

Funding for this study was provided by FAPESP (grants # 2015/05922-9 and 2017/19249-0) and CNPq (grant # 456405/2014-3), and Scientific Support and Development Program of School of Pharmaceutical Sciences (UNESP). LGS and WCF are FAPESP PhD fellow (2016/05028-9 and 2016/05218-2, respectively), RB is a CAPES PhD fellow and CCC is a CNPq research fellow (process # 305583/2015-8). The FAPESP, CAPES and CNPq had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

## References

- Adami, M.B., Barretto-De-Souza, L., Duarte, J.O., Almeida, J., Crestani, C.C., 2017. Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *J. Psychopharmacol.* 31, 674-681. doi:10.1177/0269881117691468.
- Allen, G.V., Cechetto, D.F., 1992. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area: I. Descending projections. *J. Comp. Neurol.* 315, 313-332. doi:10.1002/cne.903150307.
- Beig, M.I., Dampney, B.W., Carrive, P., 2015. Both Ox1r and Ox2r orexin receptors contribute to the cardiovascular and locomotor components of the novelty stress response in the rat. *Neuropharmacology* 89, 146-156. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.09.012.
- Berthoud, H.-R., Münzberg, H., 2011. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol. Behav.* 104, 29-39. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.051.
- Blessing, W.W., 2003. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23, 527-538. doi:10.1023/A:1025020029037.
- Boudaba, C., Szabó, K., Tasker, J.G., Szabo, K., Tasker, J.G., 1996. Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurosci.* 16, 7151-7160.
- Briski, K., Gillen, E., 2001. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Res. Bull.* doi:10.1016/S0361-9230(01)00532-9.
- Burt, J., Alberto, C.O., Parsons, M.P., Hirasawa, M., 2011. Local network regulation of orexin neurons in the lateral hypothalamus. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 301, R572-R580. doi:10.1152/ajpregu.00674.2010.

- Busnardo, C., Crestani, C.C., Scopinho, A.A., Packard, B.A., Resstel, L.B.M., Correa, F.M.A., Herman, J.P., 2019. Nitrogenic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 90, 16-27. doi:10.1016/J.PNPBP.2018.11.001.
- Carrive, P., 2017. Orexin, stress and central cardiovascular control. A link with hypertension? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 74, 376-392. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.06.044.
- Carrive, P., 2006. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1251-1254. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04519.x.
- Crestani, C.C., 2016. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. *Front. Physiol.* 7, 251. doi:10.3389/fphys.2016.00251.
- Crestani, C.C., Deolindo, M.V., Alves, F.H., Resstel, L.B., Correa, F.M., 2009. Non- N -methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1079-1085. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05191.x.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 477-505. doi:10.1016/0306-4522(94)00355-9.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Watson, S.J., 1993. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 332, 1-20. doi:10.1002/cne.903320102.
- Dampney, R.A.L., 2015. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R429-R443. doi:10.1152/ajpregu.00051.2015.
- Dampney, R.A.L., Horiuchi, J., McDowall, L.M., 2008. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton. Neurosci.* 142, 3-10. doi:10.1016/j.autneu.2008.07.005.
- Decavel, C., Van Den Pol, A.N., 1990. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.903020423.
- Deolindo, M.V., Reis, D.G., Crestani, C.C., Tavares, R.F., Resstel, L.B.M., Corrêa, F.M.A., 2013. NMDA receptors in the lateral hypothalamus have an inhibitory influence on the tachycardiac response to acute restraint stress in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2374-2381. doi:10.1111/ejn.12246.
- Dos Reis, D.G., Fortaleza, E.A.T., Tavares, R.F., Corrêa, F.M.A., 2014. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress* 17, 362-372. doi:10.3109/10253890.2014.930429.
- Duarte, J.O., Gomes, K.S., Nunes-de-Souza, R.L., Crestani, C.C., 2017. Role of the lateral preoptic area in cardiovascular and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Physiol. Behav.* 175, 16-21. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.030.
- Fassini, A., Scopinho, A.A., Alves, F.H.F., Fortaleza, E.A.T., Corrêa, F.M.A., 2017. The medial preoptic area modulates autonomic function under resting and stress conditions. *Neuroscience* 364, 164-174. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.09.026.
- Fontes, M.A.P., Xavier, C.H., de Menezes, R.C.A., DiMicco, J.A., 2011. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* 184, 64-74. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.018.
- Furlong, T.M., McDowall, L.M., Horiuchi, J., Polson, J.W., Dampney, R.A.L., 2014. The effect of air puff stress on c-Fos expression in rat hypothalamus and brainstem: central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1429-1438. doi:10.1111/ejn.12521.
- Furlong, T.M., Vianna, D.M.L., Liu, L., Carrive, P., 2009. Hypocretin /orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1603-1614. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06952.x.
- Gomes-de-Souza, L., Oliveira, L.A., Benini, R., Rodella, P., Costa-Ferreira, W., Crestani, C.C., 2016. Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2833-2844. doi:10.1111/bph.13560.
- Gritti, I., Mainville, L., Jones, B.E., 1994. Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 339, 251-268. doi:10.1002/cne.903390206.
- Heulme, M., Chambon, J.-P., Leyris, R., Molimard, J.-C., Wermuth, C.G., Biziere, K., 1986. Biochemical characterization of the interaction of three pyridazinyl-GABA derivatives with the GABAA receptor site. *Brain Res.* 384, 224-231. doi:10.1016/0006-8993(86)91158-3.
- Iwata, J., LeDoux, J.E., Reis, D.J., 1986. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. *Brain Res.* 368, 161-166.
- Jennings, J.H., Rizzi, G., Stamatakis, A.M., Ung, R.L., Stuber, G.D., 2013. The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341, 1517-1521. doi:10.1126/science.1241812, (80-).
- Jones, K.R., Myers, B., Herman, J.P., 2011. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. *Physiol. Behav.* 104, 266-271. doi:10.1016/j.physbeh.2011.03.021.
- Kayaba, Y., Nakamura, A., Kasuya, Y., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., Komuro, I., Fukuda, Y., Kuwaki, P., 2003. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 285, R581-R593. doi:10.1152/ajpregu.00671.2002.
- Konadhode, R.R., Pelluru, D., Shiromani, P.J., 2015. Neurons containing orexin or melanin concentrating hormone reciprocally regulate wake and sleep. *Front. Syst. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fnsys.2014.00244.
- Kubo, T., Numakura, H., Endo, S., Hagiwara, Y., Fukumori, R., 2001. Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. *Brain Res. Bull.* 56, 569-574. doi:10.1016/S0361-9230(01)00729-8.
- LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P., Reis, D.J., 1988. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.1001-06.2006.
- Luiten, P.G.M., ter Horst, G.J., Steffens, A.B., 1987. The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016/0301-0082(87)90004-9.
- Messina, M.M., Overton, J.M., 2007. Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. *Regul. Pept.* 139, 23-30. doi:10.1016/J.REGPEP.2006.08.013.
- Motta, S.C., Canteras, N.S., 2015. Restraint stress and social defeat: what they have in common. *Physiol. Behav.* 146, 105-110. doi:10.1016/j.physbeh.2015.03.017.
- Myers, B., 2017. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. *Physiol. Behav.* 172, 49-59. doi:10.1016/j.physbeh.2016.10.015.
- Myers, B., Mark Dolgas, C., Kasckow, J., Cullinan, W.E., Herman, J.P., 2014. Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Struct. Funct.* 219, 1287-1303. doi:10.1007/s00429-013-0566-y.

- Okamura, H., Abitbol, M., Julien, J.F., Dumas, S., Béro, A., Gelfard, M., Kitahama, K., Bobillier, P., Mallet, J., Wiklund, L., 1990. Neurons containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by *in situ* hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 39, 675-699. doi:10.1016/0306-4522(90)90252-Y.
- Olpe, H.-R., Karlsson, G., Pozza, M.F., Brugger, F., Steinmann, M., Van Riezen, H., Fagg, G., Hall, R.G., Froestl, W., Bittiger, H., 1990. CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 187, 27-38. doi:10.1016/0014-2999(90)90337-6.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd ed.* Acad. Press, San Diego.
- Radley, J.J., Gosselink, K.L., Sawchenko, P.E., 2009. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J. Neurosci.* 29, 7330-7340. doi:10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009.
- Roland, B.L., Sawchenko, P.E., 1993. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 332, 123-143. doi:10.1002/cne.903320109.
- Saper, C.B., Loewy, A.D., Swanson, L.W., Cowan, W.M., 1976. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res.* 117, 305-312.
- Smith, D.G., Davis, R.J., Rorick-Kehn, L., Morin, M., Witkin, J.M., McKinzie, D.L., Nomikos, G.G., Gehlert, D.R., 2006. Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. *Neuropsychopharmacology* 31, 1135-1145. doi:10.1038/sj.npp.1300913.
- Smith, D.G., Hegde, L.G., Wolinsky, T.D., Miller, S., Papp, M., Ping, X., Edwards, T., Gerald, C.P., Craig, D.A., 2009. The effects of stressful stimuli and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation are reversed by the melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847 in rodents. *Behav. Brain Res.* 197, 284-291. doi:10.1016/j.bbr.2008.08.026.
- Stanley, B.G., Urstadt, K.R., Charles, J.R., Kee, T., 2011. Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiol. Behav.* 104, 40-46. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.046.
- Sterling, P., 2012. Allostasis: a model of predictive regulation. *Physiol. Behav.* 106, 5-15. doi:10.1016/j.physbeh.2011.06.004.
- Stuber, G.D., Wise, R.A., 2016. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat. Neurosci.* 19, 198-205. doi:10.1038/nrn.4220.
- ter Horst, G.J., Luiten, P.G.M., Kuipers, F., 1984. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguous nuclei in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 11, 59-75. doi:10.1016/0165-1838(84)90008-0.
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* doi:10.1038/nrn2647.
- Vianna, D.M.L., Carrive, P., 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2505-2512. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x.
- Zhong, M.-K., Shi, Z., Zhou, L.-M., Gao, J., Liao, Z.-H., Wang, W., Gao, X.-Y., Zhu, G.-Q., 2008. Regulation of cardiac sympathetic afferent reflex by GABA(A) and GABA(B) receptors in paraventricular nucleus in rats. *Eur. J. Neurosci.* 27, 3226-3232. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06261.x.
- Zhou, H., Sun, H., Chang, J., Ding, L., Gao, Q., Tang, C., Zhu, G., Zhou, Y., 2014. Cardiac sympathetic afferent reflex response to intermedin microinjection into paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and  $\gamma$ -amino butyric acid in hypertensive rats. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 239, 1352-1359. doi:10.1177/1535370214533882.