



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS CONVÊNIO UFSCar/UNESP**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO CRFérgica DO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL (NLET) NAS RESPOSTAS  
AUTONÔMICAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO AGUDO  
EM RATOS.**

**Leandro Augusto de Oliveira**

**Araraquara, SP**

**-2015-**



**Leandro Augusto de Oliveira**

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA DO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL (NLET) NAS RESPOSTAS  
AUTONÔMICAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO AGUDO  
EM RATOS.**

Dissertação a ser apresentada ao  
Programa Interinstitucional de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas,  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Fisiológicas

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

**Araraquara, SP**

**-2015-**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O48ee Oliveira, Leandro Augusto de.  
Estudo do envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET) nas respostas autonômicas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos / Leandro Augusto de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
61 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Fisiologia. 2. CRF. 3. Estresse. 4. Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET). 5. Ratos. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Leandro Augusto de Oliveira, realizada em 10/04/2015:

---

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

---

Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes  
UFMG

---

Profa. Dra. Sandra Lja do Amaral Cardoso  
UNESP

*Dedico este trabalho à minha família,  
especialmente para minha tia Mirna.*

## **Agradeço:**

Agradeço primeiro a Deus, por minha saúde e por todo auxílio em superar todos os desafios desta fase, que foram muitos e não foram fáceis. Por sempre me fazer acreditar e nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani pela oportunidade de estagiar em seu laboratório e permitir que fizesse parte de sua equipe. Por me dar todo o suporte desde o estágio, realização da prova de ingresso e durante todo o mestrado. Muito obrigado por sua dedicação e paciência, tenho o senhor como um exemplo de pesquisador.

À todos os colegas do grupo do professor Carlos, mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica, em especial aos meus amigos Jeferson e Ricardo, por terem colaborado com o desenvolvimento do trabalho. Sou muito grato a vocês, podem contar sempre comigo. E também ao Lucas e Willian, não só pelos momentos partilhados dentro do laboratório, mas também os momentos fora.

Aos amigos do laboratório Tatiani, Sheila, Ana Cláudia, Gessynger, Ariela, Diego, Maria Adrieli, Paula, Ludimila, Mateus, que me aguentaram todos esses anos! Obrigado por me acolherem, estarem sempre dispostos a ajudar, tornando nosso ambiente de trabalho prazeroso. À todas as festas, risadas, idas à cantina, reuniões e confusões da Escola de Férias. Obrigado “família farmaco”.

Às amigas que fiz na faculdade, Ju (Toxicologia) e Gi (Farmacotécnica), Karine (Fisiologia) muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos! Torço muito por vocês.

Às técnicas do laboratório, Rosana e Elisabete e à secretaria do departamento, Tirene. Vocês são demais! Muito obrigado pela paciência e por me socorrerem sempre quando mais precisei.

À todos os professores Cléo, Ricardo e Marcelo, pelos momentos de convivência.

Aos secretários do programa Alexandre (UFSCar) e à Cláudia (UNESP), por toda assistência prestada.

À 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 oportunidade.

À FAPESP, pelo apoio financeiro que foi concedido para o estudo e divulgação em congressos.

Aos meus amigos e “gordos” favoritos Rodrigo e Camila. Vocês fizeram a diferença em todo este processo, acompanharam tudo de perto. Muito obrigado por todos os finais de semana

com vocês! Sem vocês eu não estaria aqui. À Carla, Giovani, Saulo e Flávia, meus verdadeiros amigos e “gordos”, que mesmo distantes estão sempre torcendo por mim e sempre me dando forças!

À toda a minha família, em especial aos meus pais Paulo e Maria, ao meu irmão Plínio, minha cunhada Dinara. À minha tia Mirna a qual tenho tanta admiração, entrei na vida acadêmica seguindo o seu exemplo. Aos meus avós Lourival, Ilda e Elza e à minha tia-avó Iria. À todos meus primos e tios. Muito obrigado por todo apoio e suporte. Vocês são meu alicerce.





## Resumo

O fator liberador de corticotropina (CRF) está envolvido em respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse emocional por meio de sua ação em várias estruturas límbicas, incluindo o núcleo leito da estria terminal (NLET). No entanto, o papel dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nas respostas autonômicas durante situações aversivas é desconhecido. Portanto, no presente estudo nós investigamos o envolvimento de receptores de CRF do NLET nas respostas autonômicas evocadas pelo estresse de restrição agudo em ratos. Para isso, foram avaliados os efeitos do tratamento bilateral do NLET com agonistas e antagonistas seletivos dos receptores CRF<sub>1</sub> ou CRF<sub>2</sub> nas respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca e de diminuição da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição agudo. Microinjeção do antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395, no NLET reduziu as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca evocadas pelo estresse por restrição. Por outro lado, o tratamento do NLET com o agonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>, CRF, causou um aumento das respostas pressora e taquicárdica e reduziu a resposta de queda de temperatura cutânea da cauda. Os efeitos do CRF foram inibidos pelo pré-tratamento do NLET com CP376395. O antagonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, reduziu o aumento da pressão arterial e a queda da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição. O agonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>, urocortina-3, potenciou as respostas pressora e taquicárdica e reduziu a queda na temperatura cutânea da cauda. Todos os efeitos da urocortina-3 foram abolidos pelo pré-tratamento local no NLET com antisauvagine-30. Esses resultados indicam um envolvimento de ambos os receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nos ajustes autonômicos durante o estresse emocional.

**Palavras-chave:** neuropeptídeos; CRF; urocortina; NLET; amígdala extendida; cardiovascular; estresse.



## Abstract

The corticotropin-releasing factor (CRF) is involved in behavioral and physiological responses to emotional stress through its action in several limbic structures, including the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Nevertheless, the role of CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors in the BNST in autonomic adjustments during aversive threat is unknown. Therefore, in the present study we investigated the involvement of CRF receptors within the BNST in autonomic responses evoked by the acute restraint stress in rats. For this, we evaluated the effects of bilateral treatment of the BNST with selective agonists and antagonists of either CRF<sub>1</sub> or CRF<sub>2</sub> receptors in the arterial pressure and heart rate increase and the decrease in tail skin temperature induced by restraint stress. Microinjection of the selective CRF<sub>1</sub> receptor antagonist CP376395 into the BNST reduced the pressor and tachycardiac responses caused by restraint. Conversely, BNST treatment with the selective CRF<sub>1</sub> receptor agonist CRF increased restraint-evoked arterial pressure and HR responses and reduced the fall in tail skin temperature response. All effects of CRF were inhibited by local BNST pretreatment with CP376395. The selective CRF<sub>2</sub> receptor antagonist antisauvagine-30 reduced the arterial pressure increase and the fall in tail skin temperature. The selective CRF<sub>2</sub> receptor agonist urocortin-3 increased restraint-evoked pressor and tachycardiac responses and reduced the drop in cutaneous temperature. All effects of urocortin-3 were abolished by local BNST pretreatment with antisauvagine-30. These findings indicate an involvement of both CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors in the BNST in autonomic adjustments during emotional stress.

**Keywords:** neuropeptides; CRF; urocortin; BNST; extended amygdala; cardiovascular; stress.



## Sumário

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Animais.....	25
3.2 Implante de cânulas guias no NLET.....	25
3.3 Canulação da artéria femoral.....	26
3.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	27
3.5 Registro da temperatura cutânea da cauda.....	27
3.6 Drogas utilizadas.....	27
3.7 Microinjeção de drogas no NLET.....	28
3.8 Estresse por restrição agudo.....	28
3.9 Determinação anatômica dos sítios de injeção de drogas.....	28
3.10 Análise estatística.....	28
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Estudo do envolvimento dos receptores CRF1 no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo em ratos.....	30
4.2 Estudo do envolvimento dos receptores CRF2 no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo em ratos.....	31
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 Efeito da microinjeção bilateral no NLET de CP376395 e/ou CRF nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição.....	32
5.2 Efeito da microinjeção bilateral no NLET de antisauvagine-30 e/ou urocortina 3	

nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição.....	40
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## Lista de Figuras

Figura 1.....	35
Figura 2.....	36
Figura 3.....	37
Figura 4.....	38
Figura 5.....	39
Figura 6.....	43
Figura 7.....	44
Figura 8.....	45
Figura 9.....	46
Figura 10.....	47
Figura 11.....	54



## Lista de Tabelas

Tabela 1.....	34
Tabela 2.....	42
Tabela 3.....	49



## 1.INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as principais causas de morte no mundo são devidas ao acidente vascular cerebral (AVC) e doenças cardíacas isquêmicas. Além do mais, houve um aumento na incidência dessas ocorrências na última década, despertando o interesse na investigação dos fatores associados a essas doenças. Estudos clínicos e pré-clínicos tem demonstrado uma relação entre estresse e doenças cardiovasculares (Rozanski, 1999; Grippo & Johnson, 2009; Steptoe & Kivimaki, 2012; Sgoifo et al, 2014). Entretanto, informações acerca dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas complicações cardiovasculares causadas pelo estresse ainda são escassas.

Todos os indivíduos são continuamente expostos a diferentes situações de estresse. A manutenção da homeostasia durante situações aversivas depende da ativação coordenada dos sistemas neuroendócrino e autônomo (DAMPNEY, *et al.*, 2008, ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). O sistema nervoso autônomo promove a resposta imediata ao estresse, que é caracterizada principalmente por alterações na função cardiovascular, que incluem o aumento da pressão arterial e frequência cardíaca (FC), redistribuição do fluxo sanguíneo (redução para a pele e vísceras e aumento para a musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (BARRON e VAN LOON, 1989, DAMPNEY, *et al.*, 2008, CRESTANI, *et al.*, 2010). A diminuição do fluxo sanguíneo para a pele causa redução na temperatura cutânea durante situações aversivas (VIANNA e CARRIVE, 2005; BUSNARDO *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2012). Tem sido reportado que a resposta pressora é primariamente devida à ativação de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos na musculatura vascular lisa, sem envolvimento do componente simpático cardíaco, enquanto a resposta de taquicardia resulta da ativação do componente simpático cardíaco com a concomitante ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático (Reis et al, 2014).

As respostas fisiológicas durante o estresse emocional são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central, através de ação de vários mecanismos neuroquímicos (JOELS e BARAM, 2009; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, no qual forma um contínuo rostralmente à amígdala (WELLER e SMITH, 1982). Estudos tem demonstrado a ativação de neurônios do NLET durante situações de estresse (CULLINAN, *et al.*, 1995). Baseado em dados neuroanatômicos de conexão do NLET com outras estruturas límbicas, bem como nas evidências de seu envolvimento nas respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse, tem sido proposto que o NLET seria uma importante região no circuito neural das respostas a estímulos aversivos, o qual integraria informações de outras regiões límbicas, como o córtex pré-frontal medial, a amígdala e o hipocampo e conectaria estas regiões com núcleos hipotalâmicos e do tronco cerebral envolvidos no controle da atividade autônoma e neuroendócrina (CHOI *et al.*, 2007, ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

Estudos tem demonstrado o envolvimento do NLET no controle das respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais desencadeadas por estímulos aversivos (WALKER *et al.*, 2009; CRESTANI *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2014). O controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET parece depender do paradigma de estresse empregado (CHOI, *et al.*, 2008, RESSTEL, *et al.*, 2008, CRESTANI, *et al.*, 2009); por exemplo, dados recentes do nosso grupo demonstraram que o bloqueio sináptico não-seletivo no NET facilitou o aumento da frequência cardíaca desencadeada pelo estresse por restrição agudo (estímulo aversivo não-condicionado) (CRESTANI, *et al.*, 2009), ao passo que as respostas comportamentais e cardiovasculares observadas no teste de medo condicionado ao contexto foram reduzidas após a inibição do NLET (RESSTEL *et al.*, 2008). Apesar das evidências do envolvimento do NLET nas respostas ao estresse, informações acerca dos mecanismos neuroquímicos locais no NLET envolvidos no controle das respostas autônomas ao estresse ainda são escassas.

O fator liberador de corticotrofina (CRF) é um neuropeptídeo liberado em numerosas estruturas límbicas durante estímulos aversivos (JOELS e BARAM, 2009). O CRF foi inicialmente identificado no hipotálamo e caracterizado como um regulador da secreção do hormônio adrecorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (VALE, *et al.*, 1981). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que o CRF desempenha outras funções importantes no organismo, incluindo o controle das respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse emocional (KOOB e HEINRICHS, 1999; JOELS e BARAM, 2009; STENGEL e TACHÉ, 2010).

O sistema “CRFérgico” em mamíferos é composto pelo CRF e outros três peptídeos denominados urocortina 1 (Ucn1), urocortina 2 (Ucn2) e urocortina 3 (Ucn3) (HAUGER *et al.*, 2003; BALE e VALE, 2004). Os efeitos do CRF e das urocortinas são mediados por dois receptores, denominados CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>, e uma proteína de ligação do CRF (HAUGER *et al.*, 2003; BALE e VALE, 2004). Foram identificadas três variantes do receptor CRF<sub>2</sub> em humanos (CRF<sub>2(a)</sub>, CRF<sub>2(b)</sub>, CRF<sub>2(c)</sub>) e duas variantes em roedores (CRF<sub>2(a)</sub>, CRF<sub>2(b)</sub>), porém as variantes não apresentam diferenças no perfil farmacológico (HAUGER *et al.*, 2003). Entretanto, os ligantes apresentam diferenças no perfil farmacológico de ligação aos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>. O CRF possui uma afinidade dez vezes maior ao receptor CRF<sub>1</sub>, ao passo que a Ucn2 e Ucn3 ligam-se com uma afinidade cem vezes maior ao receptor CRF<sub>2</sub> (HAUGER *et al.*, 2003). A Ucn1 possui afinidade semelhante para ambos os receptores (HAUGER *et al.*, 2003). Desse modo, tem sido proposto que o CRF seria o ligante endógeno do receptor CRF<sub>1</sub>, ao passo que a Ucn2 e Ucn3 seriam os ligantes endógenos do receptor CRF<sub>2</sub> (HAUGER *et al.*, 2003; BALE e VALE, 2004). A Ucn1 seria o ligante endógeno para ambos os receptores (HAUGER *et al.*, 2003; BALE e VALE, 2004).

Neurônios no NLET expressam tanto os receptores CRF<sub>1</sub> quanto os CRF<sub>2</sub> (CHALMERS, *et al.*, 1995, CHEN *et al.*, 2000; REUL, *et al.* 2002). Foram identificadas populações de neurônios do NLET que expressam CRF e Ucn3 (PHELIX *et al.*, 1990,

SWANSON *et al.*, 1983; LI *et al.*, 2002). Além disso, alta densidade de terminais contendo CRF, sendo o núcleo central da amígdala uma fonte importante dessas aferências (SAKANAKA *et al.*, 1986; BECKERMAN *et al.*, 2013), e moderada densidade de fibras imunorreativas para a Ucn1 e Ucn3 (BITTENCOURT *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2002) foram localizadas no NLET. Assim, tem sido demonstrado que ligantes CRFérgicos liberados de fontes intrínsecas ou extrínsecas podem modular a atividade de neurônios do NLET (ERB *et al.*, 2001; SILBERMAN *et al.*, 2013).

Numerosos estudos demonstraram a participação da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas respostas comportamentais a estímulos aversivos (*para revisão ver* WALKER *et al.*, 2009). Entretanto, informações acerca de um possível envolvimento desse mecanismo de sinalização no NLET no controle da função cardiovascular são escassas. Um estudo que investigou a influência do sistema “CRFérgico” no NLET sobre o controle da função cardiovascular foi o de Nijsen e colaboradores (2001) que administraram CRF no NLET, causando o aumento da FC basal de ratos (NIJSEN *et al.*, 2001). Foi ainda reportado no mesmo estudo que o tratamento local do NLET com um antagonista não-seletivo de receptores CRFérgicos ( $\alpha$ hCRH) facilitou a resposta taquicárdica observada no teste de medo condicionado ao contexto (NIJSEN, *et al.*, 2001). Entretanto, não existem dados neurofarmacológicos na literatura acerca do subtipo de receptor CRFérgico no NLET envolvido no controle das respostas ao estresse. Além disso, nenhum estudo investigou o possível papel da neurotransmissão CRFérgica do NLET no controle das respostas fisiológicas desencadeadas por estímulos aversivos não-condicionados. Esse é um aspecto importante uma vez que, como mencionado acima, o controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo NLET parece depender do paradigma de estresse empregado.

Diante disso, no presente estudo nós testamos a hipótese de que a neurotransmissão CRFérgica no NLET estaria envolvida nas respostas autonômicas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, investigamos o efeito do tratamento

farmacológico local do NLET com antagonistas e agonistas seletivos dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> nas respostas autonômicas (aumentos na pressão arterial e frequência cardíaca e queda da temperatura cutânea da cauda) evocadas pelo estresse de restrição agudo em ratos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do presente estudo é investigar o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas respostas autonômicas observadas durante o estresse por restrição agudo em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Estudar o efeito da microinjeção bilateral no NLET de doses crescentes de um agonista e um antagonista do receptor CRF<sub>1</sub> sobre as respostas de aumento de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na redução da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos;

Investigar o efeito da microinjeção bilateral no NLET de doses crescentes de um agonista e um antagonista so receptor CRF<sub>2</sub> sobre as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na redução da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal variando entre 240-260g. 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: CEUA/FCF/CAr nº 05/2013).

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

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal (i.p.). 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 & Watson (1997). A interaural foi utilizada como ponto de referência para as coordenadas.

### Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET)

Ântero-posterior: +7,8 mm em relação a interaural;

Lateral: + 4 mm a partir do bregma;

Vertical: -5,8 mm em relação ao osso;

Incisivo = -3,2mm.

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 12 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, Brasil) pela via subcutânea.

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

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) para implantação de um cateter na artéria femoral para realização dos registros 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) (Hepamax-S®, Blausiegel, Brasil), e obstruídos com pino de metal. Após implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocater e fixados à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam 0,3 mL do anti-

inflamatório não-esteroidal flunixinameglumina (Banamine®, Schering-Plough, Brasil) 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 e frequência cardíaca**

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA). A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da pressão arterial pulsátil.

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

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos por 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 (VIANNA e CARRIVE, 2005; CRUZ et al, 2012). Para análise das imagens, a medida de temperatura foi realizada em cinco pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (CRUZ *et al.*, 2012).

### **3.6. Drogas utilizadas**

O CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>) (TOCRIS, EUA), a antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>) (TOCRIS, EUA), o fator liberador de corticotrofina (CRF) (agonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>) (TOCRIS, EUA), a urocortina 3 (Ucn3) (agonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>). o tribromoetanol (SIGMA, EUA) e a uretana (SIGMA, EUA) foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fontoura-Wyeth,

Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

### **3.7. Microinjeção de drogas no NLET**

As agulhas injetoras (33 G, SmallParts, EUA) que foram utilizadas para a microinjeção das drogas no NLET foram um mm mais longa do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (Hamilton, EUA). As drogas foram injetadas no volume de 100nL (RESSTEL *et al.*, 2008; CRESTANI *et al.*, 2009).

### **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 30 minutos no tubo de restrição (CHOI, *et al.*, 2007, CRESTANI, *et al.*, 2010). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão experimental para evitar habituação.

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

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, intraperitoneal). Foi injetado o corante azul de Evan a 1% no local da microinjeção da droga. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40µm de espessura para análise dos sítios de injeção.

### **3.10. Análise estatística**

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism. Os dados foram

expressos como média  $\pm$  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 monofatorial (ANOVA) (agonistas ou antagonistas sozinhos) ou o teste *t* de Student (agonistas e antagonistas em combinação). As curvas temporais de variação da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram analisadas via análise de variância bifatorial (ANOVA), sendo o tratamento como fator principal e tempo como medida repetida. Um teste *t* pos hoc com a correção de Bonferroni foi utilizada para identificação de diferenças entre os grupos. Os resultados dos testes estatísticos com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

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

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionada ao NLET, e mantidos em recuperação por um período mínimo de quatro dias. O experimento foi realizado 24 h após a implantação de um cateter na artéria femoral, que foi utilizado para registro da pressão arterial e FC. 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 de som e iluminação da sala. Após esse período, foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares. Um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e FC.

##### **4.1. Estudo do envolvimento dos receptores CRF<sub>1</sub> no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo em ratos.**

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento de receptores CRF<sub>1</sub> no NLET nas respostas autonômicas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo. Para tanto, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de doses crescentes de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>) (0,5; 2,75 ou 5 nmol/100nL), CRF (agonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>) (0,01, 0,07 ou 0,15nmol/100nL) ou veículo (salina) (100nL) (ERB e STEWART, 1999; NIJSEN *et al.*, 2001; SAHUQUE *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008). Um grupo adicional recebeu microinjeções de CP376395 (0,5nmol/100nL) e 5 minutos depois foi microinjetado CRF (0,07nmol/100nL) no NLET. Dez minutos após o tratamento do NLET, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição agudo. O registro de pressão arterial e FC foram iniciados pelo menos 30 minutos antes do início do estresse, e foram realizados durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 min antes da restrição, e a cada 5 min durante o estresse por restrição.

#### **4.2. Estudo do envolvimento dos receptores CRF<sub>2</sub> no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo em ratos.**

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento de receptores CRF<sub>2</sub> no NLET nas respostas autonômicas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo. Para tanto, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de doses crescentes de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>) (0,5; 2,75 ou 5 nmol/100nL), Ucn3 (agonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>) (0,01; 0,07 ou 0,15nmol/100nL) ou veículo (salina) (100nL) (RÜHMANN *et al.*, 1998; SAHUQUE *et al.*, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2009). Um grupo adicional recebeu microinjeção bilateral de antisauvagine-30 (0,5nmol/100nL) e 5 minutos após Ucn3 (0,15nmol/100nL) no NLET. Dez minutos após o tratamento do NLET, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição agudo. As medidas de pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda foram realizadas como descrito no protocolo anterior (*ver item 4.1.*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito da microinjeção bilateral no NLET de CP376395 e/ou CRF nas respostas cardiovasculares ao estresse agudo de restrição.

A microinjeção bilateral no NLET do antagonista seletivo de receptores CRF<sub>1</sub>, CP376395 (0,5; 2,75 ou 5nmol/100nL), não alterou os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). O estresse de restrição agudo causou aumento na PAM ( $F_{(19,380)}=16$ ,  $P>0,0001$ ) e FC ( $F_{(19,380)}=20$ ,  $P<0,0001$ ) e queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,171)}=9$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 2). O tratamento do NLET com CP376395, nas doses de 2,75nmol (PAM: $P<0,0001$  e FC: $P<0,0001$ ) e 5nmol (PAM: $P<0,0001$  e FC: $P<0,0001$ ), reduziu as respostas de aumento da PAM ( $F_{(3,380)}=24$ ,  $P<0,0001$ ) e FC ( $F_{(3,380)}=5$ ,  $P<0,006$ ), porém sem afetar a queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,171)}=0,9$ ,  $P>0,05$ ) (Figura 2). Além disso, houve interação significativa entre os fatores tempo e tratamento na resposta de FC ( $F_{(57,380)}=2$ ,  $P<0,05$ ), mas não para as respostas de PAM ( $F_{(57,380)}=1$ ,  $P>0,05$ ) e temperatura da cauda ( $F_{(24,171)}=0,1$ ,  $P>0,05$ ). A administração de CP376395 em estruturas ao redor do NLET, como a comissura anterior, a cápsula interna e o fornix, não afetaram as respostas de PAM ( $F_{(1,120)}=1$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(1,120)}=0,1$ ,  $P>0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,36)}=3$ ,  $P>0,05$ ) induzidas pela restrição.

O tratamento bilateral do NLET com o agonista seletivo de receptores CRF<sub>1</sub>, o CRF (0,01, 0,07 ou 0,15nmol/100nL), não afetou os níveis basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). O estresse de restrição provocou aumento na PAM ( $F_{(19,340)}=48$ ,  $P<0,0001$ ) e FC ( $F_{(19,340)}=26$ ,  $P<0,0001$ ) e queda na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,153)}=6$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 3). A microinjeção de CRF no NLET na dose de 0,07 nmol (PAM: $P<0,0001$ ; FC: $P<0,0001$ ) potencializou o aumento da PAM ( $F_{(3,340)}=17$ ,  $P<0,0001$ ) e FC ( $F_{(3,340)}=18$ ,  $P<0,0001$ ) evocado pelo estresse de restrição. Além disso, todas as doses de CRF (0,01nmol: $P<0,0001$ ; 0,07nmol: $P<0,0001$ ; 0,15nmol: $P<0,0001$ ) reduziram a resposta de queda de temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,153)}=30$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 3). A análise também



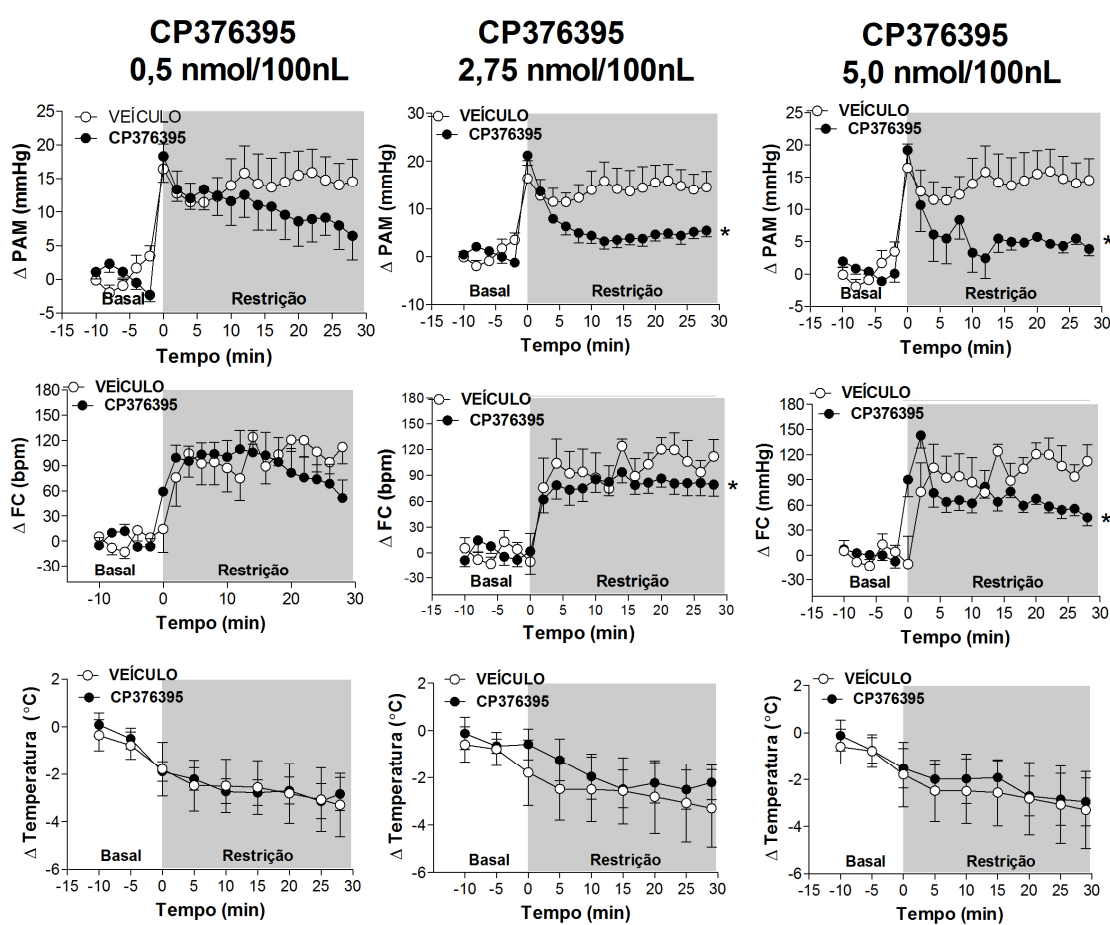
identificou interação entre os fatores tratamento e tempo na resposta de temperatura cutânea da cauda ( $F_{(24,153)}=3, P<0,001$ ), mas não para a PAM ( $F_{(57,320)}=$ ,  $P>0,05$ ;) e FC ( $F_{(57,320)}=0,8$ ;  $P>0,05$ ). A administração de CRF em estruturas ao redor do NLET não afetou as respostas de PAM ( $F_{(1,120)}=1$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(1,120)}=3$ ,  $P>0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,45)}=0,6$ ,  $P>0,05$ ) induzidas pela restrição.

O tratamento combinado do NLET com CP376395 na dose de 0,5nmol e de CRF na dose de 0,07 não alterou os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). Entretanto, os efeitos do CRF (0,07nmol) nas respostas de aumento da PAM ( $F_{(1,160)}=1,3$ ,  $P>0,05$ ) e FC ( $F_{(1,160)}=0,9$ ,  $P>0,05$ ) e de queda da temperatura cutânea ( $F_{(1,72)}=2$ ,  $P>0,05$ ) induzidas pela restrição foram completamente inibidos pelo tratamento prévio de CP376395 (Figura 3).

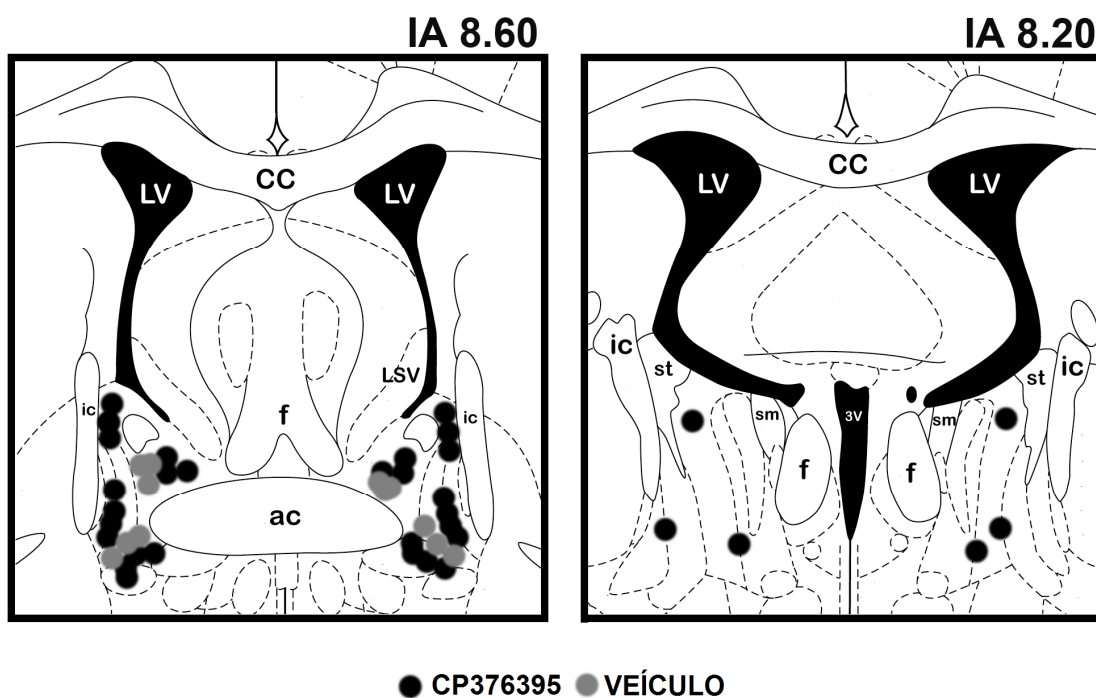
**Tabela 1** Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico no NLET com diferentes doses do agonista (CRF) e/ou antagonista (CP376395) seletivo de receptores CRF<sub>1</sub>.

Grupo	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda(°C)
Veículo	6	103±4	387±20	28.0±1
CP376395 <u>0,5 nmol</u>	6	109±3	412±22	28.0±1
CP376395 <u>2,75 nmol</u>	5	97±2	384±11	27.2±1
CP376395 <u>5.0 nmol</u>	6	107±4	391±9	27.2±1
		$F_{(3,22)}=3,$ $P>0.05$	$F_{(3,22)}=0.5,$ $P>0.05$	$F_{(3,22)}=0.5,$ $P>0.05$
Veículo	6	105±5	390±29	26.0±0.3
CRF <u>0,01 nmol</u>	5	103±3	360±2	26.1±0.6
CRF <u>0,07 nmol</u>	5	102±4	360±14	24.8±0.7
CRF <u>0,15nmol</u>	5	115±4	402±14	26.0±0.6
		$F_{(3,20)}=2,$ $P>0.05$	$F_{(3,20)}=1,$ $P>0.05$	$F_{(3,20)}=1,$ $P>0.05$
Veículo	5	112±4	369±8	28.0±0.5
CP376395(0,5nmol) + CRF(0,07nmol)	5	108±4	363±15	28.6±0.9
		$t=0.7,$ $P>0.05$	$t=0.3,$ $P>0.05$	$t=0.6,$ $P>0.05$

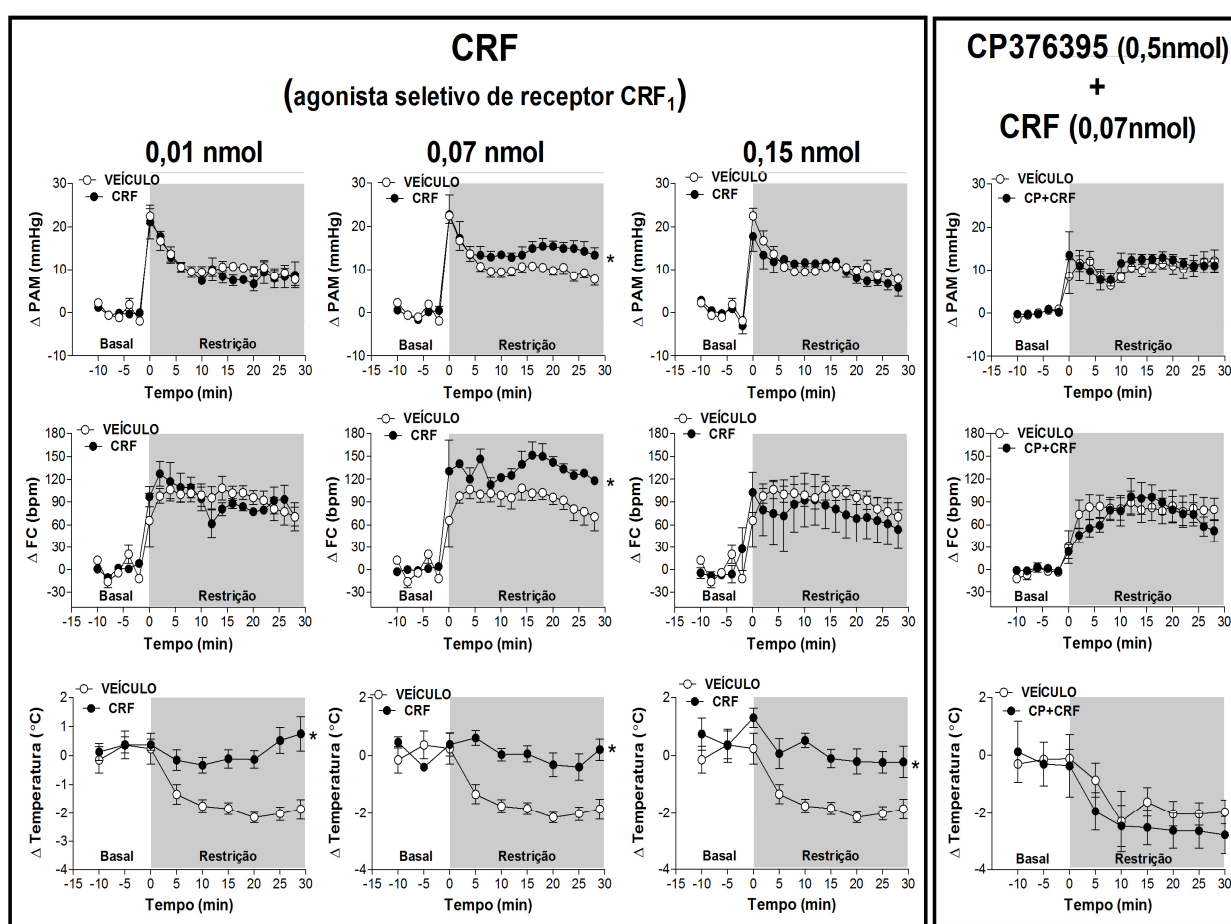
**Figura 1:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e variação da temperatura da cauda ( $\Delta$ Temperatura) durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, 100nL) ou CP376395 (antagonista seletivo de receptores CRF<sub>1</sub>) nas doses de 0,5; 2,75 ou 5,0 nmol/100nL. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). \* P <0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste *post hoc* teste t com uma correcção de Bonferroni.



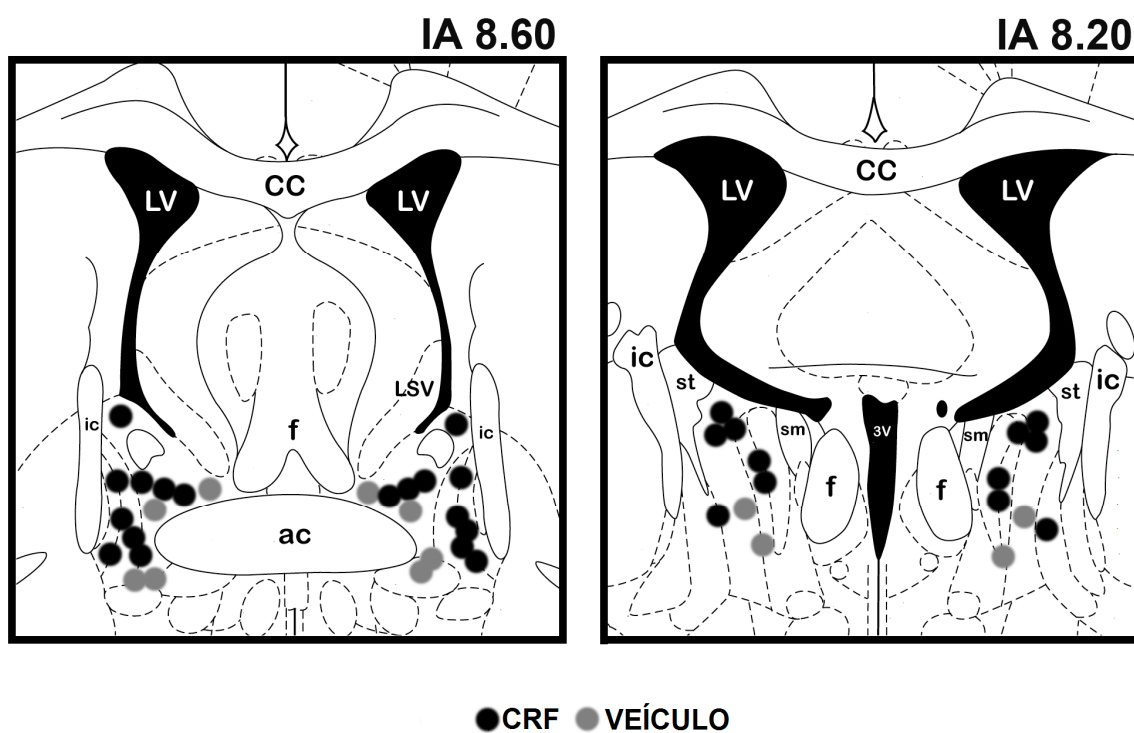
**Figura 2:** Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos cinzas) e CP376395 (círculos pretos). 3V - terceiro ventrículo; IA - Coordenada interaural; ac - comissura anterior; cc - corpo caloso; f - fornix. Ic - cápsula interna; LV - ventrículo lateral; LSV - septo ventral lateral; sm - estria medular; st - estria terminal.



**Figura 3: (Esquerda)** Curvas temporais da variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$ Temperatura) durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, 100nL) ou CRF (agonista seletivo de receptores  $CRF_1$ ) nas doses de 0,01; 0,07 ou 0,15 nmol/100nL. **(Direita)** Curvas temporais de  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC, e  $\Delta$  temperatura cutânea da cauda durante o estresse de restrição tratados com 0,07nmol/100nl de CRF no NLET após o pré-tratamento local com seletivo antagonista de  $CRF_1$  CP376395 (0,5nmol/100nl). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). \*  $P < 0,05$  ao longo de todo o período de restrição em comparação ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste *post hoc* teste t com uma correcção de Bonferroni



**Figura 4:** Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos& Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos cinzas) e CRF (círculos pretos). 3V - terceiro ventrículo; IA – Coordenada interaural; ac – comissura anterior; cc – corpo caloso; f – fornix. Ic – cápsula interna; LV – ventrículo lateral; LSV – septo ventral lateral; sm – estria medular; st – estria terminal.





## 5.2 Efeito da microinjeção bilateral no NLET de antisauvagine-30 e/ou urocortina 3 nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

O tratamento bilateral do NLET com o antagonista seletivo de receptores CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 (0,5; 2,75 ou 5nmol/100nL), não alterou os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). O estresse de restrição agudo causou aumento na PAM ( $F_{(19,340)}=21$ ,  $P<0,0001$ ) e FC ( $F_{(19,340)}=11$ ,  $P<0,0001$ ) e reduziu a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,153)}=4$ ,  $P<0,0002$ ) (Figura 4). A microinjeção bilateral no NLET de antisauvagine-30 na dose de 5nmol (PAM:  $P<0,0001$ , temperatura:  $P<0,01$ ) reduziu a resposta pressora ( $F_{(3,340)}=12$ ,  $P<0,0001$ ) e a queda da temperatura cutânea ( $F_{(3,153)}=6$ ,  $P<0,0005$ ) ao estresse de restrição, porém sem afetar a resposta taquicárdica ( $F_{(3,340)}=2$ ,  $P>0,05$ ) (Figura 4). A análise estatística não identificou interação entre os fatores tratamento e tempo para as medidas de PAM ( $F_{(57,340)}=0,8$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(57,340)}=0,5$ ,  $P>0,005$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(24,153)}=0,3$ ,  $P>0,05$ ). A administração de antisauvagine-30 em estruturas ao redor do NLET, como a comissura anterior, o fornix e a cápsula interna, não afetou as respostas evocadas pela restrição na PAM ( $F_{(1,140)}=3$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(1,140)}=0,2$ ,  $P>0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,63)}=0,6$ ,  $P>0,05$ ).

A microinjeção bilateral no NLET do agonista seletivo de receptores CRF<sub>2</sub>, Ucn3 (0,01, 0,07 ou 0,15nmol/100nL), não afetou os valores basais de PAM ( $F_{(3,16)}=2,5$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(3,16)}=2$ ,  $P>0,05$ ) (Tabela 2). Entretanto, Ucn3 na dose de 0,07 nmol ( $P<0,05$ ) provocou redução na temperatura cutânea da cauda basal (Tabela 2). A restrição aumentou a PAM ( $F_{(19,340)}=26$ ,  $P<0,0001$ ) e a FC ( $F_{(19,340)}=21$ ,  $P<0,0001$ ) e reduziu a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,153)}=6$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 5). O tratamento do NLET com Ucn3 em todas as doses (PAM:  $P<0,0001$ , FC:  $P<0,0001$ ) aumentou as repostas pressora ( $F_{(3,340)}=17$ ,  $P<0,0001$ ) e taquicárdica ( $F_{(3,340)}=11$ ,  $P<0,0001$ ) durante a restrição. Além disso, as doses de 0,07 nmol ( $P<0,0001$ ) e 0,15 nmol ( $P<0,0001$ ) de Ucn3 reduziu a queda de temperatura cutânea da



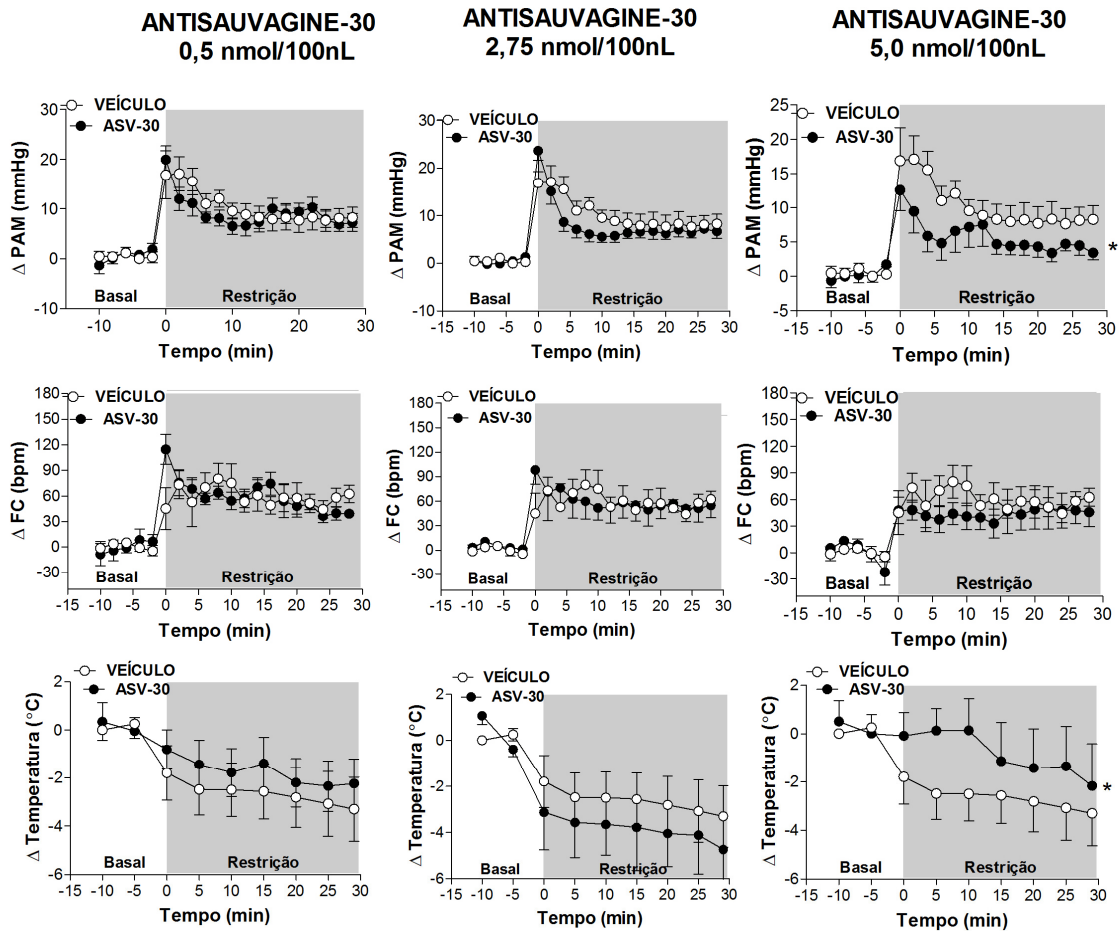
cauda induzida pela restrição ( $F_{(3,153)}=23$ ,  $P<0,0001$ ) (Figura 5). A análise identificou interação entre os fatores tratamento e tempo para a temperatura cutânea ( $F_{(24,153)}=2$ ,  $P<0,03$ ), mas não para a PAM ( $F_{(57,340)}=0,6$ ,  $P>0,05$ ) e a FC ( $F_{(57,340)}=0,8$ ,  $P>0,05$ ). A microinjeção de Ucn3 nas estruturas que circundam o NLET, como a comissura anterior, a cápsula interna e o fornix, não afetou as respostas de PAM ( $F_{(1,100)}=0,04$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(1,100)}=1,7$ ,  $P>0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,36)}=1,4$ ,  $P>0,05$ ) durante a restrição.

O tratamento combinado no NLET com antisauvagine-30 nas doses de 0,5nmol e 0,15nmol de Ucn3 não afetaram valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). Entretanto, os efeitos da Ucn3 (0,15nmol) sobre as respostas de PAM ( $F_{(1,160)}=0,3$ ,  $P>0,05$ ), FC ( $F_{(1,160)}=3$ ,  $P>0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,72)}=3$ ,  $P>0,05$ ) foram completamente inibidos após o pré-tratamento do NLET com antisauvagine-30 (Figura 5).

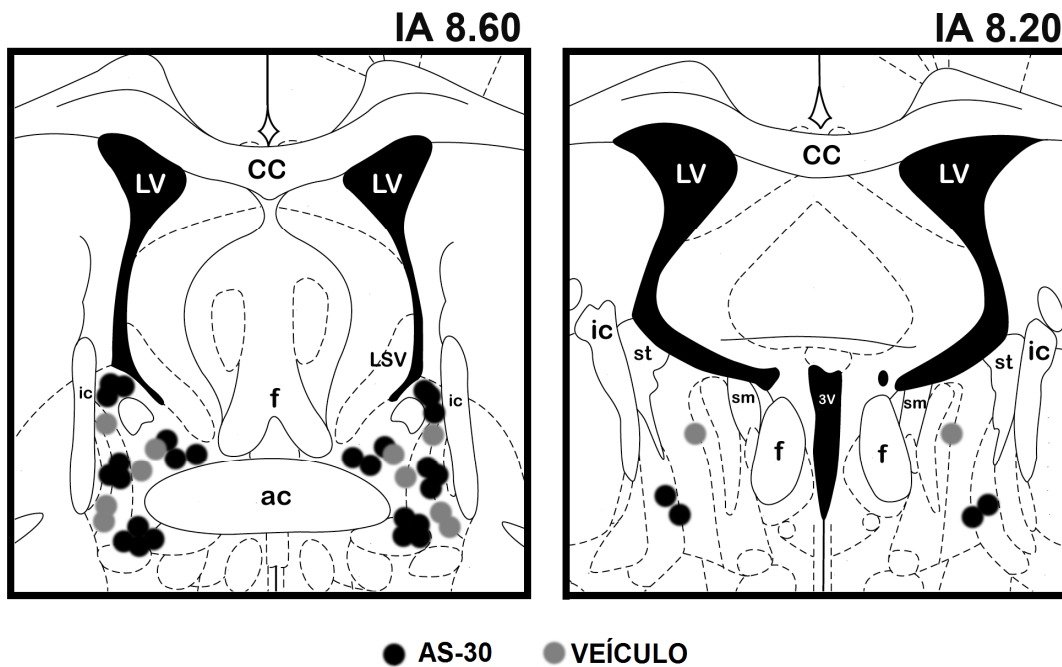
**Tabela 2** – Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico no NLET com diferentes doses do agonista (Ucn3) e/ou antagonista (antisauvagine-30) seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>.

Grupo	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Veículo	6	101±2	370±25	28.3±0.9
antisauvagine-30 <u>0,5nmol</u>	5	101±3	405±28	28.9±1.0
antisauvagine-30 <u>2,75nmol</u>	5	114±4	360±10	30.7±0.8
antisauvagine-30 <u>5,0nmol</u>	5	98±6	404±28	26.8±1.8
		$F_{(3,20)}=3,$ $P>0.05$	$F_{(3,20)}=1,$ $P>0.05$	$F_{(3,20)}=1,$ $P>0.05$
Veículo	6	115±4	416±16	27.8±0.6
UCN3 – <u>0,01nmol</u>	5	102±6	383±9	27.2±0.9
UCN3 – <u>0,07nmol</u>	5	118±4	451±27	24.9±0.4*
UCN3 3 – <u>0,15 nmol</u>	5	108±6	440±27	26.4±0.4
		$F_{(3,20)}=2,$ $P>0.05$	$F_{(3,20)}=2,$ $P>0.05$	$F_{(3,20)}=5,$ $P<0.01$
Veículo	6	110±3	377±10	28.0±0.6
antisauvagine-30(0,5nmol)+ UCN3(0,15nmol)	5	109±2	397±9	28.6±0.4
		$t=0.3,$ $P>0.05$	$t=1.5$ $P>0.05$	$t=1.0,$ $P>0.05$

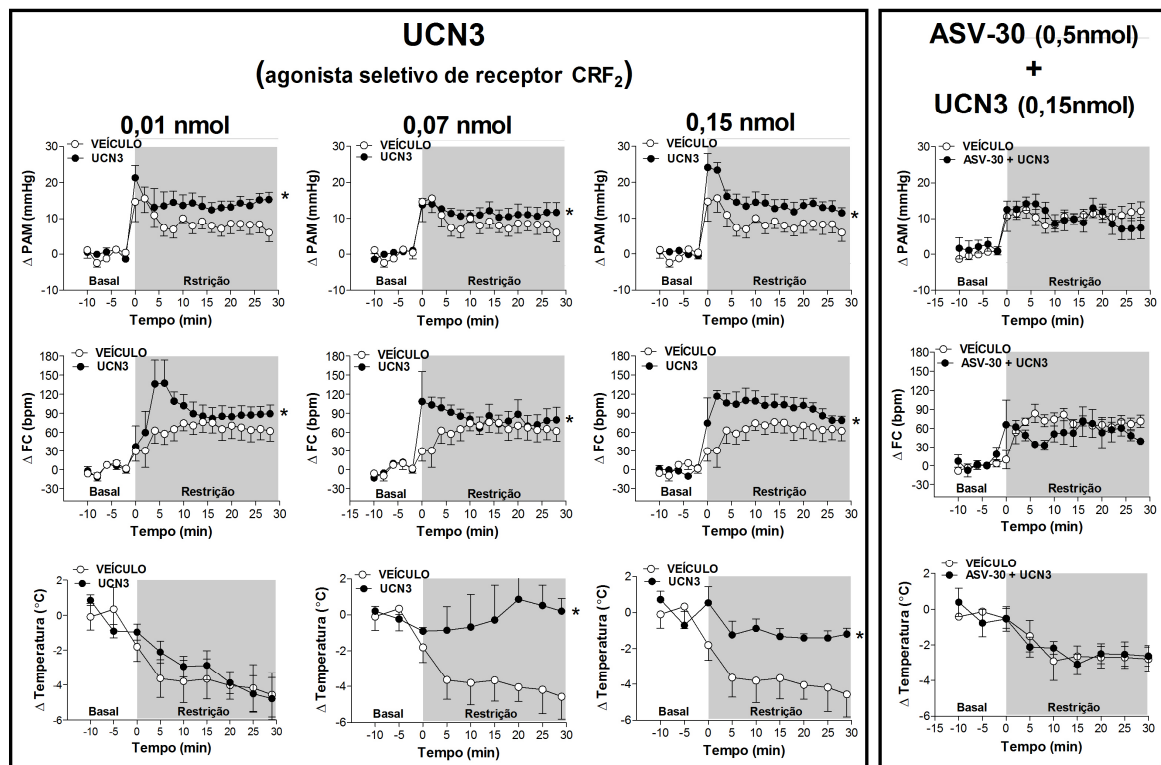
**Figura 6:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$ Temperatura) durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, 100nL) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo de receptores CRF<sub>2</sub>) nas doses de 0,5; 2,75 ou 5,0 nmol/100nL. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). \* P < 0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste *post hoc* teste t com uma correção de Bonferroni.



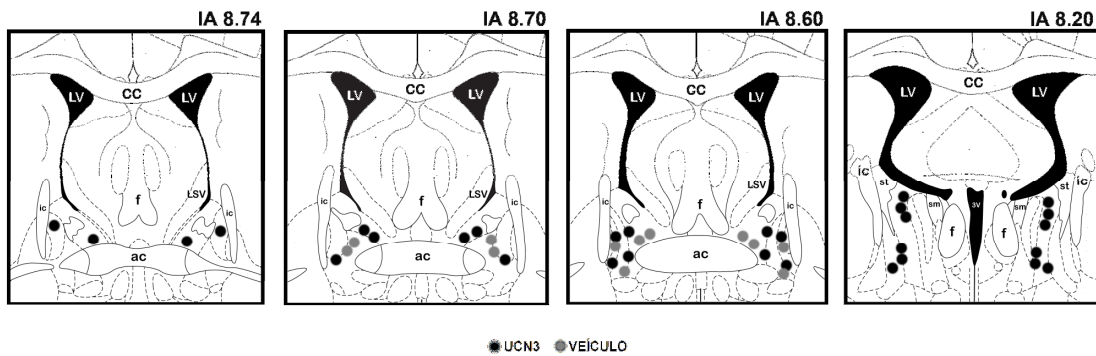
**Figura 7:** Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos cinzas) e antisauvagine-30 (círculos pretos). 3V - terceiro ventrículo; IA – Coordenada interaural; ac – comissura anterior; cc – corpo caloso; f – fornix. Ic – cápsula interna; LV – ventrículo lateral; LSV – septo ventral lateral; sm – estria medular; st – estria terminal.



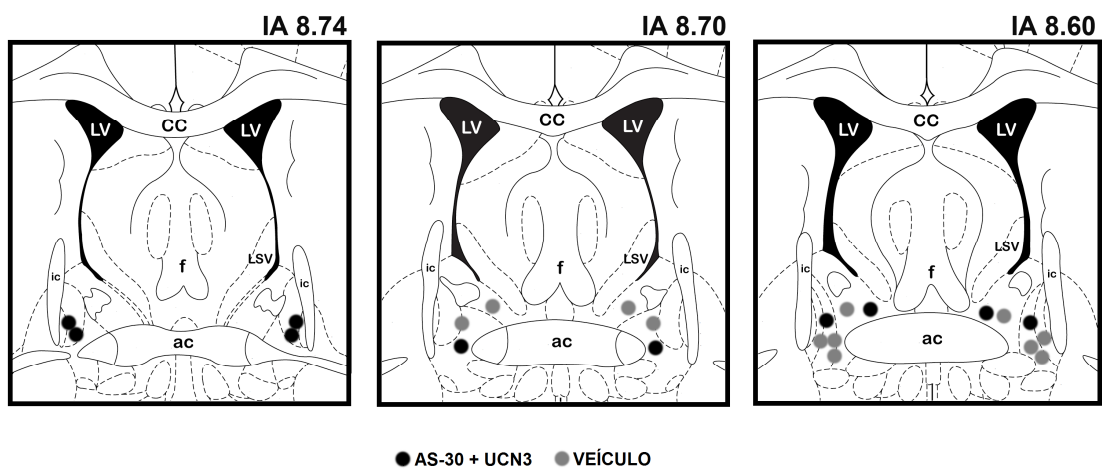
**Figura 8:** (Esquerda) Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$ Temperatura) durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, 100nL) ou urocortina 3 (agonista seletivo de receptores CRF<sub>2</sub>) nas doses de 0,01; 0,07 ou 0,15 nmol/100nL. (Direita) Curvas temporais de  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC, e  $\Delta$  temperatura cutânea da cauda durante o estresse de restrição tratados com 0,15nmol/100nl de UCN3 no NLET após o pré-tratamento local com seletivo antagonista de CRF<sub>2</sub> antisauvagine-30 (0,5nmol/100nl). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). \* P <0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste *post hoc* teste t com uma correção de Bonferroni.



**Figura 9:** Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos cinzas) e urocortina 3 (UCN<sub>3</sub>) (círculos pretos). 3V - terceiro ventrículo; IA – Coordenada interaural; ac – comissura anterior; cc – corpo caloso; f – fornix. Ic – cápsula interna; LV – ventrículo lateral; LSV – septo ventral lateral; sm – estria medular; st – estria terminal.



**Figura 10:** Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos cinzas) e antisauvagine 30 + urocortina 3 (UCN<sub>3</sub>) (círculos pretos). 3V - terceiro ventrículo; IA – Coordenada interaural; ac – comissura anterior; cc – corpo caloso; f – fornix. Ic – cápsula interna; LV – ventrículo lateral; LSV – septo ventral lateral; sm – estria medular; st – estria terminal.



## 6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados fornecem a primeira evidência de que ambos os receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> estão envolvidos nos ajustes cardiovasculares durante o estresse emocional. Observamos que a microinjeção bilateral do antagonista seletivo dos receptores CRF<sub>1</sub>, CP376395, no NLET reduziu as respostas pressora e taquicárdica desencadeadas pelo estresse por restrição agudo. Reciprocamente, o tratamento do NLET com o agonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>, CRF, potencializou o aumento da pressão arterial e FC e reduziu a resposta de queda da temperatura cutânea da cauda observadas durante o estresse de restrição. Todos os efeitos do CRF foram inibidos pelo pré-tratamento local do NLET com o CP376395. A microinjeção bilateral do antagonista seletivo dos receptores CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, no NLET reduziu o aumento da PA e a queda da temperatura cutânea da cauda. O tratamento bilateral no NLET com o agonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>, urocortina 3 (Ucn3) facilitou as respostas pressora e taquicárdica e reduziu a queda da temperatura cutânea. Todos os efeitos da Ucn3 foram abolidos pelo pré-tratamento local no NLET com antisauvagine-30. Um sumário de todos os efeitos decorrentes dos tratamentos farmacológicos do NLET sobre as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo são apresentados na Tabela 3.

O tratamento do NLET com antagonistas seletivos dos receptores CRF<sub>1</sub> ou CRF<sub>2</sub> não afetaram os valores basais de pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda. Nesse sentido, apesar do presente estudo fornecer evidências de um importante papel da neurotransmissão CRFérgica do NLET no controle das respostas cardiovasculares durante o estresse, nossos resultados indicam que esse mecanismo de sinalização do NLET não está envolvido na manutenção tônica da função cardiovascular. Estes resultados corroboram dados anteriores que demonstraram que a administração intracerebroventricular de antagonistas dos receptores CRFérgicos não alterou os parâmetros basais de PA e FC (Nakamori et al, 1993; Nijsen et al, 2000b). Além disto, estudos tem demonstrado que o bloqueio simpático não-



seletivo, bem como o tratamento local com antagonistas de receptores glutamatérgicos, colinérgicos ou noradrenérgicos no NLET não afetaram os parâmetros cardiovasculares basais (Alves et al, 2009; Alves et al 2011; Nasimi et al, 2011; Crestani et al, 2013).

**Tabela 3** – Sumário dos efeitos dos tratamentos farmacológicos do NLET com agonistas e/ou antagonistas dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>.

Resposta ao estresse/ Tratamento NLET	Resposta pressora	Resposta taquicárdica	Redução temperatura cutânea
CP376395 (antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> )	↓	↓	-
CRF (agonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> )	↑	↑	↑
antisauvagine-30 (antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> )	↓	-	↑
Urocortina 3 (agonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> )	↑	↑	↑

Um recente estudo conduzido pelo nosso grupo demonstrou que a inibição bilateral e não-seletiva da neurotransmissão no NLET através do tratamento local com CoCl<sub>2</sub> facilitou a reposta taquicárdica provocada pelo estresse por restrição, porém sem afetar a resposta de aumento da pressão arterial (Crestani et al, 2009). Efeito similar foi observado após o tratamento do NLET com um antagonista seletivo dos adrenoceptores  $\alpha_1$  (i.e; facilitação da FC provocada pelo estresse de restrição sem afetar a resposta pressora) (Crestani, et al 2009), sugerindo que a influência inibitória do NLET sobre a resposta de FC durante o estresse por restrição é mediada, ao menos em parte, através da ação de mecanismos noradrenérgicos

locais. Entretanto, o presente estudo indica que a ativação dos receptores CRF<sub>1</sub> no NLET durante o estresse de restrição desempenha um papel facilitatório na resposta taquicárdica. Estudos eletrofisiológicos têm mostrado que a noradrenalina possui uma influência predominantemente inibitória sobre a atividade de neurônios do NLET (Casada et al, 1993). Assim, tem sido mostrado que a ativação de receptores  $\alpha_1$  no NLET despolariza terminais GABAérgicos locais e aumenta a ação inibitória do receptor GABA-A (Dumont et al, 2004). Além disso, a ativação de receptores  $\alpha_2$  reduz a liberação de glutamato no NLET (Forray et al, 1999), resultando na redução da neurotransmissão glutamatérgica local (Egli et al, 2005; Shields et al, 2009; Krawcezky et al, 2011). Entretanto, a ativação do receptor CRF<sub>1</sub> aumenta a neurotransmissão excitatória no NLET (Kash, et al 2008; Silberman et al, 2013). Desse modo, diferenças na influência de adrenoceptores  $\alpha$  e receptores CRF na atividade de neurônios do NLET suportam a evidência da influência oposta dos receptores CRF<sub>1</sub> e  $\alpha_1$  no NLET no controle da resposta de FC desencadeada pelo estresse por restrição. O presente estudo traz a primeira evidência da influência do NLET sobre as respostas pressora de redução da temperatura cutânea induzidas por um estímulo aversivo não-condicionado.

De maneira contrária à redução da taquicardia desencadeada pelo estresse por restrição observada no presente estudo, Nijssen e colaboradores (2001) demonstraram que o tratamento do NLET com um antagonista não-seletivo de receptores CRFérgicos ( $\alpha$ hCRH), facilitou a resposta de aumento da FC desencadeada pelo medo condicionado ao contexto. Esses achados corroboram estudos anteriores que demonstraram que a inibição não-seletiva do NLET causada pelo tratamento local com CoCl<sub>2</sub> (Resstel et al, 2008; Crestani et al, 2009) ou tratamento do NLET com canabidiol (componente da *cannabis sativa*) (Gomes et al, 2012; Gomes et al, 2013) causaram efeitos opostos nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo medo ao contexto e o estresse por restrição.

Os sistemas simpático e parassimpático são diretamente responsáveis pelos

ajustes cardiovasculares durante o estresse. O estresse provoca taquicardia, a qual é abolida após o bloqueio da atividade simpática cardíaca, enquanto a inibição da atividade parassimpática cardíaca aumenta essa resposta (Carrive, 2006; Dos Reis et al, 2014), sugerindo a co-ativação parassimpática e simpática cardíaca durante eventos aversivos. A resposta pressora é mediada através da vasoconstrição em territórios vasculares como o esplâncnico, renal e cutâneo (Zhang et al, 1996; Blessing, 2003), através da ativação de adrenoreceptores  $\alpha_1$  em musculatura lisa vascular (Dos Reis et al, 2014). A vasoconstrição reduz o fluxo sanguíneo em leitos cutâneos (Blessing, 2003), o que causa redução da temperatura cutânea (Cruz et al, 2012; Busnardo et al, 2013). Em relação ao controle da atividade autonômica pelo CRF, já está bem estabelecido que a administração intracerebroventricular de CRF provoca respostas pressora e taquicárdica mediadas por aumento na atividade simpática (Grosskreutz et al, 1988; Nijssen et al, 2000b). Além disso, a redução da resposta de taquicardia provocada pelo estresse observada após a administração intracerebroventricular de uma antagonista não-seletivo de receptor CRF foi abolida em animais tratados sistemicamente com um bloqueador da atividade parassimpática cardíaca (Nijssen et al, 2000a), enquanto que a injeção intracerebroventricular de CRF reduziu a ativação do núcleo dorso motor do vago provocada pelo estresse (Wang et al, 1996), indicando que o controle da FC pelo CRF durante estímulos aversivos pode também ser mediado através da inibição da atividade parassimpática cardíaca. Projeções diretas a partir do NLET para estruturas bulbares envolvidas no controle autonômico, incluindo o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo e regiões ventrolaterais tem sido reportada (Gray et al, 1987; Dong et al, 2004). Assim, a ativação de receptores CRF no NLET podem modular a atividade cardiovascular durante o estresse através da facilitação de sinais inibitórios para neurônios parassimpáticos e/ou ativação de vias facilitatórias para neurônios simpáticos bulbares.

Resultados obtidos com o antagonismo seletivo dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>

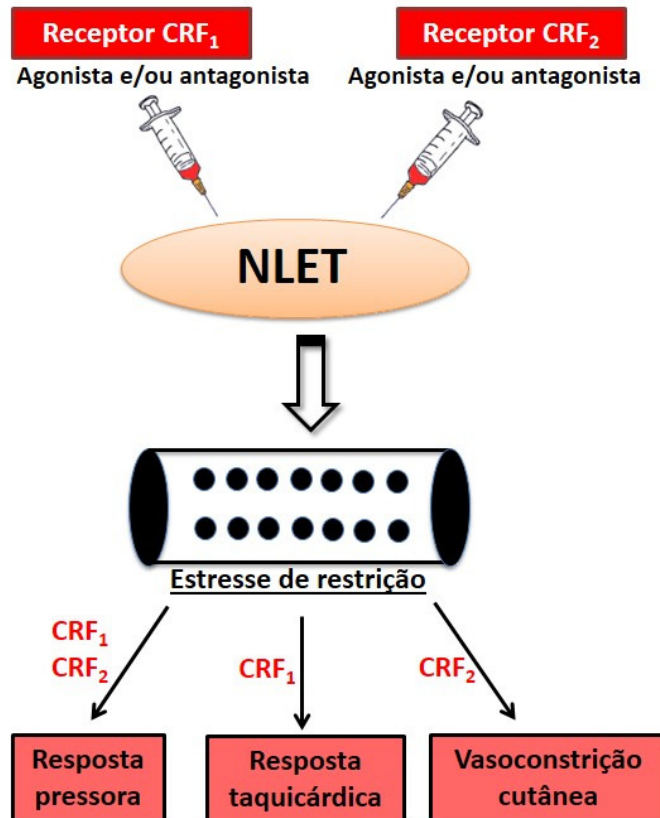
evidenciaram um papel endógeno do CRF e peptídeos relacionados no NLET durante o estresse de restrição na modulação das respostas de FC e temperatura cutânea através, respectivamente, da ativação local de receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>, enquanto que ambos os receptores controlam o aumento na pressão arterial. Contudo, o tratamento do NLET com CRF e Ucn3 afetou todos os parâmetros avaliados no presente estudo (pressão arterial, FC e temperatura cutânea). Desse modo, apesar da especificidade do receptor CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no controle cardiovascular durante o estresse por restrição, ambos receptores no NLET são capazes de modular a pressão arterial, a FC e a vasoconstrição cutânea durante o estresse emocional.

Nossos resultados mostraram que a dose de 0,07 nmol de CRF afetou as respostas cardiovasculares à restrição, porém a microinjeção de doses maiores (0,15nmol) não afetou as respostas à restrição, o que indica um perfil de curva dose-resposta em “U” invertido. Como mencionado acima, o receptor CRF<sub>1</sub> possui influência excitatória na atividade de neurônios NLET ao facilitar a neurotransmissão glutamatérgica local (Kash et al, 2008; Silberman et al 2013). Entretanto, tem sido reportado que a ativação de receptores CRF<sub>1</sub> locais também facilita a neurotransmissão GABAérgica no NLET (Kash et al, 2006; Oblander et al, 2012). Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a administração de doses crescentes de CRF promoveu efeitos maiores sobre a neurotransmissão glutamatérgica (e.g., aumento máximo de 165%-200% com 1µM CRF) (Kash et al, 2008; Silberman et al 2013) do que sobre a neurotransmissão GABAérgica (e.g. aumento máximo de ~115% com 1µM CRF) (Kash et al 2006). Esses resultados indicam que o controle da transmissão GABAérgica através do receptor CRF<sub>1</sub> parece ocorrer com uma potência reduzida relativa à modulação da neurotransmissão excitatória. É possível que altas doses de CRF facilitem a neurotransmissão GABAérgica, deste modo se contrapondo ao aumento na neurotransmissão excitatória local e precludindo alterações nos ajustes cardiovasculares durante o estresse por restrição.

Inesperadamente, os agonistas e antagonistas provocaram efeitos similares na queda de temperatura da cauda causada pela restrição. Entretanto, a Ucn3 reduziu os valores basais de temperatura cutânea da cauda, assim indicando que uma vasoconstrição em condições basais pode ter contribuído para a redução na resposta de queda da temperatura cutânea da cauda durante a restrição. Além disso, tem sido demonstrado que a ativação de receptores CRF<sub>2</sub> por Ucn3 no sistema nervoso central reduz a atividade de nervos simpáticos (Nakamura et al, 2009). Desse modo, outra possibilidade é que apesar da ativação de receptores CRF<sub>2</sub> no NLET pela liberação fisiológica do CRF ou de peptídeos relacionados ao CRF durante o estresse por restrição contribuam com a vasoconstrição cutânea (evidenciada pela redução na queda de temperatura após o tratamento com antisauvagine-30), a administração exógena de Ucn3 pode recrutar circuitos neurais que reduzem atividade nervosa simpática para leitos cutâneos, assim reduzindo a vasoconstrição em leitos cutâneos durante o estresse por restrição.

Em suma, o presente estudo fornece evidências de que ambos os receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET modulam as respostas cardiovasculares durante a exposição ao estresse. Nossos dados sugerem que o receptor CRF<sub>1</sub> do NLET está envolvido na mediação da resposta pressora e taquicárdica induzida pelo estresse por restrição, enquanto os receptores CRF<sub>2</sub> locais controlam o aumento da pressão arterial e a vasoconstrição cutânea durante o estresse por restrição. Embora os resultados obtidos com os antagonistas indiquem a especificidade do receptor CRF<sub>1</sub> (controle da pressão arterial e FC) e CRF<sub>2</sub> (controle da pressão arterial e vasoconstrição cutânea) no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição, o tratamento com os agonistas de receptores CRF indicam que ambos os receptores são capazes de modular as respostas de pressão arterial, FC e vasoconstrição cutânea durante eventos aversivos. A Figura 11 sumariza as conclusões obtidas no presente estudo.

**Figura 11:** Representação diagramática da participação dos receptores “CRFérgicos” do NLET sobre as respostas autonômicas desencadeadas pelo o estresse agudo de restrição.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves FH, Crestani CC, Resstel LB, Correa FM (2009). Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *J Neurosci Res* 87(7): 1703-1711.

Alves FH, Resstel LB, Correa FM, Crestani CC (2011). Bed nucleus of the stria terminalis alpha1- and alpha2-adrenoceptors differentially modulate the cardiovascular responses to exercise in rats. *Neuroscience* 177: 74-83.

Bale TL, Vale WW (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 525-557.

Barron, BA. e Van Loon, GR. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. *J Auton Nerv Syst*, 28(2): 179-87. 1989.

Beckerman MA, Van Kempen TA, Justice NJ, Milner TA, Glass MJ (2013). Corticotropin-releasing factor in the mouse central nucleus of the amygdala: ultrastructural distribution in NMDA-NR1 receptor subunit expressing neurons as well as projection neurons to the bed nucleus of the stria terminalis. *Exp Neurol* 239: 120-132.

Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE (1999). Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol* 415(3): 285-312.

Blessing WW (2003). Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell Mol Neurobiol* 23(4-5): 527-538.

Busnardo C, Alves FH, Crestani CC, Scopinho AA, Resstel LB, Correa FM (2013). Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 23(11): 1611-1622.

Carrive P (2006). Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(12): 1251-1254.

Casada JH, Dafny N (1993). Responses of neurons in bed nucleus of the stria terminalis to microiontophoretically applied morphine, norepinephrine and acetylcholine. *Neuropharmacology* 32(3): 279-284.

Chalmers, DT; Lovenberg, TW; De Souza, EB. Localization of novel corticotropin-releasing

fator receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression . *J Neurosci* 15(10): 6340-6350,1995.

Chen YL, Obach RS, Braselton J, Corman ML, Forman J, Freeman J, *et al.* (2008). 2-aryloxy-4-alkylaminopyridines: discovery of novel corticotropin-releasing factor 1 antagonists. *J Med Chem* 51(5): 1385-1392.

Choi, DC; Furay, AR; Evason, NK; Ostrander, MM, Ulrich-lai, YM e Herman, JP Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 27(8): 2025-34. 2007.

Choi DC, Evanson NK, Furay AR, ULRICH-LAI YM, Ostrander MM, Herman JP. The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinology* 149(2):818-26, 2008.

Crestani CC, Alves FH, Gomes FV, Resstel LB, Correa FM, Herman JP (2013). Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr Neuropharmacol* 11(2): 141-159.

Crestani CC, Alves FH, Tavares RF, Correa FM (2009). Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress* 12(3): 268-278. 18

Crestani CC, Tavares RF, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (2010). Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. *Stress* 13(1): 61-72.

Cruz FC, Engi SA, Leao RM, Planeta CS, Crestani CC (2012). Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. *J Psychopharmacol* 26(10): 1366-1374.

Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64(2): 477-505.

Dampney RA, Horiuchi J, McDowall LM (2008). Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton Neurosci* 142(1-2): 3-10.



de Olmos J, Beltamino CA, Alheid GF (2004). *Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonial and chemoarchitectonical survey*. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system. third edition*. edn. Elsevier: Amsterdam.

Dong HW, Swanson LW (2004). Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 468(2): 277-298.

Dos Reis DG, Fortaleza EA, Tavares RF, Correa FM (2014). Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress* 17(4): 362-372.

Dumont EC, Williams JT (2004). Noradrenaline triggers GABAA inhibition of bed nucleus of the stria terminalis neurons projecting to the ventral tegmental area. *J Neurosci* 24(38): 8198-8204.

Egli RE, Kash TL, Choo K, Savchenko V, Matthews RT, Blakely RD, *et al.* (2005). Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology* 30(4): 657-668.

Forray MI, Bustos G, Gysling K (1999). Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. *J Neurosci Res* 55(3): 311-320.

Erb, Stewart J. A role for the bed nucleus of stria terminalis, but not the amygdala, in the effects of corticotropin-releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *J Neurosci*. 19(20): RC35, 1999.

Erb S, Salmaso N, Rodaros D, Stewart J. A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 158(4):360-5, 2001.

Gomes FV, Alves FH, Guimaraes FS, Correa FM, Resstel LB, Crestani CC (2013). Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT(1)A receptor. *Eur Neuropsychopharmacol* 23(9): 1096-1104.

Gomes FV, Reis DG, Alves FH, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB (2012). Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. *J Psychopharmacol* 26(1): 104-113.

Gray TS, Magnuson DJ (1987). Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol* 262(3): 365-374. 19

Grippe AJ, Johnson AK (2009). Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress* 12:1-21.

Grosskreutz CL, Brody MJ (1988). Regional hemodynamic responses to central administration of corticotropin-releasing factor (CRF). *Brain Res* 442(2): 363-367.

Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM (2003). International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 55(1): 21-26.

Joels M, Baram TZ (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10(6): 459-466.

Kash TL, Nobis WP, Matthews RT, Winder DG (2008). Dopamine enhances fast excitatory synaptic transmission in the extended amygdala by a CRF-R1-dependent process. *J Neurosci* 28(51): 13856-13865.

Kash TL, Winder DG (2006). Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bi-directionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropharmacology* 51(5): 1013-1022.

Koob GF, Heinrichs SC (1999). A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848(1-2): 141-152.

Krawczyk M, Georges F, Sharma R, Mason X, Berthet A, Bezard E, *et al.* (2011). Double-dissociation of the catecholaminergic modulation of synaptic transmission in the oval bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurophysiol* 105(1): 145-153.

Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW (2002). Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 22(3): 991-1001.

Nakamori T, Morimoto A, Murakami N (1993). Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 beta. *Am J Physiol* 265(4 Pt 2): R834-839.

Nakamura T, Kawabe K, Sapru HN (2009). Cardiovascular responses to microinjections of urocortin 3 into the nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(2): H325-332.

Nasimi A, Hatam M (2011). The role of the cholinergic system of the bed nucleus of the stria terminalis on the cardiovascular responses and the baroreflex modulation in rats. *Brain Res* 1386: 81-88.

Nijssen MJ, Croiset G, Diamant M, De Wied D, Wiegant VM (2001). CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. *Neuropsychopharmacology* 24(1): 1-10.

Nijssen MJ, Croiset G, Diamant M, Stam R, Kamphuis PJ, Bruijnzeel A, *et al.* (2000a). Endogenous corticotropin-releasing hormone inhibits conditioned-fear-induced vagal activation in the rat. *Eur J Pharmacol* 389(1): 89-98. 20

Nijssen MJ, Croiset G, Stam R, Bruijnzeel A, Diamant M, de Wied D, *et al.* (2000b). The role of the CRH type 1 receptor in autonomic responses to corticotropin-releasing hormone in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22(4): 388-399.

Oberlander JG, Henderson LP (2012). Corticotropin-releasing factor modulation of forebrain GABAergic transmission has a pivotal role in the expression of anabolic steroid-induced anxiety in the female mouse. *Neuropsychopharmacology* 37(6): 1483-1499.

Organização Mundial de Saúde (2014). The top 10 causes of death <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>Acesso: 22/10/14.12:08h

Paxinos G, Watson C (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3 edn. Academic Press: Sidney, Australia.

Phelix CF, Paull WK (1990). Demonstration of distinct corticotropin releasing factor-containing neuron populations in the bed nucleus of the stria terminalis. A light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Histochemistry* 94(4): 345-364.

Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Correa FM, Guimaraes FS (2008). Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154(3): 869-876.

Ruhmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J (1998). Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15264-15269.

Reul, JM; Holsboer, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* 2(1), 23-33, 2002.

Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*. 1999 Apr 27;99(16):2192-217.

Sahuque LL, Kullberg EF, McGeehan AJ, Kinder JR, Hicks MP, Blanton MG, *et al.* (2006). Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)* 186(1): 122-132.

- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1986). Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res* 382(2): 213-238.
- Schadt JC, Hasser EM (1998). Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *Am J Physiol* 274(3 Pt 2): R814-821.
- Sgoifo A, Carnevali L, Grippo AJ (2014). The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 39:51-60.
- Shields AD, Wang Q, Winder DG (2009).  $\alpha_2A$ -adrenergic receptors heterosynaptically regulate glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 163(1): 339-351.
- Silberman Y, Matthews RT, Winder DG (2013). A corticotropin releasing factor pathway for ethanol regulation of the ventral tegmental area in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 33(3): 950-960.
- Stengel A, Tache Y (2010). Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 235(10): 1168-1178.
- Steptoe A, Kivimaki M (2012). Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 9:360-370.
- Sterling P (2012). Allostasis: a model of predictive regulation. *Physiol Behav* 106(1): 5-15.  
21
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3): 165-186.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10(6): 397-409.
- Vale, W.; Spiess, J; Rivier, C; Rivier, J. Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514),1394-1397, 1981.
- Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, *et al.* (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428(2): 191-212.

Vianna DM, Carrive P (2005). Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci* 21(9): 2505-2512.

Walker DL, Miles LA, Davis M (2009). Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(8): 1291-1308.

Wang L, Cardin S, Martinez V, Tache Y (1996). Intracerebroventricular CRF inhibits cold restraint-induced c-fos expression in the dorsal motor nucleus of the vagus and gastric erosions in rats. *Brain Res* 736(1-2): 44-53.

Weller, KL. e Smith, DA. Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 232(2): 255-70, 1982.

Zhang ZQ, Julien C, Barres C (1996). Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv Syst* 60(1-2): 23-30. 22