



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF) UFSCar/UNESP**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA

**Estudo da participação da neurotransmissão  
CRFérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) no  
controle da função cardiovascular em ratos:  
envolvimento nas alterações cardiovasculares  
induzidas pelo estresse crônico variado?**

**LEANDRO AUGUSTO DE OLIVEIRA**

**ARARAQUARA-SP**

**2020**

**LEANDRO AUGUSTO DE OLIVEIRA**

**Estudo da participação da neurotransmissão  
CRFérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) no  
controle da função cardiovascular em ratos:  
envolvimento nas alterações cardiovasculares  
induzidas pelo estresse crônico variado?**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do **Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.**

**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**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Leandro Augusto de Oliveira, realizada em 06/03/2020:

---

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

---

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira  
USP

---

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes  
USP

---

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
UNESP

---

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari  
UNESP



## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais **Paulo Henrique de Oliveira** e **Maria do Socorro Piló de Oliveira** por todo amor, paciência e compreensão que tiveram comigo durante esta jornada. Obrigado por sempre terem me apoiado em minhas decisões e me incentivarem sempre.

À minha amada e incrível tia **Mirna Fernanda de Oliveira** em quem me espelhei ao seguir esta carreira. Obrigado por sempre me instigar a questionar, refletir e me ensinar sobre ciência desde criança. Agradeço também por ter me aberto ao mundo, por participar de todas as etapas e por ser calma no meio de toda a turbulência chamada de pós-graduação. Muito dos resultados presentes aqui, devo a você.

Ao meu companheiro de vida, **Rodrigo Alves Pereira**, por ter me dado suporte ao longo de toda esta trajetória. Por sempre ter acreditado e confiado em mim e por ter sido meu alicerce diante de momentos tão difíceis dessa etapa. Obrigado por toda paciência e amparo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter me dado saúde e esperança, ao me fazer acreditar e não desistir.

Ao **Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani** que me recebeu em seu laboratório, por ter acreditado e confiado em mim quando eu mesmo duvidei de minhas capacidades e quis desistir. Obrigado por todo seu apoio, amizade e por me fazer perseverar. Tenho o senhor como um grande exemplo de pessoa e de cientista.

A **todos os colegas de grupo do professor Carlos**, desde os que fizeram iniciação científica até aos doutorandos e *post-doc*, em especial meus amigos **Ricardo Benini** e **Lucas Gomes de Souza** que colaboraram com o desenvolvimento dos experimentos. Sou muito grato a vocês.

Aos amigos acadêmicos **Celina, Tatiani, Gessynger, Larissa, Gabriel** (Estorvo), **Diego, Mateus** (Capiau), **Paula** (Pupu), **Nathália** (Bang), **Paola, Lucas Canto** por sempre estarem dispostos a ouvir, ajudar e tornar os dias no laboratório prazerosos. Obrigado “família farmaco”. Um agradecimento extra e especial aos amigos que desenvolvi projetos paralelos, **Patrícia, Vanessa, Lígia** e **Jéssica**. Obrigado pelos momentos partilhados, mesmo que os resultados não foram os esperados, amadurecemos e crescemos muito neste processo.

À **Susan Wood**, supervisora de meu estágio no exterior e aos amigos que fiz em Columbia: **Brandon, Grant, Julie, Jennifer e Frances**. Ao **João**, que também estava realizando seu estágio BEPE em Columbia. Muito obrigado pelas caronas, pizzas, cervejas, e abrigo durante a tempestade. Obrigado pelas conversas, pelo apoio durante este período na Carolina do Sul.

Às técnicas do laboratório **Rosana e Elizabete** que aposentaram. Vocês são demais e fazem muita falta! Muito obrigado por toda a dedicação.

À **banca examinadora**, composta por Prof Dr. Thiago dos SantosMoreira, Prof. Dr. Leonardo Barbosa Resstel, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza e Profa Dra. Debora Simões de Almeida Colombari pela atenção na leitura deste trabalho e contribuição científica.

Aos professores de farmacologia, **Ricardo, Marcelo e Cleópatra**, pelos momentos de convivência e reuniões científicas.

À secretária do departamento **Tirene**. Muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos, todas as conversas profundas e nossas

terapias (“food-terapia” e arteterapia). Você é um exemplo de honestidade e altruísmo.

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

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara** da UNESP (FCF) pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF), pela oportunidade. Também à **Universidade da Carolina do Sul**, pelo espaço cedido durante meu estágio no exterior.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, (FAPESP- processo 2014/23082-5) pelo apoio financeiro e divulgação em congressos científicos nacionais e internacionais.

Aos psicólogos **Paola**, **Hélio** e a terapeuta **Lucinéia**. Apoio essencial durante o percurso desafiador chamado doutorado.

Aos meus amigos de Araraquara, que sempre estiveram comigo e acompanharam toda a minha trajetória, **Darlene**, **Camila**, **Marcel**, **Ariani**, **Gabriela**. Aos que estão longe fisicamente, **Carla** e **Daiete**, meu muito obrigado. E também em memória de meu amigo **Leonardo**. Muito obrigado.

À toda minha família, em especial aos meus pais **Paulo** e **Maria**, ao meu irmão **Plínio**, minha cunhada **Dinara** e ao meu companheiro **Rodrigo**. À minha tia **Mirna** pela qual tenho tanta admiração, entrei na vida acadêmica querendo seguir o seu exemplo. Às minhas tias **Márcia**, **Mara** e **Maria Cristina** e em especial minhas primas **Ana Carolina** e **Thaís**. À minha avó **Ilda** e em memória daqueles que não puderam acompanhar a conclusão desta etapa, meus avós **Lourival**, **Elza** e minha tia-avó **Iria**. Muito obrigado por todo apoio e suporte, vocês são meu alicerce.

E por fim, a todos os ratos utilizados, pois suas vidas serviram para o desenvolvimento da ciência.

## RESUMO

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) sobre a função cardiovascular. Inicialmente, observamos que a microinjeção bilateral no NLET de CP376395, antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, reduziu a resposta de bradicardia reflexa, sem afetar a taquicardia do barorreflexo. Entretanto, o tratamento do NLET com antisauvagine-30, antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, reduziu a resposta de frequência cardíaca durante quedas da pressão arterial, sem afetar a bradicardia reflexa. Estes resultados evidenciam o envolvimento da neurotransmissão CRF no NLET sobre as respostas do barorreflexo. Nós também avaliamos o envolvimento da ativação do receptor NMDA e da sinalização do óxido nítrico (NO) local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela neurotransmissão CRFérgica no NLET. Assim, observamos que a microinjeção de CRF no NLET aumentou a liberação de óxido nítrico (NO) durante o estresse de restrição. Além disto, a microinjeção bilateral de CRF no NLET facilitou a resposta de aumento de pressão arterial e de frequência cardíaca durante a restrição, mas não afetou a vasoconstrição cutânea. Esta facilitação das respostas pressoras e taquicárdicas ao estresse de restrição causadas pelo tratamento do NLET com CRF foram completamente inibidas após o pré-tratamento local com antagonista seletivo de receptor NMDA (LY235959), com inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NPLA), com inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel (ODQ) ou com inibidor da proteína quinase G (KT5823). Estes resultados fornecem evidências de que a neurotransmissão CRF do NLET facilita a neurotransmissão glutamatérgica através do receptor NMDA e ativa a sinalização nitrérgica local, sendo esta via envolvida no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. Também avaliamos o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas alterações dos parâmetros cardiovasculares basais e da atividade do barorreflexo desencadeadas pela exposição a um protocolo de estresse crônico variado (ECV). Nós identificamos que a exposição a um protocolo de 10 dias de ECV reduziu a expressão dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET, e esses efeitos foram acompanhados por aumento da pressão arterial basal e prejuízo da função barorreflexa. A microinjeção bilateral de CP376395 ou de



antisauvagine-30 no NLET não afetou o aumento da pressão arterial causado pelo ECV. Entretanto, o tratamento com CP376395 reduziu as respostas de taquicardia e bradicardia do barorreflexo nos ratos não-estressados, efeitos que não foram identificados nos ratos estressados. O tratamento farmacológico com antisauvagine-30 reduziu a taquicardia reflexa nos animais controle, enquanto que o reflexo de bradicardia foi aumentado nos animais cronicamente estressados. Assim, os resultados reportados no presente estudo indicam o envolvimento dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET sobre o prejuízo da função do barorreflexo provocado pelo estresse crônico. Além disto, a exposição de ratos ao ECV não produziu redução no teste de preferência à sacarose, porém o tratamento farmacológico no NLET com antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> reduziu a preferência à sacarose apenas em ratos não-estressados. Já os dados moleculares demonstraram que o protocolo de ECV por 10 dias não alterou o número de neurônios CRF no NLET. Por fim, quando foi avaliado o papel do receptor CRF<sub>1</sub> do NLET no modelo social de estresse de testemunha, a microinjeção de CP376395 no NLET resultou na atenuação das respostas pressoras durante a quinta sessão, sem alterações dos outros parâmetros avaliados. Em conjunto, os resultados da presente tese evidenciam a participação da neurotransmissão CRFérgica do NLET no controle da função cardiovascular em condições de repouso e durante situações aversivas agudas e crônicas.

**Palavras-chave:** núcleo leito da estria terminal, fator liberador de corticotrofina, barorreflexo, estresse.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the role of CRFergic neurotransmission into bed nucleus of stria terminalis (BNST) on cardiovascular function. We observed that bilateral microinjection of the selective CRF<sub>1</sub> antagonist CP376395 into BNST reduced the reflex bradycardia without affecting the tachycardia. Conversely the BNST treatment with antisauvagine-30 decreased heart rate response during medial arterial pressure drop without affecting the reflex bradycardia. These findings provide evidence of an involvement of CRF neurotransmission within BNST in baroreflex activity. Secondly, we assessed the interaction of CRF neurotransmission within BNST with local nitrenergic signaling, as well as to investigate an involvement of activation of local NMDA glutamate receptor and nitric oxide (NO) signaling in control of cardiovascular responses to acute restraint stress by BNST CRF neurotransmission in rats. We observed that CRF microinjection into the BNST increased local NO release during restraint stress. Furthermore, bilateral microinjection of CRF into the BNST enhanced both the arterial pressure and heart rate increases evoked by restraint stress, but without affecting the sympathetically-mediated cutaneous vasoconstriction. The facilitation of both pressure and tachycardiac responses to restraint stress evoked by BNST treatment with CRF were completely inhibited by local pretreatment with either the selective NMDA glutamate receptor antagonist LY235959, the selective neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor NPLA, the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor ODQ or the protein kinase G (PKG) inhibitor KT5923. Taken together, these results provide evidence that BNST CRF neurotransmission facilitate local NMDA-mediated glutamatergic neurotransmission and activates nitrenergic signaling, and this pathway is local NMDA-mediated glutamatergic neurotransmission and activates nitrenergic signaling, which pathway is involved in control of cardiovascular responses to stress. We investigated the involvement of BNST CRFergic neurotransmission in cardiovascular changes evoked by chronic stress in rats. We identified that exposure to a 10-day chronic variable stress (CVS) protocol decreased expression of both CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors within the BNST. These effects were followed by increased arterial pressure and impairment of baroreflex

function, but without changes on heart rate. Bilateral microinjection of CP376395, or antisauvagine-30 into the BNST did not affect CVS-evoked arterial pressure increase. Nevertheless, BNST treatment with CP376395 decreased both tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in non-stressed rats; but these effects were not identified in chronically stressed animals. BNST pharmacological treatment with antisauvagine-30 decreased the reflex tachycardia in control animals, whereas reflex bradycardiac response was increased in CVS animals. Therefore, the results reported in the present study indicate an involvement of both CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors within the BNST in baroreflex impairment evoked by chronic stress. Furthermore, the exposition of rats into the CVS protocol did not change the sucrose preference. However, the pharmacological treatment into BNST with CRF<sub>1</sub> antagonist reduced the sucrose preference only in control group. The molecular data resulted in no alteration of the number of CRF neurons into BNST. Last, but not least, when the role of CRF<sub>1</sub> receptors into BNST were evaluated during the social model of witness stress, the microinjection of CP376395 into BNST reduced the pressor responses on day 5, without changing others parameters. Altogether, the results of this present thesis show the participation of BNST CRF neurotransmission in the control of cardiovascular function in resting conditions and during acute and chronic aversive situations.

**Keywords:** bed nucleus of stria terminalis, corticotropin releasing factor, baroreflex, stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da modulação do barorreflexo durante o estresse emocional.....	<b>25</b>
<b>Figura 2:</b> Representação diagramática, indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET do antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> e o antagonismo seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> sobre as respostas do barorreflexo.....	<b>44</b>
<b>Figura 3:</b> Análise de regressão não-linear e linear da função do barorreflexo antes e após o tratamento local no NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> .....	<b>47</b>
<b>Figura 4:</b> Análise de regressão não-linear e linear da função do barorreflexo antes e após o tratamento local no NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> .....	<b>49</b>
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro representando o sítio de microinjeção no NLET de um animal representativo.....	<b>66</b>
<b>Figura 6:</b> Níveis de NOx no núcleo leito da estria terminal (NLET) após uma sessão aguda de estresse de restrição em animais que receberam a microinjeção bilateral de veículo ou CRF no NLET.....	<b>67</b>
<b>Figura 7:</b> Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro representando a retirada do NLET através do <i>punch</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 8:</b> Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo ou antagonista seletivo do receptor NMDA, seguida de uma segunda microinjeção de veículo ou CRF.....	<b>71</b>

<b>Figura 9:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento de receptor glutamatérgico NMDA local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET.....	<b>72</b>
<b>Figura 10:</b> Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo ou inibidor seletivo de nNOS, seguida de uma segunda microinjeção de veículo ou CRF.....	<b>74</b>
<b>Figura 11:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento da enzima nNOS local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET.....	<b>75</b>
<b>Figura 12:</b> Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda desencadeadas pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo ou inibidor seletivo da GCs, seguida de uma segunda microinjeção de veículo ou CRF.....	<b>77</b>
<b>Figura 13:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento da enzima GCs local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET.....	<b>78</b>
<b>Figura 14:</b> Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda desencadeadas pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo ou o inibidor seletivo da PKG, seguida de uma segunda microinjeção de veículo ou CRF.....	<b>80</b>

<b>Figura 15:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento da PKG local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET.....	<b>81</b>
<b>Figura 16:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção no NLET do antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> ou de salina de ratos controle ou expostos ao protocolo de ECV.....	<b>101</b>
<b>Figura 17:</b> Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>102</b>
<b>Figura 18:</b> Análise de regressão não-linear e linear da função do barorreflexo correlacionando as alterações da PAM ( $\Delta$ PAM) e a resposta reflexa da FC ( $\Delta$ FC) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>106</b>
<b>Figura 19:</b> Parâmetros derivados da análise das curvas de regressão não-linear e linear do barorreflexo de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou CP376395 de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> ) no NLET.....	<b>107</b>
<b>Figura 20:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção no NLET de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> ou veículo de ratos controle ou expostos ao protocolo de ECV.....	<b>108</b>
<b>Figura 21:</b> Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> no NLET.....	<b>109</b>

<b>Figura 22:</b> Análise de regressão não-linear e linear da função do barorreflexo correlacionando as alterações da PAM ( $\Delta$ PAM) e a resposta reflexa da FC ( $\Delta$ FC) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> no NLET.....	<b>113</b>
<b>Figura 23:</b> Parâmetros derivados da análise das curvas de regressão não-linear e linear do barorreflexo de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> no NLET.....	<b>114</b>
<b>Figura 24:</b> Expressão dos receptores CRF <sub>1</sub> e CRF <sub>2</sub> do NLET de ratos controle e expostos ao protocolo de ECV.....	<b>115</b>
<b>Figura 25:</b> Representação do experimento e teste de preferência à sacarose em ratos controle e submetidos ao ECV, em dias.....	<b>132</b>
<b>Figura 26:</b> Linha do tempo do dia do teste de preferência à sacarose.....	<b>132</b>
<b>Figura 27:</b> Representação diagramática indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> em animais controle e estressados cronicamente que foram submetidos ao teste de preferência à sacarose.....	<b>133</b>
<b>Figura 28:</b> Resultados do teste de preferência à sacarose de ratos controle ou estressados cronicamente que receberam a microinjeção de antagonista CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>135</b>
<b>Figura 29:</b> Células positivas para CRF no núcleo leito da estria terminal (NLET) de ratos controle e animais submetidos ao ECV.....	<b>142</b>
<b>Figura 30:</b> Linha temporal de experimento de estresse de testemunha, em dias.....	<b>151</b>

<b>Figura 31:</b> Representação esquemática das microinjeções no NLET do antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> ou veículo em ratos controle e testemunha.....	<b>152</b>
<b>Figura 32:</b> Pesos das glândulas adrenais, coração e corporal em ratos controle e cronicamente estressados que receberam a microinjeção no NLET de salina ou de antagonista seletivo do receptor CRF <sub>1</sub> .....	<b>153</b>
<b>Figura 33:</b> Valores basais de PAM e FC em ratos controle ou estressados (testemunhas) tratados com salina ou com antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET nos dias 1 e 5.....	<b>154</b>
<b>Figura 34:</b> Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) de ratos controle (manipulação) e de ratos que testemunharam a derrota social que foram tratados com o antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> CP376395 (5nmol/100nl) ou veículo (100nl) nos dias 1 e 5.....	<b>155</b>
<b>Figura 35:</b> Latência e tempo de duração do comportamento defensivo de empurrar a maravalha ( <i>bury</i> ) em ratos controle e testemunha que foram tratados com salina ou com antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>156</b>
<b>Figura 36:</b> Preferência à sacarose em ratos controle e cronicamente estressados (testemunha) tratados com salina ou com o antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>157</b>
<b>Figura 37:</b> Neurônios positivos para c-fos em ratos controle, intruso e testemunha, avaliados 90 minutos após o final da derrota social.....	<b>158</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros derivados das curvas sigmoides do barorreflexo geradas antes e após a microinjeção de salina, do antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> ou de antagonista seletivo de receptor CRF <sub>2</sub> no NLET.....	<b>46</b>
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T) após o tratamento farmacológico no NLET.....	<b>70</b>
<b>Tabela 3:</b> Protocolo de estresse crônico variado (ECV).....	<b>97</b>
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros derivados das curvas sigmoides do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam microinjeção de veículo ou do antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>104</b>
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros derivados das curvas de regressão linear do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam microinjeção de veículo ou do antagonista seletivo de receptor CRF <sub>1</sub> no NLET.....	<b>105</b>
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros derivados das curvas sigmoides do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) que receberam a microinjeção de veículo ou do antagonista seletivo do receptor CRF <sub>2</sub> no NLET.....	<b>111</b>
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros derivados das curvas de regressão linear do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo ou do antagonista seletivo do receptor CRF <sub>2</sub> no NLET.....	<b>113</b>

## SUMÁRIO

<b>ASPECTOS GERAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1. Respostas agudas ao estresse.....	21
1.2. Respostas cardiovasculares ao estresse crônico variado (ECV).....	26
1.3. O núcleo leito da estria terminal (NLET).....	27
1.4. Neurotransmissão crfégica no NLET.....	28
<b>2. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 1 - O envolvimento da neurotransmissão CRFégica do NLET nas respostas cardíacas do barorreflexo.....</b>	<b>38</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. Animais.....	39
3.2. Implantes de cânulas no NLET.....	39
3.3. Cirurgia de canulação da artéria femoral.....	40
3.4. Registro de pressão arterial e frequência cardíaca.....	41
3.5. Drogas e soluções.....	41
3.6. Microinjeção de drogas no NLET.....	41
3.7. Avaliação da atividade do barorreflexo.....	42
3.8. Determinação dos sítios de injeção no NLET.....	42
<b>4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>43</b>
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>44</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
6.1. Efeitos do tratamento do NLET com CP376395 na atividade do barorreflexo em ratos não-anestesiados.....	44
6.2. Efeitos do tratamento do NLET com antisauvagine-30 na atividade do barorreflexo em ratos não-anestesiados.....	48
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

<b>CAPÍTULO 2 - O controle das respostas cardiovasculares ao estresse por CRF no NLET é mediado por receptor NMDA/NO/guanilato ciclase solúvel / proteína quinase G.....</b>	<b>59</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>61</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
3.1. Animais.....	61
3.2. Implantes de cânulas bilaterais no NLET.....	61
3.3. Cirurgia de canulação da artéria femoral.....	61
3.4. Registro de pressão arterial e frequência cardíaca.....	61
3.5. Registro de temperatura da cutânea da cauda.....	62
3.6. Drogas e soluções.....	62
3.7. Microinjeção de drogas no NLET.....	62
3.8. Estresse por restrição agudo.....	62
3.9. Determinação dos sítios de injeção.....	63
3.10. Medidas dos metabólitos de NO.....	63
3.10.1. Microdissecção do NLET.....	63
3.10.2. Quantificação dos níveis de metabólitos do NO.....	63
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>64</b>
4.1. Efeito da microinjeção de CRF no NLET dos níveis de NOx durante o estresse por restrição agudo.....	64
4.2. Avaliação da interação entre receptor CRF <sub>1</sub> e a neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica no NLET no controle das respostas autônomas ao estresse por restrição agudo.....	64
<b>5. ANÁLISE ESTÁTÍSTICA.....</b>	<b>65</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
6.1. Efeitos da microinjeção de CRF no NLET sobre os níveis locais de NOx durante o estresse agudo de restrição.....	66
6.2. Envolvimento da sinalização NMDA/nNOS/GCs/PKG local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela neurotransmissão CRFérgica do NLET.....	68
6.2.1. Receptor NMDA.....	68
6.2.2. Enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS).....	73
6.2.3. Guanilato ciclase solúvel (GCs).....	76
6.2.4. Proteína quinase G (PKG).....	79

<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO 3 - Os receptores CRF do núcleo leito da estria terminal (NELT) estão envolvidos com o prejuízo do barorreflexo provocado por estresse crônico em ratos.....</b>	<b>93</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>96</b>
3.1. Animais.....	96
3.2. Implantes de cânulas bilaterais no NLET.....	96
3.3. Cirurgia de canulação da artéria e veia femoral.....	96
3.4. Registro de pressão arterial e frequência cardíaca.....	96
3.5. Estresse crônico variado (ECV).....	96
3.6. Drogas e soluções.....	97
3.7. Microinjeção de drogas no NLET.....	97
3.8. Avaliação da atividade do barorreflexo.....	97
3.9. Determinação anatômica dos sítios de injeção no NLET.....	97
3.10. Medida dos níveis proteicos dos receptores CRF <sub>1</sub> e CRF <sub>2</sub> no NLET	97
3.10.1. Microdissecção do NLET.....	98
3.10.2. Western Blotting.....	98
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>98</b>
4.1. Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas alterações da atividade barorreflexo induzidas pelo estresse crônico variado.....	99
4.2. Estudo do efeito do estresse crônico variado (ECV) sobre a expressão dos receptores CRF <sub>1</sub> e CRF <sub>2</sub> no NLET.....	99
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>100</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>100</b>
6.1. Estudo do envolvimento do receptor CRF <sub>1</sub> do NLET nas alterações da atividade barorreflexa induzidas pelo estresse crônico variado (ECV)	100
6.2. Estudo do envolvimento do receptor CRF <sub>2</sub> do NLET nas alterações da atividade barorreflexa induzidas pelo estresse crônico variado (ECV)	108

6.3. Efeitos do ECV sobre a expressão de receptores CRF <sub>1</sub> e CRF <sub>2</sub> no NLET.....	115
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>116</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>
<b>CAPÍTULO 4 - Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) na resposta comportamental anedônica induzida por estresse crônico variado (ECV).....</b>	<b>129</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>129</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>130</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>130</b>
3.1 Animais.....	130
3.2 Cirurgia de estereotaxia.....	130
3.3 Drogas e soluções.....	130
3.4 Microinjeção de drogas no NLET.....	130
3.5 Determinação dos sítios de injeção no NLET.....	130
3.6 Teste de preferência à sacarose.....	130
<b>4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>131</b>
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>132</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>133</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>137</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>137</b>
<b>CAPÍTULO 5 - Experimento complementar.....</b>	<b>140</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>140</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>140</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>140</b>
3.1 Animais.....	140
3.2 Estresse crônico variado (ECV).....	140
3.3 Imunofluorescência.....	140
<b>4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>141</b>
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>141</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>142</b>

<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>142</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>143</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>143</b>
<b>CAPÍTULO 6 – O papel dos receptores CRF<sub>1</sub> do núcleo leito da estria terminal (NLET) sobre as respostas cardiovasculares, comportamentais e moleculares provocadas pelo estresse de testemunha em ratos.....</b>	<b>146</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>146</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>147</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>147</b>
3.1 Animais.....	147
3.2 Cirurgia de telemetria.....	148
3.3 Cirurgia de estereotaxia.....	148
3.4 Aquisição dos dados cardiovasculares.....	148
3.5 Teste de preferência à sacarose.....	148
3.6 Imunohistoquímica.....	149
3.6.1 Dupla marcação de neurônios c-fos e CRF no NLET e CeA..	149
<b>4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>150</b>
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>151</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>152</b>
6.1 Análises somáticas.....	152
6.2 Respostas de PAM e FC durante o estresse de testemunha.....	153
6.3 Análises comportamentais.....	155
6.4 Ativação de neurônios do NLET e CeA de ratos intrusos e testemunhas.....	157
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>158</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>162</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>162</b>

## *Aspectos Gerais*

## **1. INTRODUÇÃO**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença cardíaca isquêmica e o acidente vascular cerebral (AVC) são as principais causas de morte no mundo, totalizando 15,2 milhões de pessoas em 2016 (OMS, 2018). Além disto, essas doenças permanecem como as maiores causas de morte ao longo dos últimos 15 anos (OMS, 2018). Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado a importância de fatores psicossociais na etiologia e progressão das doenças cardiovasculares (CRESTANI, 2016). Dentre estes, o estresse psicológico possui efeitos sobre a saúde cardiovascular sendo considerado um fator de risco independente de outros fatores tradicionais como idade, sexo, tabagismo, diabetes mellitus e obesidade (CRESTANI, 2016).

O estresse atualmente pode ser definido como um conjunto de eventos, que se constitui a partir do estímulo (estressor) sendo processado no cérebro (percepção), levando à ativação dos sistemas de luta ou fuga do organismo (resposta ao estresse)” (DHABHAR, 2014; DHABHAR, 2018; DHABAR & MCWEWN, 1997; DHABHAR, 2019). A duração da resposta do estresse é o determinante para os efeitos positivos e protetores *versus* negativos e prejudiciais (DHABHAR, 2014,2018,2019; DHABHAR & MCWEWN, 1997). O estresse agudo é definido como a exposição ao estresse por minutos a horas, enquanto que o estresse crônico consiste na exposição por diversas horas, dias ou meses (DHABAR & MCWEWN, 1997; DHABAR 2019). Entretanto, a longa e duradoura exposição a estressores promove a elevação de respostas fisiológicas ao longo do tempo, ocasionando uma carga ao organismo, predispondo o indivíduo a doenças (MCEWEN, 2000). Outras características do estressor como a previsibilidade (previsível ou homotípico *versus* imprevisível ou heterotípico) e a intensidade também possuem impacto sobre os processos psicológicos e fisiológicos (CRESTANI, 2016).

### **1.1 Respostas agudas ao estresse**

Diante de uma situação aversiva, ocorre a ativação do sistema nervoso autônomo e neuroendócrino. Através da liberação de glicocorticóides, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) mobiliza as reservas de energia a fim de



garantir todos os recursos necessários para o organismo (HERMAN et al., 2016). Essa é uma resposta importante, sendo o seu pico observado vários minutos após o início do estímulo aversivo, cerca de 10 a 15 minutos, permitindo assim uma resposta prolongada e amplificada ao estresse (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009; MCKLVEEN et al., 2015).

Wyle W. Vale e colaboradores identificaram o fator de liberação de corticotrofina (CRF) no hipotálamo, que foi isolado a partir de fragmentos hipotalâmicos de ovinos (VALE et al., 1981; HERMAN et al., 2016; DEUSSING & CHEN, 2018). A forma biologicamente ativa e madura do CRF é composta por um peptídeo com 41 aminoácidos, que é gerado através da clivagem de um peptídeo precursor composto por 196 aminoácidos (DEDIC et al., 2018). Os neurônios CRF estão localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), na divisão parvocelular medial, e são ativados durante o estresse (HERMAN et al., 2016). Os neurônios CRF se projetam para eminência média onde o CRF e outros peptídeos como a vasopressina, são liberados no sistema porta-hipofisário (HERMAN et al., 2016). Esses peptídeos trafegam até a pituitária anterior e se ligam aos seus receptores nos corticotróficos, causando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (HERMAN et al., 2016). Especificamente, o CRF se liga ao receptor CRF<sub>1</sub>, acoplado à proteína G e ativa a adenilato ciclase. Essa ligação aumenta a transcrição do gene proopiomelanocortina (POMC), o qual codifica o ACTH (HERMAN et al., 2016). Então, o ACTH é armazenado em vesículas e liberado via exocitose para a circulação (HERMAN et al., 2016). Quando o ACTH chega ao córtex da glândula adrenal, age nos receptores de melanocortina 2 (MC2R) na zona fasciculada (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999; HERMAN et al., 2016). Essa ligação produz aumentos de AMPc dependentes de adenilato ciclase, o que causa o aumento rápido na biossíntese do colesterol, sendo o precursor da maioria dos esteroides, incluindo os mineralocorticóides e os glicocorticóides (SIMPSON & WATERMAN; HERMAN et al., 2016). A vasopressina é liberada em conjunto, a partir dos terminais CRF na eminência média e age com o CRF para reforçar a resposta durante o estresse (GILLIES et al., 1982; HERMAN et al., 2016). Ela se liga aos receptores AVP1B que ativam a proteína quinase C, complementando as ações do CRF na liberação de ACTH, porém não é suficiente para liberar o ACTH sozinha (AGUILERA & RABADAN-DIEHI, 2000;

HERMAN et al., 2016). No sentido de restaurar o eixo HPA aos níveis normais, os sinais dos glicocorticóides são enviados de volta ao SNC através de feedback via receptores glicocorticóides e mineralocorticóides no hipotálamo e em outras estruturas como o hipocampo, que inibem a secreção de CRF e consequentemente ACTH (DEDIC et al., 2018).

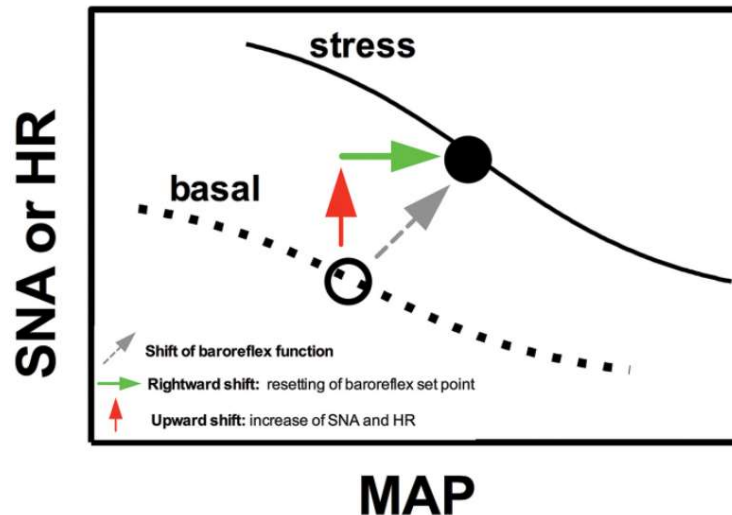
As respostas autônomas produzem a resposta imediata ao estresse, sendo caracterizada principalmente por alterações na função cardiovascular, como o aumento da pressão arterial e frequência cardíaca (FC), a redistribuição do fluxo sanguíneo (redução do fluxo da pele e vísceras e aumento para a musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (BARRON e VAN LOON, 1989, DAMPNEY et al 2008, CRESTANI et al., 2010, CRESTANI 2016). A redistribuição do fluxo sanguíneo acaba reduzindo o fluxo de sangue para a pele e produz queda de temperatura cutânea durante situações aversivas (VIANNA e CARRIVE, 2005, BUSNARDO et al., 2010, CRUZ et al., 2012). Além disso, a ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos que se projetam para a glândula adrenal promovem aumentos nos níveis circulantes de adrenalina e noradrenalina (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009).

Um importante mecanismo que controla a pressão arterial em repouso e durante situações aversivas é o barorreflexo (GUYNET, 2006; CRESTANI, 2016). Anatomicamente, os barorreceptores são terminações nervosas livres que estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, especificamente na camada adventícia, na borda médio-adventicial das artérias carótidas e aorta (KRAUS, 1979). Eles possuem canais mecano-sensíveis permeáveis aos cátions cálcio e sódio, promovendo assim despolarização (DRUMMOND et al., 1998; DRUMMOND et al., 2001).

O aumento da pressão arterial causa distensão de vasos arteriais, o que aciona os canais mecano-sensíveis, permitindo o influxo de sódio e cálcio, ocasionando despolarização e geração de potenciais de ação (CHAPLEAU et al., 1995). Os potenciais de ação gerados são deflagrados até o núcleo do trato solitário (NTS) localizado no bulbo através do nervo sinusal e nervo depressor aórtico que se fundem ao nervo glossofaríngeo e ao nervo vago, respectivamente (IRIGOYEN et al., 2005). A excitação do NTS durante aumentos da pressão arterial ocorre através da liberação de glutamato e ativação de receptores metabotrópicos e ionotrópicos locais (CHAPLEAU et al.,

1995). Os neurônios do NTS se projetam e estimulam o núcleo dorsal do vago e o núcleo ambíguo, causando o aumento do tônus vagal para o coração. Além disso, a estimulação do NTS promove a excitação do núcleo ventrolateral caudal (CVL) através da liberação de glutamato, que por sua vez inibe o núcleo ventrolateral rostral (RVL) através da liberação do aminoácido gama-aminobutírico (GABA), reduzindo a atividade simpática para o coração e vasos (SVED & GORDON, 1994; PILOWSKY & GOODCHIL, 2002; GUYNET, 2006). Assim, a soma dessas respostas autônomas contribuem para as reduções de frequência cardíaca, volume sistólico, resistência periférica e retorno venoso, culminando em redução da pressão arterial (SVED & GORDON, 1994; PILOWSKY & GOODCHIL, 2002; GUYNET, 2006). O oposto desses eventos ocorre quando há quedas da pressão arterial, diminuindo a estimulação dos barorreceptores, reduzindo a despolarização do NTS, provocando a redução da atividade parassimpática e aumento da atividade simpática, promovendo o aumento da pressão arterial.

Com relação às respostas cardiovasculares durante situações aversivas, diversos estudos demonstraram que as respostas de ativação simpática, pressora, taquicárdica e de vasoconstrição são facilitadas durante eventos aversivos em ratos que tiveram a desnervação sino-aórtica, indicando o papel ativo do barorreflexo durante essas situações (NORMAN et al., 1981; BUCHHOLZ et al., 1986; ZHANG et al., 1996; DOS REIS et al., 2014; CRESTANI, 2016). O controle cardiovascular exercido pelo barorreflexo durante o estresse ocorre através de alterações no seu ponto de atividade, o que resulta em deslocamento da curva barorreflexa para cima e para a direita (Figura 1), o que permite o concomitante aumento da pressão arterial e de frequência cardíaca durante o estresse (CRESTANI, 2016). Acredita-se que estruturas encefálicas rostrais tenham um papel importante nessa modulação barorreflexa, porém os mecanismos neurobiológicos ainda são pouco compreendidos.



**Figura 1:** Representação esquemática da modulação do barorreflexo durante o estresse emocional. FONTE: CRESTANI, 2016.

A resposta de taquicardia durante situações aversivas é mediada pelo aumento do tônus simpático para o coração (IWATA & LEDOUX , 1988; BAUDRIE et al., 1997; SGOIFO et al., 1999; VAN DEB BUUSE et al., 2001; CARRIVE,2006; CRESTANI et al., 2010; DOS REIS et al., 2014; CRESTANI 2016). Entretanto, foi demonstrado que o tratamento sistêmico com antagonistas colinérgicos muscarínicos promoveu a facilitação da taquicardia induzida pelo estresse, indicando um aumento do tônus parassimpático ao coração, o que indica uma coativação de ambos sistemas durante o estresse (IWATA & LEDOUX, 1988; BAUDRIE et al., 1997; NIJSEN et al., 1998; CARRIVE,2006, CRESTANI et al., 2009; DOS REIS et al., 2014; CRESTANI 2016). O aumento no tônus parassimpático para o coração permite um controle preciso, reduzindo sua amplitude e agindo contra a ativação cardíaca excessiva associada com a ativação do simpático (CRESTANI, 2016). A ativação parassimpática, e a consequente redução das respostas cardíacas, contribuem para a estabilização do estado funcional do coração (PATON et al 2005; CRESTANI et al., 2016).

Juntas, as alterações autônomas e neuroendócrinas são importantes respostas adaptativas, contribuindo para a manutenção da homeostasia e garantindo a sobrevivência durante situações aversivas (STERLING & EYER, 1988; STERLING, 2012, CRESTANI, 2016).

## **1.2. Respostas cardiovasculares ao estresse crônico**

Exposições crônicas a estressores promovem a geração frequente e prolongada das respostas discutidas acima, o que pode resultar no desenvolvimento de disfunções morfofuncionais e doenças (MCEWEN & STELLAR, 1993; MCEWEN, 1998; DANESE & MC EWEN, 2012, CRESTANI, 2016). Nesse sentido, alterações na atividade do barorreflexo foram reportadas em animais após a exposição a diversos estressores crônicos, incluindo o estresse crônico variado (ECV), estresse de restrição repetido (ERR), derrota social e isolamento social (CONTI et al., 2001; PORTER et al., 2004 DAUBERT et al., 2012; XIE et al., 2012; SÉVOZ-COUCHE et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015; DUARTE et al., 2015; CRUZ et al., 2016).

O modelo de ECV consiste na exposição repetida de roedores a diferentes estressores inescapáveis de maneira imprevisível. A exposição de animais a esse modelo de estresse por 10 ou 14 dias produziu alterações no controle do barorreflexo, respostas que não foram observada após a exposição ao ECV durante 4 semanas (DUARTE et al., 2015; XIE et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015 GRIPPO et al., 2008; CRESTANI, 2016). No entanto, o reflexo de aumento da atividade do nervo lombar simpático induzido por hipotensão foi reduzido após a exposição ao ECV por 4 semanas, indicando que o nervo simpático lombar e a inervação cardíaca autônoma são afetadas de maneiras diferentes pelo ECV (GRIPPO et al., 2008; CRESTANI, 2016). Além disso, efeitos diferentes do ECV sobre o reflexo de bradicardia induzido por aumentos da PAM foram observados quando a função do barorreflexo foi avaliada em animais anestesiados, produzindo facilitação, enquanto que em não-anestesiados foi identificado prejuízo na função, indicando que a anestesia pode afetar a análise cardiovascular ao estresse crônico (XIE et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015; DUARTE et al., 2015; CRESTANI et al., 2016).

Os estudos que avaliaram a função cardiovascular em animais não-anestesiados mostraram que tanto ECV quanto sessões de derrota social repetida prejudicam a função do barorreflexo (GRIPPO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2015; SÉVOZ-COUCHE et al., 2013). Desse modo, esse prejuízo da função do barorreflexo pode estar envolvido na fisiopatologia da hipertensão e associado com a superatividade simpática (GRASSI et al., 2004; GRASSI et al.,

2006; HONZIKOVA & FISHER, 2009; CRESTANI, 2016). Portanto, a simpatoexcitação e o sutil aumento da pressão arterial podem ser induzidos por esses tipos de estressores crônicos (CRESTANI, 2016). Essas evidências fundamentam a importância de compreender os mecanismos neurobiológicos e os substratos que estão envolvidos no controle das respostas cardiovasculares durante eventos aversivos e as consequências do estresse sobre o barorreflexo.

### **1.3. O núcleo leito da estria terminal (NLET)**

O núcleo leito da estria terminal (NLET) possui um importante papel no controle da função cardiovascular, da atividade neuroendócrina e de respostas comportamentais (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009; DAVIS et al., 2010; CRESTANI et al., 2013). É uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, que forma um contínuo rostral à amígdala, possuindo uma notável similaridade morfológica e neuroquímica com a amígdala (DONG et al., 2001; DE OLMOS et al., 2004; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Assim, o NLET é considerado um constituinte da “amígdala estendida”, o qual é composto pelos núcleos central (CeA) e medial (MeA) da amígdala e o NLET, bem como o conjunto de células que conectam essas estruturas (ALHEID & HEIMER, 1988; DE OLMOS et al., 2004).

Esse núcleo possui conexões recíprocas com a amígdala, além de receber projeções do hipocampo e do córtex pré-frontal medial (CULLINAN et al., 1993; DONG et al., 2001; VERTES, 2004). Além disso, o NLET também é conectado com regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas no controle da atividade cardiovascular e neuroendócrina (DONG et al., 2004), recebendo assim informações ascendentes de estressores sistêmicos como hemorragia e hipertensão (POTTS et al., 1997). Desse modo, propõe-se que o NLET seja um centro de integração de respostas comportamentais e fisiológicas, ao conectar estruturas como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal a regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas no controle autônomo e neuroendócrino (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009).

Tem sido demonstrada a presença de numerosos neurotransmissores e neuromoduladores no NLET, como aminoácidos excitatórios e inibitórios, monoaminas, acetilcolina, óxido nítrico (NO), mecanismos endocanabinóides e

neuropeptídios (CRESTANI et al., 2013). Evidências consistentes indicaram o envolvimento de mecanismos glutamatérgicos, gabaérgicos, noradrenérgicos e colinérgicos do NLET no controle da função cardiovascular (CRESTANI et al., 2013). No entanto, um possível papel de outros mecanismos neuroquímicos locais, incluindo mecanismos neuropeptidérgicos, ainda é pouco compreendido.

#### **1.4. Neurotransmissão CRFérgica no NLET**

Conforme descrito anteriormente, o CRF foi identificado como um regulador da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (VALE et al., 1981). Entretanto, atualmente é bem descrita a ampla distribuição do CRF e dos receptores de CRF no encéfalo, e esse mecanismo neuroquímico está envolvido no controle de diversas respostas fisiológicas e comportamentais independentes do eixo HPA, incluindo: ansiedade e depressão, função cardiovascular e atividade autônoma, aprendizado e memória, atividade locomotora, sono, comportamento de apetite, libido e respostas ao estresse (HENCKENS et al., 2016; DEDIC et al., 2018; DEUSSING & CHEN, 2018; GAO & GAO, 2019).

A família CRF é composta pelo CRF e outros três peptídeos adicionais: a urocortina 1 (UCN1), urocortina 2 (UCN2) e urocortina 3 (UCN3) (HAUGER et al., 2003; BALE & VALE, 2004; DEDIC et al., 2018). 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 & VALE, 2004; DEUSSING & CHEN, 2018). As seletividades dos peptídeos aos receptores são diferentes: o CRF possui maior seletividade ao receptor CRF<sub>1</sub>; a UCN1 se liga igualmente a ambos receptores; a UCN2 e a UCN3 ligam-se seletivamente ao receptor CRF<sub>2</sub> (HAUGER et al., 2003; BALE & VALE, 2004; DEUSSING & CHEN, 2018). Foram identificadas três variantes do receptor CRF<sub>2</sub> em humanos (CRF<sub>2</sub>(a), CRF<sub>2</sub>(b) e CRF<sub>2</sub>(c)) e duas variantes em roedores (CRF<sub>2</sub>(a) e CRF<sub>2</sub>(b)), porém as variantes não apresentam diferenças no perfil farmacológico (HAUGER et al., 2003).

O NLET expressa os receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>, e foram localizados localmente terminais contendo CRF, UCN1 e UCN3 (CHALMERS et al., 1995; CHEN et al., 2000; REUL et al., 2002; SAKANAKA et al., 1986; BITTENCOURT

et al., 1999; LI et al., 2002; BECKERMAN et al., 2013). Além disso, foram identificadas populações de neurônios no NLET que expressam CRF e UCN3 (PHELIX et al., 1990, SWANSON et al., 1983; LI et al., 2002). Sendo assim, tem sido demonstrado que o CRF, e possivelmente as urocortinas, liberados de fontes intrínsecas ou extrínsecas podem modular a atividade de neurônios no NLET (ERB & STEWART, 1999; SILBERMAN et al., 2013).

Nos capítulos a seguir, são descritos os estudos realizados para a investigação do papel da neurotransmissão “CRFérgica” no NLET sobre as respostas do barorreflexo e o controle das respostas cardiovasculares ao estresse agudo e crônico. As fundamentações teóricas de cada um desses experimentos estão descritas na introdução de cada capítulo.

## **2. REFERÊNCIAS**

Aguilera G, Rabadan-Diehl C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept.* 96:23-29, 2000.

Alheid GF, Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substatia innominate. *Neuroscience* 27(1), 1-39, 1998.

Almeida J, Duarte JO, Oliveira LA, Crestani CC. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. *Stress* 18,462-474, 2015.

Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:525-57, 2004.

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

Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J. Auton. Pharmacol.* 17, 303-309, 1997.



Beckerman MA, Van Kempen TA, Justice NJ, Milner TA, Glass MJ. 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* 239:120-32, 2013.

Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in the rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol*. 20; 415(3): 285-312, 1999.

Buchholz RA, Hubbard JW, Keeton TK, Nathan MA. Cardiovascular and neuroendocrine responses to behavioral stress after central or peripheral denervation in rats. *Brain Res*. 365, 360-364, 1986.

Busnardo C, Tavares RF, Resstel LB, Elias LL, Correa FM. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton. Neurosci*. 158, 51-57, 2010.

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

Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15(10): 6340-6350, 1995.

Chapleau MW, Cunningham JT, Sullivan MK, Watchel RE, Abboud FM. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension* 26:341-47, 1995.

Chen Y, Brunson KL, Muller MB, Cariaga W, Baram TZ. Immunocytochemical distribution of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 (CRF1)-like immunoreactivity in the mouse brain: light microscopy analysis using an antibody directed against the C-terminus. *J Comp Neurol* 420: 305-323, 2000.

Conti LH, Shannon MH, Murry JD, Printz MP. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides*. 35(2): 71-81, 2001.

Crestani CC, Alves FH, Gomes FV, Resstel LB, Correa FM, Herman JP. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr Neuropharmacol*, 11 (2), 141-59, 2013.

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

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

Crestani CC. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. *Front Physiol*, 7, 251, 2016.

Cruz FC, Duarte JO, Leão RM, Hummel LF, Planeta CS, Crestani CC. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. *Dev. Neurobiol.* 76, 34-46, 2016.

Cruz FC, Engi SA, Leão RM, Planeta CS, Crestani CC. Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. *J Psychopharmacol.* 26(10):1366-74, 2012.

Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol.* 322(1):1-20, 1993.

Dampney RA, Horiuchi K & McDowall, LM. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behavior. *Auton Neurosci*, 124 (1-2), 3-10, 2008.

Danese A, Mc Ewen BS. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load and age-related disease. *Physiol Behav* 106, 29-39, 2012.

Daubert DL, McCowan M, Erdos B, Scheuer DA. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. *J Physiol.* 590(Pt 19), 1881-4895, 2012.

Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35(1), 105-135, 2010.

de Olmos J, Beltamino CA, Alheid GF. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical and chemoarchitectonical survey. In Paxinos G, editor. The rat nervous system, third edition. Elsevier: Amsterdam, pp 509-603, 2004.

Dedic N, Chen A, Deussing JM. The CRF family of neuropeptides and their receptors- mediators of the central stress response. *Curr Mol Pharmacol.* 11(1):4-31, 2018.

Deussing JM, Chen A. The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. *Physiol Rev.* 1;98(4):2225-2286, 2018.

Dhabar SF. The power of positive stress – a complementary commentary. *Stress*, 22 (5), 526-529, 2019.

Dhabhar, F S. & McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behavior and Immunity*, 11, 286–306, 1997.

Dhabhar, FS. Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58, 193–210, 2014.

Dhabhar, FS. The short-term stress response – Mother nature's mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49, 175–192, 2018.

Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38(1-2), 192-246, 2001.

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

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

Drummond HÁ, Price MP, Welsh MJ, Abboud FM. A molecular component of the arterial baroreceptor mechanotransducer. *Neuron.* 21:1435-41, 1998.

Drummond HA, Welsh MJ, Abboud FM. ENaC subunits are molecular components of the arterial baroreceptor complex. *Ann N Y Acad Sci*; 940:42-7, 2001.

Duarte JO, Cruz FC, Leao RM, Planeta CS, Crestani CC. Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. *Psychosom Med* 77, 186-199, 2015.

Erb S, Stewart J. A role for the bed nucleus of the 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.

Gao HR, Gao HY. Cardiovascular functions of central corticotropin-releasing factor related peptides system. *Neuropeptides* 20. Pii S0143-4179(18)30176-8, 2019.

Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin-releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*. 299:355–357, 1982.

Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Facchini A, Ilardo V, Mancia G. Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. *J Hypertens*.22:1747-53, 2004

Grassi G, Trevano FQ, Seravalle G, Scopelliti F, Mancia G. Baroreflex function in hypertension:consequences for antihypertensive therapy. *Prog Cardiovasc Dis*.;48:407-15, 2006.

Grippo AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom Med*., v.70, n.4, p.435-43, 2008.

Guynet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, 7 (5), 335-46, 2006.

Hadley ME, Haskell-Luevano. The proopiomelanocortin system. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 1-21, 1999.

Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 55(1): 21-6, 2003.

Henckens MJ, Deussing JM, Chen A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat Rev Neurosci*. 17(10):636-51, 2016.

Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*, 6 (2), 603-21, 2016.

Honzíková N, Fiser B. Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. *Physiol. Res.* 58,605-612, 2009.

Irigoyen, MC, Krieger EM. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.9, p.1213-20. 1998.

Iwata J, LeDOux JE. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behav Neurosci* 102,66-76, 1988.

Kraus JM. Structure of rat aortic baroreceptors and their relationship to connective tissues. *J Neurocytol.* 8:401-14, 1979.

Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW. 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, 2002.

McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch. Intern. Med.* 153,2093-2101, 1993.

McEwen BS. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, 22 (2), 108-24, 2000.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338,171-179, 1998.

McKlveen JM, Myers B, Herman JP. The medial pre-frontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to stress. *J Neuroendocrinol.* 27(6):446-56, 2015.

Nijssen MJ, Croiset G, Diamant M, Stam R, Delsing D, de Wied D, Wiegant VM. Conditioned fear-induced tachycardia in the rat: vagal involvement. *Eur J Pharmacol*, 350 (2-3), 211-22, 1998.

Norman RAJ, Coleman TG, Dent AC. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. *Hypertension* 3, 119-125, 1981.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). The top 10 causes of death. Disponível em: <[http:// https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death)>. Acesso em 09 de outubro de 2019.

Paton JF, Boscan P, Pickering AE, Nalivaiko E. The yin and yang of cardiac autonomic control: vago-sympathetic interactions revisited. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 555-565, 2005.

Phelix CF, Paull WK. Demonstration of distinct corticotrophin 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, 1990.

Pilowsky PM, Goodchild AK. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *J Hypertens.* 20:1675-88, 2002.

Porter JP, Phillips A, Rich J, Wright D. Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. *Life Sci.* 75,1595-1607, 2004.

Potts PD, Polson JW, Hirooka Y, Dampney RA. Effects of sinoaortic denervation on Fos expression in the brain evoked by hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience*, 77(2), 503-520, 1997.

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

Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K. Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res* 382(2): 213-238, 1986.

Sévoz-Couche C, Brouillard C, Camus F, Laude D, De Boer SF, Becker C, Benoliel JJ. Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarius in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *J Physiol*, 591 (7), 1871-87, 2013.

Sgoifo A, Koolhaas JM, Musso E, De Boer SF. Different sympathovagal modulation of heart rate during social and nonsocial stress episodes in wild-type rats. *Physiol Behav* 67,733-738, 1999.

Silberman Y, Matthews RT, Winder DG. 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):950-60, 2013.

Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol.* 50:427–440, 1988.

Sterling P, Eyer P. “Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology”, in *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, eds, S. Fisher and J. Reason (New York, NY: John Wiley & Sons), 629-649, 1988.

Sterling P. Allostasis: a model of predictive regulation. *Physiol. Behav.* 106, 5-15, 2012.

Sved AF, Gordon FJ. Amino acids as central neurotransmitter in the baroreceptor reflex pathway. *News. Physiol. Sci.* 9, 243-246, 1994.

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3), 165-186, 1983.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 10(6):397-409, 2009.

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 den Buuse M, Van Arcker SA, Fluttert M, De Kloet ER. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. *Psychophysiology* 38, 490-499, 2001.

Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51(1), 32-58, 2004.

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

Xie F, Sun L, Su X, Wang Y, Liu J, Zhang R, Wang N, Zhao J, Ban T, Bi H, Ai J. Neuropeptide Y reverses chronic stress-induced baroreflex hypersensitivity in rats. *Cell Physiol Biochem*, 29 (3-4), 463-74, 2012.

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

# *Capítulo 1*



*O Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas respostas cardíacas do barorreflexo*

## 1. INTRODUÇÃO

Como mencionado anteriormente, o barorreflexo é um mecanismo importante de regulação momento-a-momento da pressão arterial (DAMPNEY et al., 1994). Foi demonstrado que aumentos ou reduções sustentadas da pressão arterial causadas pela infusão intravenosa de agentes vasoativos aumentaram a expressão da proteína fos (marcador de ativação neuronal) no NLET (LI & DAMPNEY, 1994; POTTS et al., 1997), e esses efeitos foram abolidos após a desnervação dos barorreceptores (POTTS et al., 1997). Nesse sentido, foi reportado que o bloqueio sináptico não-seletivo do NLET através do tratamento local com  $\text{CoCl}_2$  aumentou a resposta bradicárdica causada por aumentos da pressão arterial (CRESTANI et al., 2006; NASIMI & HATAM, 2011), porém sem interferir com a resposta de taquicardia observada durante redução da pressão arterial (CRESTANI et al., 2006). Esses resultados indicaram uma influência inibitória do NLET na resposta bradicárdica do barorreflexo.

Estudos prévios do nosso grupo reportaram que o tratamento local do NLET com antagonistas de receptores glutamatérgicos ou noradrenérgicos mimetizaram os efeitos sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo observados após o bloqueio sináptico não-seletivo local (CRESTANI et al., 2008; ALVES et al., 2009), o que indica um envolvimento desses mecanismos neuroquímicos locais na influência inibitória do NLET sobre a resposta bradicárdica do barorreflexo. No entanto, apesar das evidências de uma interação entre os mecanismos noradrenérgicos, glutamatérgicos e CRFérgicos no NLET (NOBIS et al., 2011; SILBERMAN et al., 2013; SILBERMAN & WINDER, 2013), um possível envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas respostas do barorreflexo nunca foi investigado.

Foi demonstrado que injeções intracerebroventriculares de CRF reduziram a resposta da atividade do barorreflexo (FISHER, 1988; TURNBULL et al., 1993), sugerindo o envolvimento da neurotransmissão CRF na modulação das respostas do barorreflexo. Apesar disso, os sítios específicos no sistema

nervoso central onde a neurotransmissão CRFérgica age para controlar a função do barorreflexo ainda são desconhecidos. Diante disso, a nossa hipótese é de que a ativação de receptores CRFérgicos no NLET durante alterações na pressão arterial module as respostas cardíacas do barorreflexo.

## 2. OBJETIVO

Investigar o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas respostas cardíacas do barorreflexo.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal entre 230-250g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP) e foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais tiveram livre acesso a ração granulada e água e foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro). Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP, sob o protocolo 34/2015.

### 3.2. Implantes de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/kg (i.p.). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoeling, EUA), e foi realizada a assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para a redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3ml de solução 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 realizada

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 referência para as coordenadas, que foram: ântero-posterior: +8,6 mm a partir da interaural; lateral: +4 mm a partir do bregma; Vertical: -5,8 mm em relação ao osso e 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) com 13mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerizável (Simples, DFL, Ind.Com., Rio de Janeiro, RJ) e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana para fixação da resina. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam 0,2 ml de pentabiótico veterinário (Fountoura- 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. Cirurgia de canulação da artéria e veia femoral**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.) e em seguida ocorreu o implante de um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares e outro na veia femoral para infusão de fármacos. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13cm) (Clay Adams, Parsippany, 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 a implantação, os cateteres foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por meio de sutura cirúrgica. Como medida profilática após a cirurgia, os animais receberam 0,3 ml do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil) pela via subcutânea. Os animais permaneceram em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

### **3.4. Registro de pressão arterial 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. 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, ML 866, 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. Drogas e soluções**

O CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>) (Tocris, EUA), a antisauvagine-30 (antagonista seletivo dos receptores CRF<sub>2</sub>) (Tocris, EUA), o tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA), o cloridrato de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoreceptores  $\alpha_1$ ) (Sigma-Aldrich, EUA), o nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) (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, Brasil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

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

As agulhas injetoras (33G, Small Parts, EUA) utilizadas para a microinjeção das drogas no NLET foram um mm mais longo do que as cânulas guias fixadas ao crânio, e conectadas a uma seringa de 2  $\mu$ l (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100nl (ALVES et al., 2009; CRESTANI, et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015).

### **3.7. Avaliação da atividade do barorreflexo**

A atividade do barorreflexo foi avaliada através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoreceptores  $\alpha_1$ ) (50 $\mu$ g/ml/kg a 0,34 ml/min) e de nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) (70 $\mu$ g/ml/kg a 0,8ml/min), utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI et al., 2006, ENGI et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2017). A fenilefrina e o nitroprussiato de sódio causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente.

A análise foi feita relacionando a variação da PAM (a cada 5 mmHg de variação) com a variação reflexa correspondente da FC. Foram traçadas curvas sigmóides utilizando os pontos obtidos na correlação da pressão arterial e frequência cardíaca durante as infusões de fenilefrina e nitroprussiato de sódio como descrito na literatura (HEAD & MCCARTY, 1987; CRESTANI et al., 2010). A avaliação da curva sigmoide foi feita com base em cinco parâmetros, que foram: 1- platô mínimo de frequência cardíaca ( $P_1$ , bpm); 2- platô máximo de frequência cardíaca ( $P_2$ , bpm); 3- variação da FC ( $\Delta P$ , bpm, diferença entre  $P_1$  e  $P_2$ ); 4- pressão arterial média ( $PA_{50}$ , mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e 5- ganho (G, bpm/mmHg, inclinação da porção linear da curva) (HEAD & MCCARTY 1987; CRESTANI et al., 2010). Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para a análise individual da atividade barorreflexa durante o aumento e redução da pressão arterial (CRESTANI et al., 2006, 2010).

### **3.8. Determinação dos sítios de injeção no NLET**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e 100 nl do corante azul de Evans (1%) foram microinjetados bilateralmente para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros foram removidos, pós-fixados e seccionados em cortes frontais de 40  $\mu$ m de espessura com auxílio de um criostato (CM1900, Leica, Alemanha) para a análise dos sítios de injeção. Somente animais em que

os sítios de injeção atingiram bilateralmente o NLET foram incluídos nos grupos experimentais.

#### **4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Esse estudo objetivou investigar o envolvimento da ativação dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nas respostas cardíacas do barorreflexo. Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET e mantidos em recuperação por 4 dias. O experimento foi realizado 24 horas após a cirurgia de implantação de cateteres na artéria e veia femoral, que foram utilizados para registro dos parâmetros cardiovasculares e infusão de fármacos, respectivamente.

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, como som e iluminação. Após esse período, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e FC. Em seguida, foram realizadas infusões intravenosas alternadas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio para determinação dos valores controle da atividade do barorreflexo. Então, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de veículo (salina, 100nl, n=6), CP376395 (5nmol/100nl, n=7) (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>) ou antisauvagine-30 (5nmol/100nl, n=6) (antagonista seletivo dos receptores CRF<sub>2</sub>). As doses dos antagonistas foram baseadas em estudos anteriores do nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2015). Dez minutos após o tratamento farmacológico do NLET, foram realizadas novas infusões alternadas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio para determinação da atividade barorreflexa (i.e, tanto infusão de fenilefrina/ nitroprussiato de sódio ou nitroprussiato de sódio/ fenilefrina).

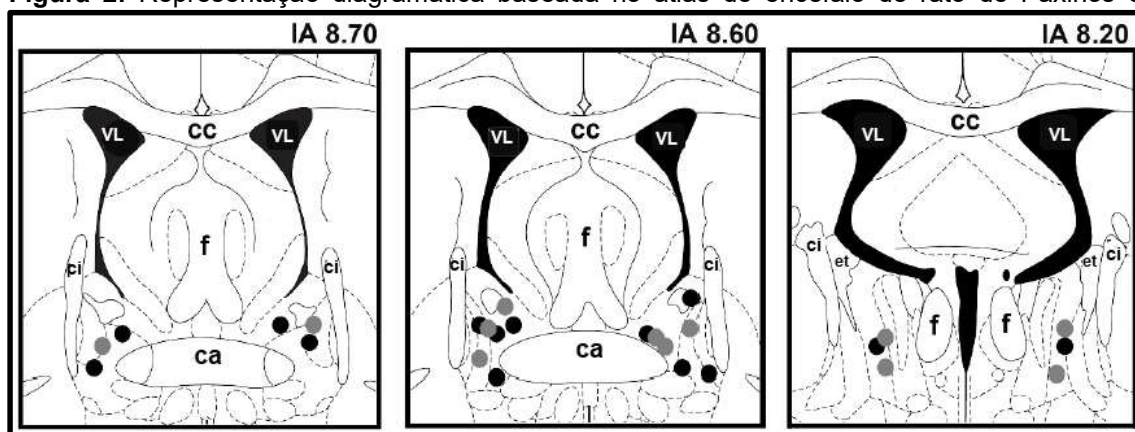
## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média e erro padrão da média (EPM). Os valores basais de PAM e FC, bem como os parâmetros das curvas do barorreflexo antes e após o tratamento farmacológico no NLET, foram comparados utilizando o teste-*t* de *Student*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS

A representação diagramática ilustrando a microinjeção bilateral no NLET de CP376395, antisauvagine-30 e salina no NLET é apresentada na Figura 2.

**Figura 2:** Representação diagramática baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e



Watson (1997), indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET do antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$ , CP376395 (círculos pretos) e o antagonismo seletivo de receptor  $CRF_2$ , antisauvagine-30 (círculos cinza). IA: coordenada interaural; ac: comissura anterior; cc: corpo caloso; et: estria terminal; f: fórnix; ic: cápsula interna; VL: ventrículo lateral.

### 6.1. Efeitos do tratamento do NLET com CP376395 na atividade do barorreflexo em ratos não-anestesiados.

A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor  $CRF_1$ , CP376395 (5nmol/100nL) ( $n=7$ ), no NLET não alterou os valores basais de PAM ( $107 \pm 3$  vs  $106 \pm 2$  mmHg;  $t=0,02$ ;  $p > 0,05$ ) e FC ( $411 \pm 11$  vs  $410 \pm 12$  bpm;  $t=0,02$ ;  $p > 0,05$ ). Entretanto, as análises de regressão não-linear e linear da função do barorreflexo indicaram que o tratamento farmacológico no NLET com CP376395

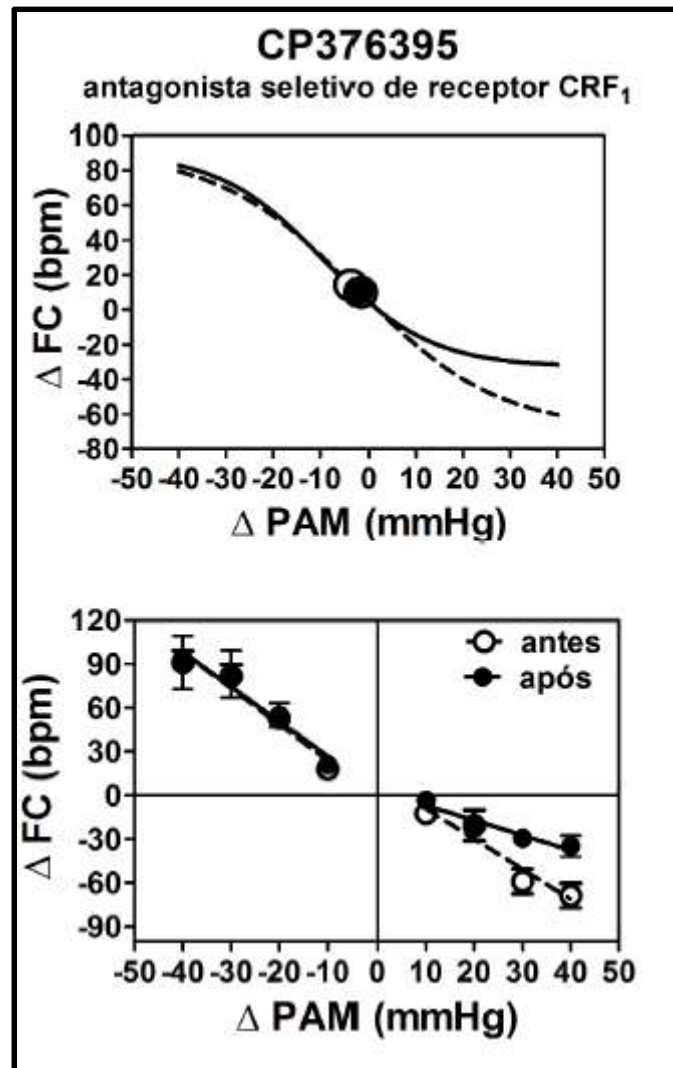
afetou as respostas do barorreflexo (Figura 3; Tabela 1). As análises das curvas sigmóides indicaram que o tratamento do NLET com CP376395 reduziu o platô inferior ( $P_1$ ) da curva, porém sem alterar os outros parâmetros analisados (Figura 3, gráfico superior; Tabela 1).

Para uma análise mais detalhada sobre a sensibilidade do barorreflexo, a FC reflexa durante aumento ou diminuição da PAM foi avaliada individualmente através da análise de regressão linear. A análise individual das respostas reflexas da FC durante aumento ou queda da PAM utilizando a análise regressão linear (Figura 3, gráfico inferior) indicou que a inclinação da curva para queda da FC durante aumento da PAM foi reduzida após a microinjeção de CP376395 no NLET, quando comparado com os valores obtidos antes do tratamento farmacológico ( $-1,0 \pm 0,2$  vs  $-2,1 \pm 0,3$  bpm/mmHg;  $t=3$ ,  $p<0,01$ ) (Figura 3, gráfico inferior). A inclinação da curva de regressão linear para a resposta de taquicardia provocada por queda da PAM não foi afetada pelo antagonismo do receptor  $CRF_1$  no NLET ( $-2,3 \pm 0,4$  vs  $-2,5 \pm 0,2$  bpm/mmHg;  $t=0,4$ ,  $p>0,05$ ) (Figura 3, gráfico inferior) .



Tratamento	Momento	G (bpm/mmHg)	P <sub>1</sub> (bpm)	P <sub>2</sub> (bpm)	ΔP (bpm)	PA <sub>50</sub> (mmHg)
<u>Salina</u>	Antes	-1,8±0,2	-69±8	91±8	159±8	-3±3
	Após	-1,8±0,06	-85±27	76±15	161±32	2±2
		t=0 p>0,05	t=0,7 p>0,05	t=0,1 p>0,05	t=0,04 p>0,05	t=1 p>0,05
<u>CP376395</u>	Antes	-1,8±0,1	-69±8	91±8	159±7	-3±3
	Após	-1,7±0,1	<b>-34±7*</b>	90±18	130±15	-2±4
		t=0,7 p>0,05	t=3 p=0,0118	t=0,008 p>0,05	t=1,6 p>0,05	t=0,2 p>0,05
<u>Antisauvagine-30</u>	Antes	-2,2±0,2	-65±10	96±9	161±14	1±3
	Após	<b>-1,5±0,1*</b>	-60±7	<b>47±13*</b>	114±14	2±5
		t=3,0 <b>p=0,01</b>	t=0,3 p>0,05	t=3,0 <b>p=0,01</b>	t=2,1 p>0,05	t=0,1 p>0,05

**Tabela 1:** Parâmetros derivados das curvas sigmóides do barorreflexo geradas antes e após a microinjeção de salina (100nl; n=6), do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395 (n=7) ou de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, no NLET (n=6). Dados foram expressos como média±EPM, teste-t de *Student*.



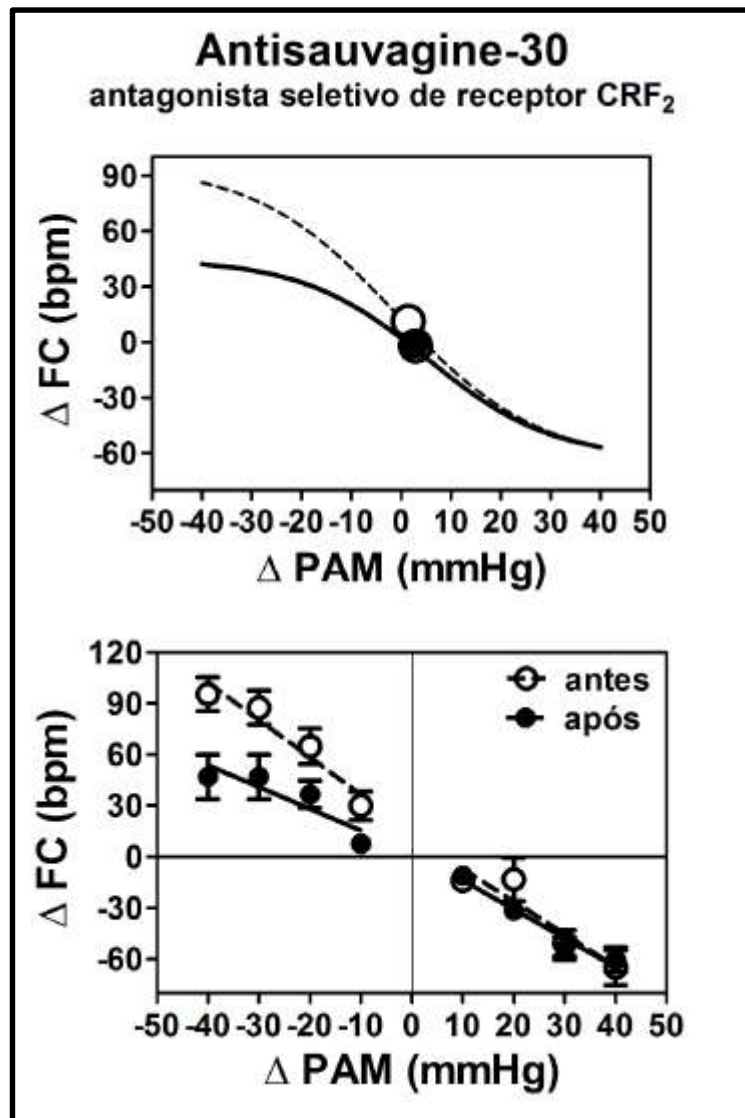
**Figura 3:** Análise de regressão não-linear (gráfico superior) e linear (gráfico inferior) da função do barorreflexo correlacionando alterações da PAM ( $\Delta$ PAM) e a resposta reflexa da FC ( $\Delta$ FC) antes (*valores  $r^2$* : sigmoide 0,89; regressão linear fenilefrina 0,60; regressão linear nitroprussiato de sódio 0,75) e após (*valores  $r^2$* : sigmoide 0,78, regressão linear fenilefrina 0,59, regressão linear nitroprussiato de sódio 0,51) o tratamento local no NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395 (n=7). Os símbolos na curva sigmoide (gráfico superior) indicam a BP50. Aumentos e quedas na PAM foram induzidos pela infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, respectivamente.

**6.2. Efeitos do tratamento do NLET com antisauvagine-30 na atividade do barorreflexo em ratos não-anestesiados.**

A microinjeção bilateral do antagonista seletivo de receptor  $CRF_2$  antisauvagine-30 (5nmol/100nl, n=6) no NLET não alterou os valores basais de PAM ( $100\pm 2$  vs  $98\pm 3$ mmHg,  $t=0,3$ ,  $p>0,05$ ) ou FC ( $349\pm 19$  vs  $380\pm 12$  bpm,  $t=1,4$ ,  $p>0,05$ ). Entretanto, a análise de regressão não-linear da atividade do barorreflexo indicou que o tratamento farmacológico do NLET com antisauvagine-30 afetou as respostas do barorreflexo (Figura 4, acima; Tabela 1). O tratamento com antisauvagine-30 reduziu o platô superior ( $P_2$ ) e o ganho (G), porém sem afetar os outros parâmetros analisados (Figura 4, acima, Tabela 1).

A análise individual das respostas reflexas da FC para aumento ou queda da PAM utilizando a análise de regressão linear indicou que a inclinação das curvas para a resposta taquicárdica provocada por queda da PAM ( $-1,2\pm 0,3$  vs  $-2,3\pm 0,4$  bpm/mmHg;  $t=2,2$ ;  $p>0,05$ ) e para a bradicardia provocada por aumento da PAM ( $-1,7\pm 0,2$  vs  $-1,9\pm 0,4$  bpm/mmHg;  $t=0,4$ ;  $p>0,05$ ) não foram significativamente afetadas pelo antagonismo dos receptores  $CRF_2$  no NLET (Figura 4, gráfico inferior).

A microinjeção de CP376395 ou antisauvagine-30 em estruturas ao redor do NLET (n=4), como a comissura anterior e a cápsula interna, não afetaram as respostas de bradicardia ( $-2,2\pm 0,4$  vs  $-2,6\pm 0,8$  bpm/mmHg;  $t=0,5$ ;  $P=0>0,05$ ) e de taquicardia ( $-2,0\pm 0,4$  vs  $-2,5\pm 0,08$  bpm/mmHg;  $t=0,6$ ;  $p>0,05$ ) do barorreflexo.



**Figura 4:** Análise de regressão não-linear (gráfico superior) e linear (gráfico inferior) da função do barorreflexo correlacionando alterações da PAM ( $\Delta PAM$ ) e a resposta reflexa da FC ( $\Delta FC$ ) antes (*valores  $r^2$* : sigmoide 0,86; regressão linear fenilefrina 0,50; regressão linear nitroprussiato de sódio 0,56) e após (*valores  $r^2$* : sigmoide 0,79, regressão linear fenilefrina 0,72, regressão linear nitroprussiato de sódio 0,41) o tratamento local no NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 (n=6). Os símbolos na curva sigmoide (gráfico superior) indicam a BP50. Aumentos e quedas na PAM foram induzidos pela infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, respectivamente

## **7. DISCUSSÃO**

Os resultados reportados neste capítulo constituem a primeira evidência de que a neurotransmissão CRFérgica do NLET modula as respostas do barorreflexo. Nós identificamos que a microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395, no NLET reduziu a resposta de bradicardia durante aumentos da pressão arterial sem afetar a taquicardia reflexa. Além disso, o tratamento farmacológico do NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, reduziu a resposta de taquicardia decorrente de quedas de pressão arterial sem afetar a bradicardia reflexa.

Estudos prévios demonstraram que a neurotransmissão mediada por CRF no encéfalo modula a atividade do barorreflexo. Por exemplo, a injeção intracerebroventricular de CRF reduziu as respostas de FC do barorreflexo (FISHER, 1988; 1989; TURNULL et al., 1993). Apesar desses achados, outros estudos não identificaram efeitos da injeção no encéfalo de antagonistas dos receptores CRFérgicos na atividade do barorreflexo (TURNBULL et al., 1993, CONTI et al., 2001, CHITRAVANSI & SAPRU, 2011), assim contrariando a ideia de que o CRF e peptídeos relacionados são liberados no encéfalo em resposta à ativação do barorreflexo. Embora um estudo tenha reportado que o barorreflexo pode modular os efeitos cardiovasculares da UCN1 no cérebro (CHITRAVANSI et al., 2013), um possível papel das urocortinas e do receptor CRF<sub>2</sub> nos circuitos do barorreflexo nunca foi avaliado. Portanto, os achados reportados no presente capítulo são os primeiros a fornecerem evidências de que a neurotransmissão CRFérgica é recrutada durante alterações na pressão arterial, e esse mecanismo neuroquímico está envolvido no processamento de respostas do barorreflexo.

A divisão anterior do NLET foi demonstrada como uma região crítica para o controle autônomo por esse núcleo (DONG et al., 2001; CRESTANI et al., 2013). Consistente com essa evidência, a maioria dos sítios das microinjeções no presente estudo atingiram a porção anterior do NLET. Tanto o receptor CRF<sub>1</sub> quanto o CRF<sub>2</sub> são expressos nas regiões rostrais do NLET (VAN PETT et al., 2000; DABROWSKA et al., 2011), dando suporte aos presentes achados. Além disso, terminais contendo CRF, bem como fibras imunorreativas para UCN1 e UCN3 foram identificados na divisão anterior do NLET (BITTERN COURT et al.,

1999; LI et al., 2002). Sabe-se que o CRF é o ligante endógeno do receptor CRF<sub>1</sub>, que a UCN1 possui afinidade similar aos dois receptores e que a UCN3 se liga seletivamente ao receptor CRF<sub>2</sub> (HAUGER et al., 2003). Juntas, essas evidências dão suporte aos presentes achados indicando o papel dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET no controle da função do barorreflexo.

Foi reportado anteriormente que a inibição aguda da neurotransmissão do NLET provocada por tratamento local com bloqueador sináptico não-seletivo CoCl<sub>2</sub> aumentou a resposta bradicárdica do barorreflexo em ratos não-anestesiados, porém sem afetar a resposta de FC desencadeada por quedas da pressão arterial (CRESTANI et al., 2006). Esse resultado indica uma influência inibitória do NLET nas respostas reflexas durante aumentos da pressão arterial (CRESTANI et al., 2016). Foi demonstrado que a microinjeção local do NLET de antagonista de adrenoceptores  $\alpha_1$  ou de antagonista do receptor glutamatérgico NMDA facilitou a resposta bradicárdica reflexa, o que sugeriu que a influência inibitória do NLET na atividade do barorreflexo é mediada pelas neurotransmissões glutamatérgicas e noradrenérgicas locais (CRESTANI et al., 2008; ALVES et al., 2009).

Uma interação entre as neurotransmissões CRFérgica, noradrenérgica e glutamatérgica no NLET foi reportada (SILBERMAN & WINDER, 2013). Por exemplo, a noradrenalina liberada no NLET resulta na ativação de neurônios locais contendo CRF (SILBERMAN et al., 2013), o que provavelmente elevaria os níveis locais de CRF. Por sua vez, os níveis elevados de CRF no NLET aumentam a atividade glutamatérgica, aumentando a excitação local (SILBERMAN et al 2013). Apesar das evidências de um papel inibitório das neurotransmissões glutamatérgicas e noradrenérgicas do NLET na bradicardia reflexa (CRESTANI et al., 2008; ALVES et al., 2009), é improvável que a influência excitatória da neurotransmissão CRFérgica do NLET na resposta de FC durante aumentos da PAM seja mediada pela interação com esses mecanismos neuroquímicos locais. Portanto, a liberação de CRF e seus peptídeos relacionados no NLET durante alterações da pressão arterial parecem ser mediadas por mecanismos locais independentes da neurotransmissão noradrenérgica local. Nesse sentido, além de fontes intrínsecas ao NLET, o CRF e as urocortinas também podem ser liberados de fontes extrínsecas, como terminais oriundos do núcleo central da amígdala (SAKANAKA et al., 1986;

BECKERMAN et al., 2013). De fato, foi demonstrado que a amígdala exerce um papel na modulação da resposta da FC à aumentos da pressão arterial (FORTALEZA et al., 2015). Além disso, a modulação da neurotransmissão CRFérgica do NLET na função do barorreflexo também parece ocorrer independentemente da facilitação da liberação local de glutamato. Do nosso conhecimento, o presente estudo fornece a primeira evidência de que o NLET modula a resposta reflexa da FC durante quedas da PAM.

A resposta bradicárdica do barorreflexo é mediada predominantemente por aumento na atividade parassimpática cardíaca, enquanto que a taquicardia reflexa é predominantemente devida à estimulação do tônus simpático para o coração (SULLEBARGER et al., 1990; CRESTANI et al., 2008; CRESTANI et al., 2010). Neurônios do NLET se projetam diretamente para estruturas bulbares envolvidas no controle da atividade autônoma, incluindo o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo e regiões ventrolaterais (GRAY & MAGNUSON, 1987; DONG & SWANSON, 2004). A evidência do papel específico dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no controle da bradicardia e taquicardia reflexas, respectivamente, sugere que vias neurais distintas mediam o controle pelo NLET das respostas da FC durante aumentos e quedas da pressão arterial. Essa ideia é também suportada por evidências prévias de que os adrenoceptores  $\alpha_1$  (simpato-inibição e parassimpato-excitação) e  $\alpha_2$  (simpato-excitação) controlam diferentemente as atividades simpáticas e parassimpáticas durante o estresse e o exercício físico (CRESTANI et al., 2009; ALVES et al., 2011). Portanto, o papel facilitatório do receptor CRF<sub>1</sub> no NLET na resposta bradicárdica do barorreflexo é possivelmente mediado por ativação de vias excitatórias para neurônios parassimpáticos bulbares, enquanto que vias excitatórias para neurônios simpáticos podem estar relacionados com a influência facilitatória de receptores CRF<sub>2</sub> locais na resposta taquicárdica do barorreflexo. Entretanto, estudos futuros são necessários para elucidar os circuitos neurais envolvidos no controle das respostas do barorreflexo pela neurotransmissão CRFérgica no NLET.

Estudos prévios demonstraram o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET no controle das respostas cardiovasculares durante eventos aversivos. Por exemplo, NIJSEN e colaboradores (2001) reportaram que o tratamento do NLET com antagonista não-seletivo de receptores CRFérgicos aumentou a resposta da FC durante o medo condicionado ao contexto. De modo

inverso, OLIVEIRA e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento do NLET com antagonistas seletivos dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> reduziu as respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição (estímulo aversivo não-condicionado). Esses resultados indicaram que o papel da neurotransmissão CRFérgica no NLET no controle das respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse dependem do paradigma de estresse empregado (i.e., condicionado *versus* inato) (CRESTANI et al., 2013).

Relevante para o presente estudo são também as evidências de que as respostas cardiovasculares durante situações de estresse são acompanhadas por deslocamento das curvas do barorreflexo para valores de pressão arterial maiores (DAMPNEY et al., 2008; CRESTANI et al., 2010; CRESTANI, 2016), indicando a ativação de vias cerebrais que inibem o processamento bulbar das informações barorreflexo. Foi proposto que a modulação da função do barorreflexo contribui para as respostas autônomas e cardiovasculares provocadas pelo estresse (DAMPNEY et al., 2008; CRESTANI et al., 2010; DOS REIS et al., 2014; CRESTANI, 2016). Portanto, o papel facilitatório da neurotransmissão CRFérgica do NLET no controle da função do barorreflexo documentada no presente estudo pode ser um mecanismo envolvido na influência inibitória desse mecanismo neuroquímico na resposta de taquicardia desencadeada por estímulos aversivos condicionados (NIJSEN et al., 2001). Entretanto, a ativação de vias relacionados com efeitos reportados no presente estudo podem se opor à influência excitatória da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas respostas cardiovasculares provocadas por estressores não-condicionados (OLIVEIRA et al., 2015). De qualquer modo, mais estudos são necessários para esclarecer a possível relação dos achados reportados no presente estudo com a modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão CRFérgica do NLET.

## 8. CONCLUSÃO

O presente capítulo fornece evidências de que a neurotransmissão CRFérgica do NLET modula as respostas cardíacas do barorreflexo. Entretanto, o controle das respostas reflexas de FC durante aumentos e quedas da pressão arterial são mediados por receptores CRFérgicos específicos. De fato, esses



resultados indicam que o receptor CRF<sub>1</sub> do NLET exerce uma influência facilitatória na resposta bradicárdica do barorreflexo, enquanto os receptores CRF<sub>2</sub> facilitam a taquicardia reflexa.

## **9. REFERÊNCIAS**

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

Alves FH, Resstel LB, Correa FM, Crestani CC. Bed nucleus of the stria terminalis alpha1- and alpha 2-adrenoceptors differentially modulate the cardiovascular responses to exercise in rats. *Neuroscience*, 177, 74-83, 2011.

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

Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW & Sawchenko PE. 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, 285-312, 1999.

Chitravanshi VC & Sapru HN. Microinjection of urocortin 1 into the nucleus ambiguus of the rat elicits bradycardia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, H2231-229, 2011.

Chitravanshi VC, Kaebe K & Sapru HN. Mechanisms of cardiovascular actions of urocortins in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305, H182-191, 2013.

Conti LH, Shannon MH, Murry KD & Printz MP. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides*, 35, 78-81, 2001.

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

Crestani CC, Alves FH, Resstel LB & Correa FM. Bed nucleus of the stria terminalis alpha(1)-adrenoceptor modulates baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *Brain Res*, 1245, 108-155, 2008.

Crestani CC, Alves FH, Resstel LB & Correa FM. The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. *Neuroreport*, 17, 1531-1535, 2006.

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

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

Crestani CC. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. *Front Physiol*, 7, 251, 2016.

Dabrowska J, Hazra R, Ahern TH, Guo JD, McDonald AJ, Mascagni H, Muller JF, Young LJ & Rainnie DG. Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotrophin-releasing factor and oxytocin systems in the balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 1312-1326, 2011.

Dampney RA, Horiuchi K & McDowall, LM. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behavior. *Auton Neurosci*, 124, 3-10, 2008.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74(2), 323-364, 1994.

Dong HW & Swanson LW. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nucleus of stria terminalis. *J Comp Neurol*, 468, 277-298, 2004.

Dong HW, Petrovich GD & Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nucleus of stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev*, 38, 192-246, 2001.

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

Engi SA, Cruz FC, Leão RM, Corrêa FM, Planeta CS, Crestani CC. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on

cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 59(3):231-40,2012.

Fisher LA. Central autonomic modulation of cardiac baroreflex by corticotropin-releasing factor. *Am J Physiol*, 256, H949-955, 1989.

Fisher LA. Corticotropin-releasing factor: central nervous system effects on baroreflex control of the heart rate. *Life Sci*, 42, 2645-2649, 1988.

Fortaleza EA, Ferreira-Junior NC, Lagatta DC, Resstel LB & Correa FM. The medial amygdaloid nucleus modulates baroreflex activity in conscious rats. *Auton Neurosci*, 193, 44-50, 2015.

Gray TS & Magnuson DJ. 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, 365-374, 1987.

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

Head, GA & McCarty R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Auton Nerv Syst*, 21, 203-213, 1987.

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

Li YW & Dampney RA. Expression of fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience*, 61,613-634, 1994.

Nasimi A & Hatam M. 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, 2011.

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

Nobis WP, Kash TL, Silberman Y, Winder DG. B-Adrenergic receptors enhance excitatory transmission in the bed nucleus of the stria terminalis through

a corticotrophin-releasing factor receptor-dependent and cocaine-regulated mechanism. *Biol Psychiatry*. 69(11):1083-90,2011.

Oliveira LA, Almeida J, Benini R & Crestani CC. CRF1 and CRF2 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, 2015.

Oliveira LA, Almeida J, Gomes-de-Souza L, Benini R, Crestani CC. CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors in the bed nucleus of stria terminalis differently modulate the baroreflex function in unanesthetized rats. *Eur J Neurosci* 42(2):1805-1812, 2017.

Paxinos G & Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney, Australia, 1997.

Potts PD, Polson JW, Hirooka, Y & Dampney RA. Effects of sinoaortic denervation on fos expression in the brain evoked by hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience*, 77, 503-520, 1997.

Sakanaka M, Shibasaki T & Lederis K. Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res*, 382, 213-238, 1986.

Silberman Y & Winder DG. 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, 2013.

Silberman Y, Matthews RT & Winder DG. A corticotropin releasing factor pathway for ethanol regulation of the ventral tegmental area in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci*, 33, 950-960, 2013.

Sullebarger JT, Liang CS, Woolf PD, Willick AE & Richeson JF. Comparison of phenylephrine bolus and infusion methods in baroreflex measurements. *J Appl Physiol* (1985), 69, 962-967, 1990.

Turnbull AV, Kirkman E, Rothwell NJ & Little RA. The neuropeptide CRF is involved in the modulation of the baroreflex during hindlimb ischaemia in the anaesthetized rat. *J Physiol*, 468, 529-541, 1993.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W & Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*, 482, 191-212, 2000.

## *Capítulo 2*

O controle das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET é mediado pela sinalização receptor NMDA/nNOS/guanilato ciclase solúvel/proteína quinase G

## 1. INTRODUÇÃO

A participação da neurotransmissão CRFérgica do NLET no controle da função cardiovascular ainda é pouco compreendido (CRESTANI et al., 2013). Nijsen e colaboradores (2001) reportaram que a administração de CRF no NLET aumentou a frequência cardíaca basal de ratos (NIJSEN et al., 2001). Foi ainda demonstrado no mesmo estudo que o tratamento local do NLET com um antagonista não-seletivo de receptores CRFérgicos facilitou a resposta taquicárdica observada no teste de medo condicionado ao contexto (NIJSEN et al., 2001). Dados recentes do nosso grupo demonstraram que a microinjeção no NLET de um antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub> reduziu, de maneira dose-dependente, a resposta de elevação da pressão arterial e frequência cardíaca induzidas pelo estresse por restrição agudo; ao passo que o tratamento bilateral do NLET com um antagonista seletivo de receptores CRF<sub>2</sub> reduziu a resposta de elevação da pressão arterial e a queda da temperatura cutânea induzidas pelo mesmo estressor, porém sem afetar a resposta taquicárdica (OLIVEIRA et al., 2015). Esses resultados forneceram evidências de uma ação sinérgica dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> do NLET na geração das respostas cardiovasculares durante a exposição a sessões agudas de estresse.

Estudos prévios reportaram uma interação entre as neurotransmissões CRFérgica e glutamatérgica no NLET (*para revisão ver* SILBERMAN & WINDER, 2013). Nesse sentido, estudos de eletrofisiologia demonstraram que o CRF e a UCN1 aumentaram a frequência, porém não a amplitude, de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (do inglês, EPSC) em neurônios do NLET (KASH et al., 2008; SILBERMAN et al., 2013). Os efeitos do CRF foram inibidos pelo tratamento com um antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>, porém não com um antagonista do receptor CRF<sub>2</sub> (KASH et al., 2008; SILBERMAN et al., 2013). Esses resultados sugerem que o CRF e a UCN1 facilitam a liberação local de

glutamato no NLET através da ativação de receptores CRF<sub>1</sub> localizados em terminais pré-sinápticos (SILBERMAN & WINDER, 2013).

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>. Desse modo, uma das formas de síntese de NO no sistema nervoso central envolve a ativação de receptores NMDA e consequente aumento nas concentrações intracelulares de Ca<sup>+2</sup>, o que acarreta a ativação da isoforma neuronal da enzima sintase do NO (nNOS) (GARTHWAITE, 2008). O NO possui diversas vias de sinalização, sendo que a principal envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (GARTHWAITE, 2008). Apesar do relato de outras vias de sinalização (RYBALKIN et al., 2004; CRAVEN & ZAGOTTA, 2006), a ativação da proteína quinase G (PKG) é um importante mecanismo efetor do GMPc (HOFMANN et al., 2006; GARTHWAITE, 2008).

Uma possível interação da neurotransmissão CRFérgica no NLET com mecanismos de sinalização nitrérgica locais nunca foi investigada. No entanto, considerando as evidências de formação de NO a partir da ativação de receptores glutamatérgicos NMDA, é possível que a ação facilitatória da ativação de receptores CRF<sub>1</sub> sobre a neurotransmissão glutamatérgica no NLET também facilite mecanismos nitrérgicos locais. Estudos têm demonstrado um envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e da sinalização nitrérgica do NLET na modulação da função cardiovascular (*para revisão ver* CRESTANI et al., 2013). Além disso, nós observamos que a microinjeção de antagonistas de receptores glutamatérgicos e de inibidores da sinalização nitrérgica no NLET afetaram as respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse por restrição agudo (ADAMI et al., 2017; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018). No entanto, uma possível interação da neurotransmissão CRFérgica do NLET com mecanismos glutamatérgicos e nitrérgicos locais na regulação da função cardiovascular nunca foi investigada. Desse modo, considerando as evidências de um envolvimento do receptor CRF<sub>1</sub> no NLET nas respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo (OLIVEIRA et al., 2015), a hipótese testada

nesse estudo foi a de que o controle das respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda de estresse pelo CRF no NLET seja dependente da neurotransmissão glutamatérgica local, atuando via receptores NMDA e dependente da formação de NO e da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e da proteína quinase G.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o envolvimento da via de sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG no controle das respostas cardiovasculares a um estressor agudo pelo receptor CRF<sub>1</sub> do NLET.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Como descrito no item 3.1, Capítulo 1.

### **3.2. Implantes de cânulas bilaterais no NLET**

Como descrito no item 3.2, Capítulo 1.

### **3.3. Cirurgia de canulação da artéria femoral**

Como descrito no item 3.3, Capítulo 1, porém apenas a artéria femoral foi canulada para registro da PAM e FC.

### **3.4. Registro de pressão arterial e frequência cardíaca**

Como descrito no item 3.4, Capítulo 1.



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

O registro da temperatura cutânea foi feito com a utilização de um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi realizada através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada como variações de intensidade de cor (VIANNA & CARRIVE,2005; BUSNARDO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Para a análise das imagens, a medida da 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 e soluções**

O fator liberador de corticotropina (CRF) (agonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>) (Sigma-Aldrich, EUA), o LY235959 (antagonista seletivo de receptor glutamatérgico NMDA) (Tocris, EUA), o N $\omega$ -propil-arginina (NPLA) (inibidor seletivo da nNOS), o tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). O ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel-GCs) (Tocris, EUA) e o KT5823 (inibidor da proteína quinase G-PKG) foram diluídos em DMSO (DMSO 20%). O pentabiótico (Fontoura-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine ®, Schering Plough, Brasil) foram diluídos conforme orientação do fabricante.

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

Como descrito no item 3.6, Capítulo 1.

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

O estresse por restrição agudo consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5cm, comprimento = 15 cm, ventilados por orifícios 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.,2008; OLIVEIRA et al., 2015). Cada animal foi

submetido a uma única sessão de restrição para evitar habituação (BENINI et al., 2019).

### **3.9. Determinação dos sítios de injeção**

Como descrito no item 3.8, Capítulo 1.

### **3.10. Medidas dos metabólitos de NO**

#### **3.10.1. Microdissecção do NLET**

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.

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

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>) (Sigma-Aldrich, EUA), e corrigidos em função da quantidade de proteínas totais presente na amostra. O conteúdo total de proteínas foi determinado utilizando um kit Bio-Rad® (DC® protein assay). Todas as medidas foram realizadas em duplicata, e os resultados foram expressos como µM NO<sub>x</sub>/µg proteína.

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

##### **4.1. Efeito da microinjeção de CRF no NLET sobre os níveis de NO<sub>x</sub> durante o estresse por restrição agudo**

Esse protocolo teve o objetivo de investigar se o CRF ativa o mecanismo de sinalização receptor NMDA/NO no NLET durante o estresse por restrição agudo, resultando no aumento na formação local de NO. Para tanto, os animais foram tratados com veículo (salina, 100nL) ou CRF (0,07nmol/100nL), e 5 minutos após foram submetidos a uma sessão de 30 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°C para futuro processamento. O NLET de todos os animais foi coletado por microdissecção para quantificação dos níveis de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> (NO<sub>x</sub>), que foi utilizado como uma medida indireta de produção local de NO (ver item 3.10, Capítulo 2).

##### **4.2. Avaliação da interação entre o CRF e as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica no NLET no controle das respostas autônomas ao estresse por restrição agudo**

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento do mecanismo de sinalização receptor NMDA/NO/GMPc/PKG no NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição agudo mediado pelo receptor CRF<sub>1</sub> local. Para tanto, todos os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET, e foram posteriormente mantidos em recuperação por no mínimo 3 dias.

Após a recuperação, os animais foram submetidos à cirurgia para a implantação de cânula na artéria femoral, e posteriormente alojados em caixas individuais. Os experimentos foram realizados 24 horas após a cirurgia de canulação da artéria femoral. No dia do experimento, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de 30 minutos foi realizado para a determinação dos valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Após esse período, os animais foram tratados 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, 0,1 nmol/100nl) no NLET (CHAN et al., 2005; ALVES et al., 2009; BUSNARDO et al., 2010a). Cinco minutos após, foi microinjetado veículo (salina, 100nL) ou CRF (0,07nmol/100nL) no NLET (OLIVEIRA et al., 2015). Cinco minutos após o segundo tratamento farmacológico do NLET, os animais foram expostos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição agudo (OLIVEIRA et al., 2015).

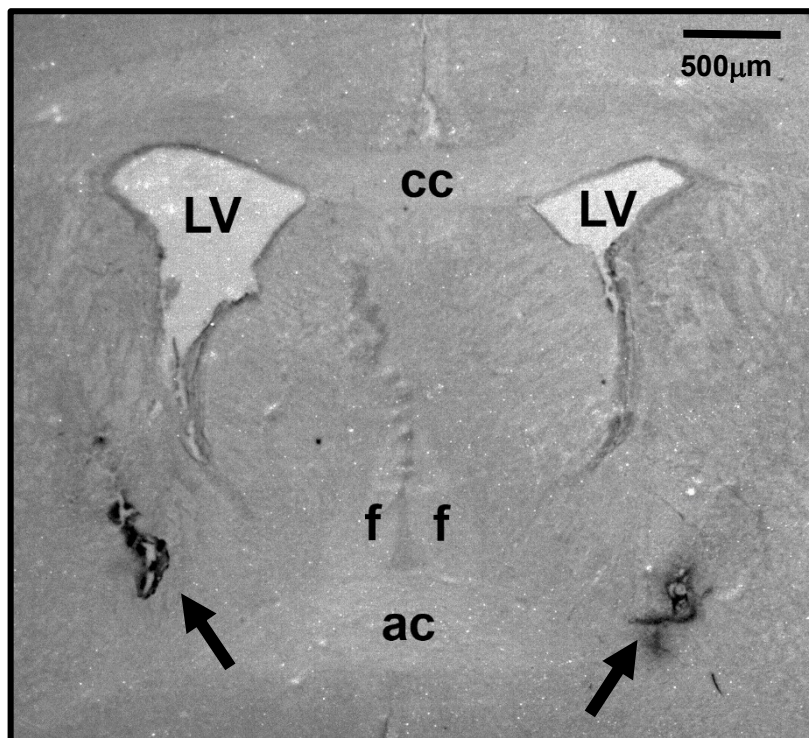
O registro de PAM e FC iniciou-se ao menos 30 minutos antes do estresse de restrição, e foi realizado durante todo o período de estresse. A temperatura cutânea da cauda foi medida nos tempos 10, 5 e 0 minutos antes do estresse para avaliação dos valores basais, e a cada 5 minutos durante a sessão de estresse.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os níveis de NOx no NLET foram comparados utilizando o teste *t* de Student. 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 significantes.

## 6. RESULTADOS

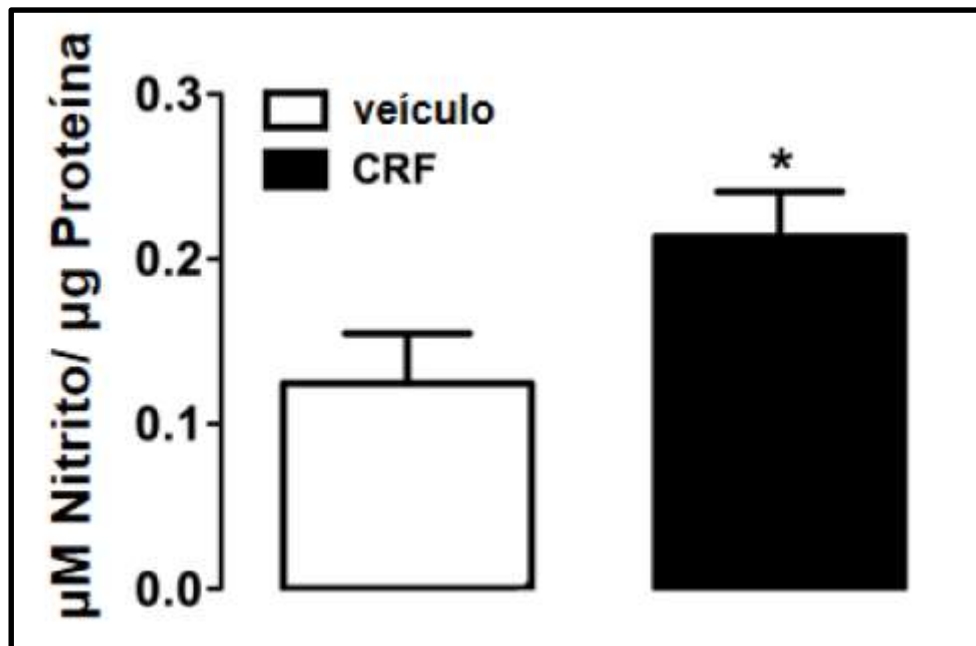
A figura 5 mostra uma fotomicrografia de um corte histológico coronal ilustrando o sítio de injeção no NLET de um animal representativo.



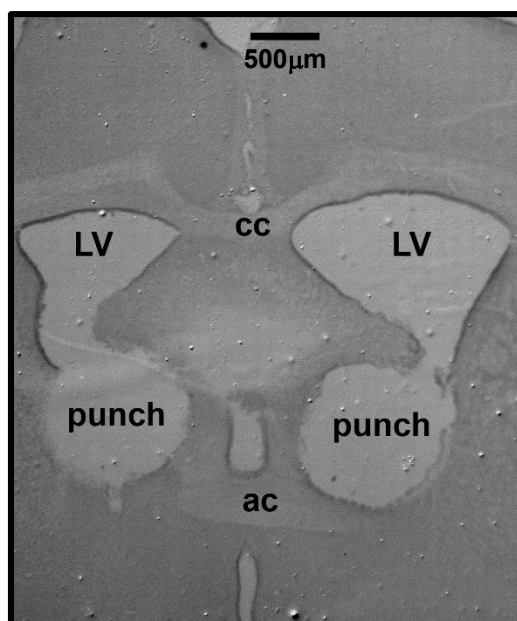
**Figura 5:** Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro representando o sítio de microinjeção no NLET de um animal representativo. As setas indicam os sítios de injeção. Ac: comissura anterior; cc: corpo caloso; f: fórnix; LV: ventrículo lateral.

### 6.1. Efeitos da microinjeção de CRF no NLET sobre os níveis locais de NOx durante o estresse agudo de restrição

A microinjeção bilateral de CRF (0,07nmol/100nL, n=8) no NLET aumentou os níveis de NOx em animais expostos ao estresse agudo de restrição ( $t=2,2$ ,  $p<0,04$ ), quando comparados com animais tratados com veículo (100nl, n=7) (Figura 6). A figura 7 é uma fotomicrografia de um corte coronal do cérebro representando a retirada do NLET através do *punch*.



**Figura 6:** Níveis de NOx no núcleo leito da estria terminal (NLET) após uma sessão aguda de estresse de restrição em animais que receberam a microinjeção bilateral de veículo (salina, 100nl, n=7) ou CRF (0,07nmol/100nl, n=8) no NLET. As colunas representam as médias e as barras o EPM. \*p<0,05, teste *t* de Student.



**Figura 7:** Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro representando a retirada do NLET através do *punch*. Ac: comissura anterior; cc: corpo caloso; f: fórnix; LV: ventrículo lateral.

## 6.2. Envolvimento da sinalização NMDA/nNOS/GCs/PKG local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela neurotransmissão CRFérgica do NLET

### 6.2.1. Receptor NMDA

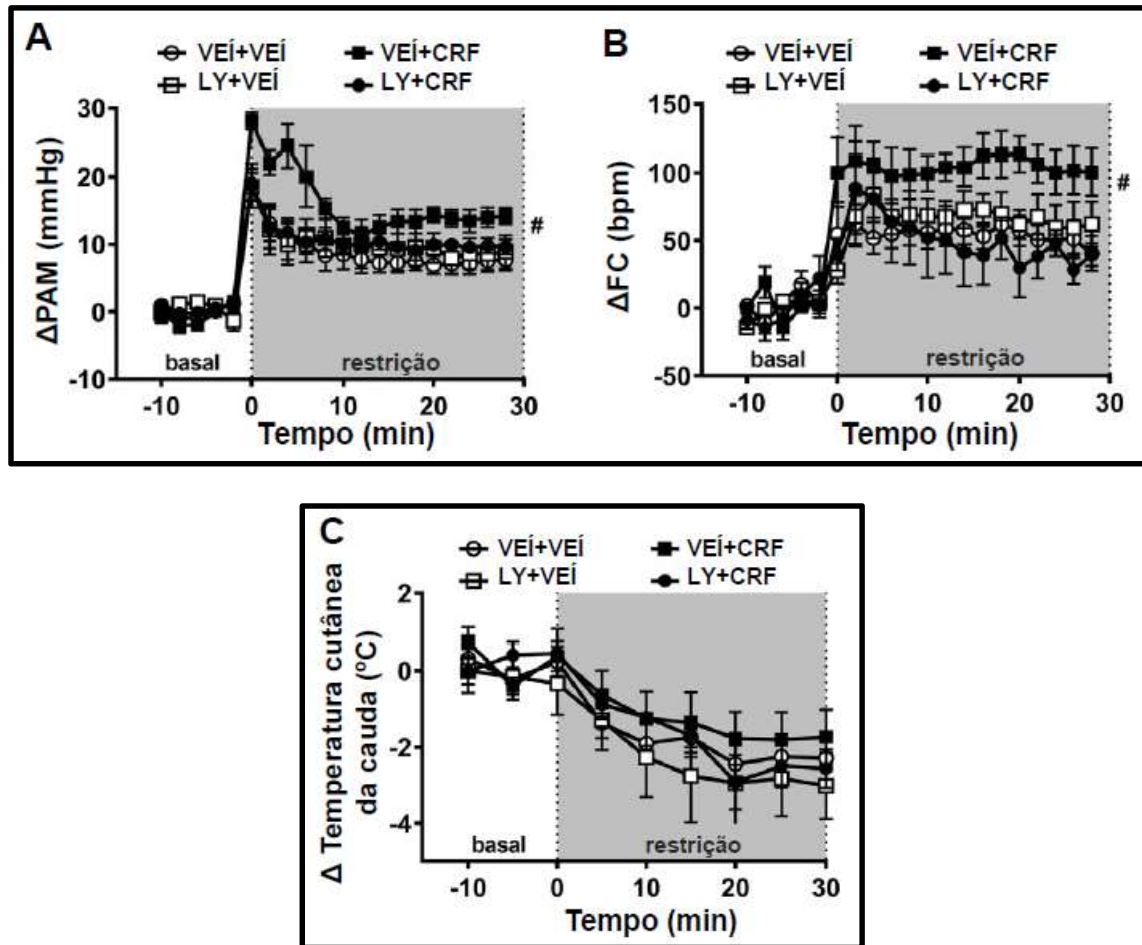
As microinjeções bilaterais do antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos NMDA, LY235959 (0,5nmol/100nl) e/ou CRF (0,07nmol/100nl) no NLET não afetaram os valores basais de PAM, FC ou de temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). Entretanto, o estresse de restrição agudo causou aumento sustentado da PAM (tempo:  $F_{(19,399)} = 12$ ,  $p < 0,0001$ ) e FC (tempo:  $F_{(19,399)} = 8$ ,  $p < 0,0001$ ) e queda da temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(8,160)} = 12$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 8). Além disso, a análise das curvas temporais de variação da PAM ( $F_{(3,20)} = 8$ ,  $p < 0,0001$ ) e FC ( $F_{(3,20)} = 12$ ,  $p < 0,0001$ ) indicaram efeito do tratamento farmacológico do NLET, porém sem afetar a resposta de queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,20)} = 0,6$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 8). Contudo, a análise não indicou interação entre estresse x tempo para PAM ( $F_{(57,399)} = 0,6$ ,  $p > 0,05$ ), FC ( $F_{(57,399)} = 0,5$ ,  $p > 0,05$ ) ou temperatura cutânea da cauda

( $F_{(24,160)}=0,2$ ,  $p>0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que o CRF (grupo veículo+CRF) facilitou o aumento de PAM ( $p<0,01$ ) e FC ( $p<0,05$ ). Ademais, os efeitos do CRF sobre a PAM ( $p>0,05$ ) e FC ( $p>0,05$ ) ao estresse de restrição, foram inibidos quando os animais foram pré-tratados com LY235959 no NLET (Figura 8). A Figura 9 representa o diagrama dos sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados nesse protocolo.

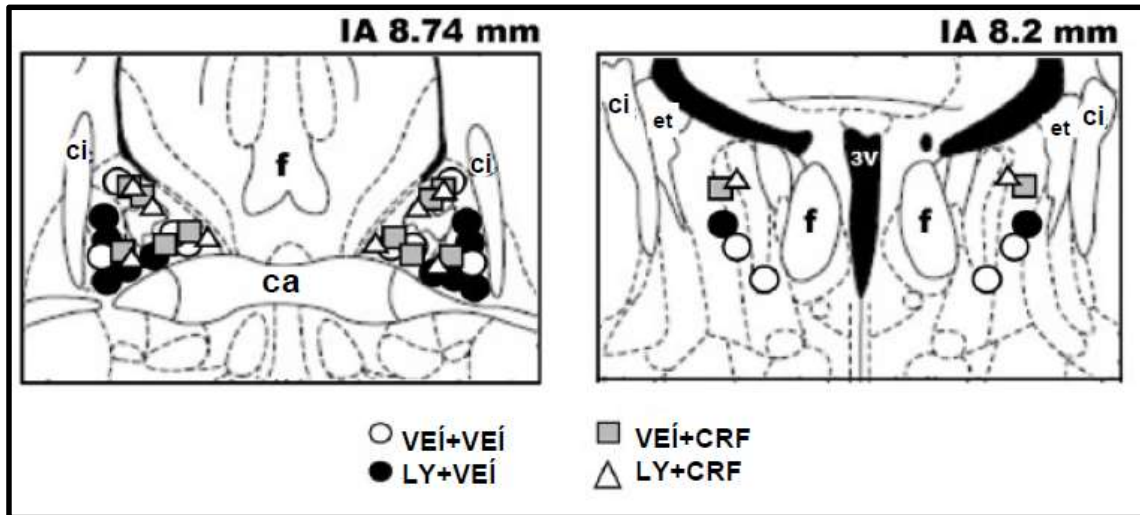


Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	n
<u>VEÍ+ VEÍ</u>	111±2	337±22	27,8±1	6
<u>LY+VEÍ</u>	104±3	383±21	28,9±2	6
<u>VEÍ + CRF</u>	106±4	363±9	26,6±1	6
<u>LY + CRF</u>	119±4	394±19	26,9±1	6
	F <sub>(3,23)</sub> =2,9 p>0,05	F <sub>(3,23)</sub> = 1,8 p>0,05	F <sub>(3,23)</sub> =0,7 p>0,05	
<u>VEÍ+VEÍ</u>	111±2	337±22	27,8±1	6
<u>NPLA+VEÍ</u>	107±5	375±9	28,7±1	6
<u>VEÍ+CRF</u>	106±4	363±9	26,5±1	6
<u>NPLA+CRF</u>	107±3	361±28	26,7±1	6
	F <sub>(3,23)</sub> =0,3 p>0,05	F <sub>(3,23)</sub> =0,7 p>0,05	F <sub>(3,23)</sub> =1,0 p>0,05	
<u>DMSO+SAL</u>	114±4	379±15	29,1±1	6
<u>ODQ+SAL</u>	111±3	365±35	27,0±0,4	6
<u>DMSO+CRF</u>	105±3	366±15	28,9±0,3	6
<u>ODQ+CRF</u>	109±2	387±15	27,8±0,4	6
	F <sub>(3,23)</sub> =1,5 p>0,05	F <sub>(3,23)</sub> =0,2 p>0,05	F <sub>(3,23)</sub> =2,7 p>0,05	
<u>DMSO+SAL</u>	114±4	379±15	29,1±1	6
<u>KT+SAL</u>	108±4	400±20	29,6±0,6	5
<u>DMSO+CRF</u>	105±3	366±15	28,8±0,4	5
<u>KT+CRF</u>	105±2	372±16	28,8±0,5	5
	F <sub>(3,20)</sub> =1,6 p>0,05	F <sub>(3,20)</sub> =0,4 p>0,05	F <sub>(3,20)</sub> =0,3 p>0,05	

**Tabela 2:** Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T) após o tratamento farmacológico no NLET. Os dados foram expressos como erro ± erro padrão da média (EPM). One-way ANOVA.



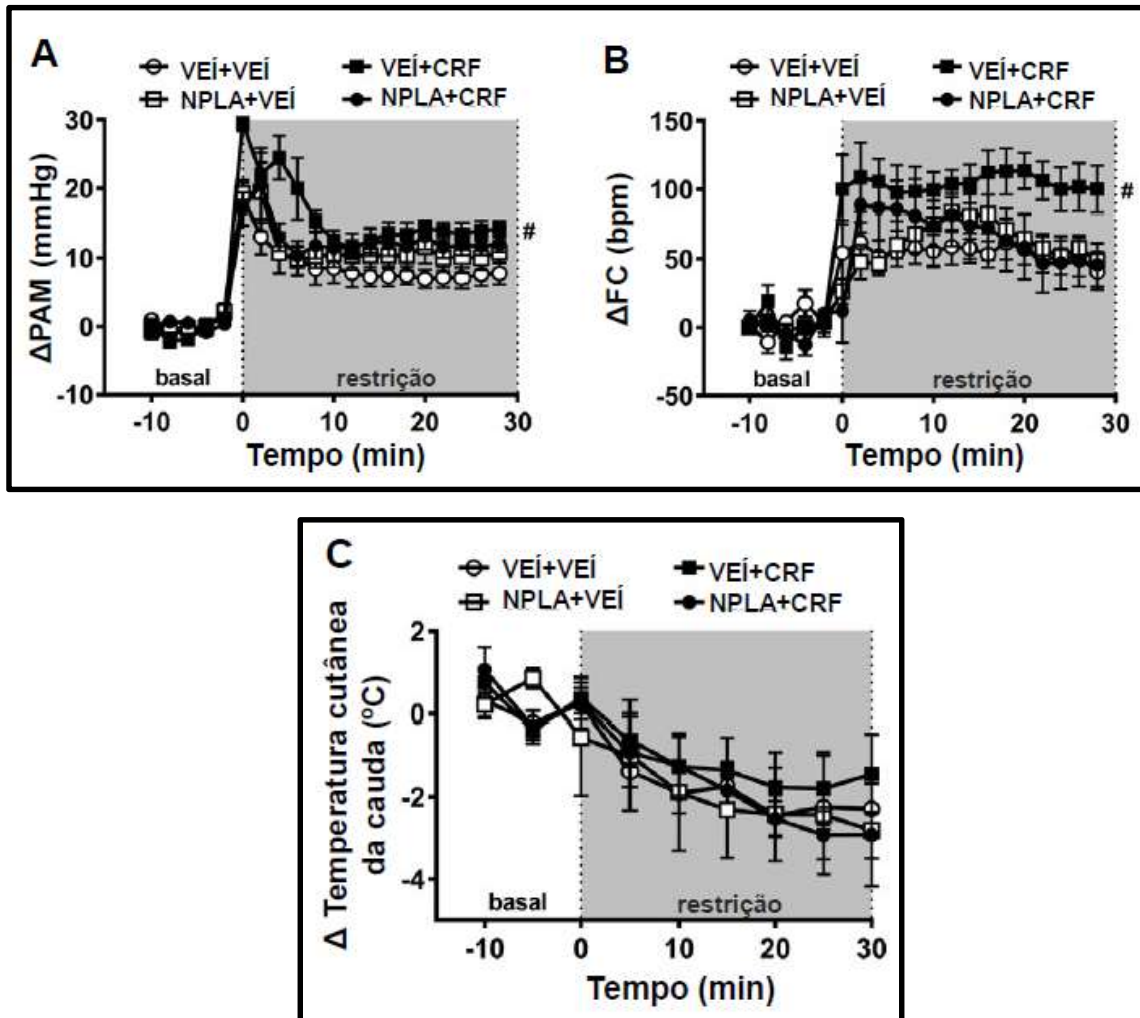
**Figura 8:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média (A;  $\Delta$ PAM), frequência cardíaca (B;  $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda (C;  $\Delta$  temperatura cutânea da cauda) desencadeada pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo (VEÍ) (salina, 100nl) ou LY235959 (LY) (0,5nmol/100nl) (antagonista seletivo do receptor NMDA), seguida de uma segunda microinjeção de veículo (VEÍ) (salina, 100nl) ou CRF (0,07nmol/100nl) (n=6/grupo). O início do estresse de restrição foi no t=0. Os círculos representam a média e as barras o EPM. #p<0,05 em relação a todo o período de restrição comparado com o grupo veí+veí, ANOVA bifatorial.



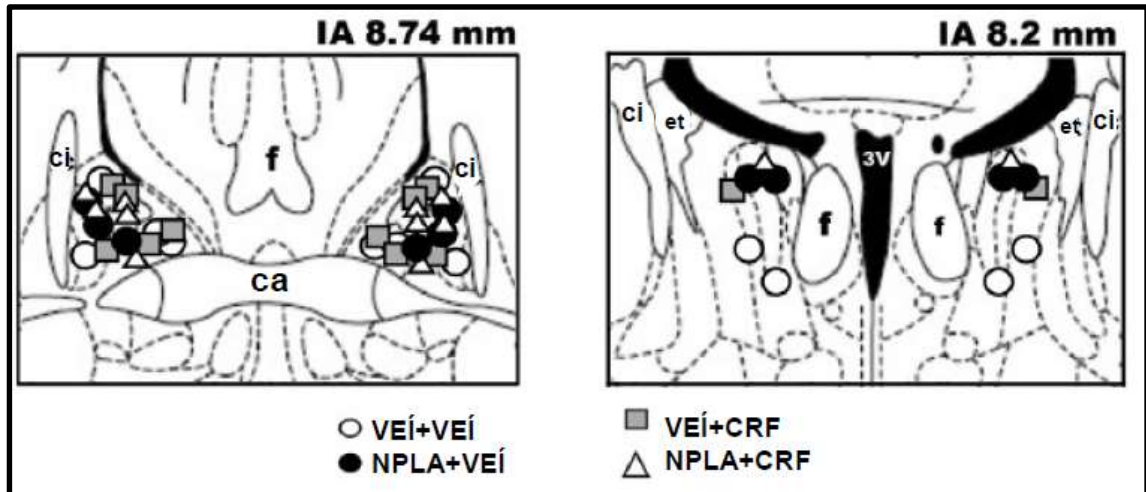
**Figura 9:** Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento de receptor glutamatérgico NMDA local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET. 3V: terceiro ventrículo; ca: comissura anterior; f: fórnix; IA: coordenada interaural; ci: cápsula interna; et: estria terminal.

**6.2.2. Enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)**

As microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da nNOS, NPLA (0,2 nmol/100nl) e/ou CRF (0,07/100nl) no NLET não afetaram os valores basais de MAP, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). No entanto, o estresse de restrição causou aumento sustentado da PAM (tempo:  $F_{(19,399)}=34$ ,  $p<0,0001$ ) e FC (tempo:  $F_{(19,399)}=14$ ,  $p<0,0001$ ) e a queda de temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(8,160)}=9$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 10). Além disso, a análise indicou efeito do tratamento farmacológico sobre a PAM ( $F_{(3,20)}=11$ ,  $p<0,0001$ ) e a FC ( $F_{(3,20)}=15$ ,  $p<0,001$ ), porém sem afetar a queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,20)}=0,9$ ,  $p>0,05$ ) ao estresse de restrição (Figura 10). A análise de PAM ( $F_{(57,399)}=1$ ,  $p>0,05$ ), FC ( $F_{(57,399)}=0,9$ ,  $p>0,05$ ) e de temperatura cutânea da cauda ( $F_{(24,160)}=0,3$ ,  $p>0,05$ ) não indicou interação entre tempo x estresse. As comparações planejadas dos grupos revelaram que o CRF (grupo veículo + CRF) facilitou o aumento da PAM ( $p<0,006$ ) e FC ( $p<0,02$ ). Os efeitos do CRF sobre as respostas de PAM ( $p>0,05$ ) e FC ( $p>0,05$ ) durante o estresse de restrição foram inibidos com o pré-tratamento do NLET com NPLA (Figura 10). A figura 11 representa o diagrama dos sítios de injeção no NLET dos animais utilizados nesse protocolo.



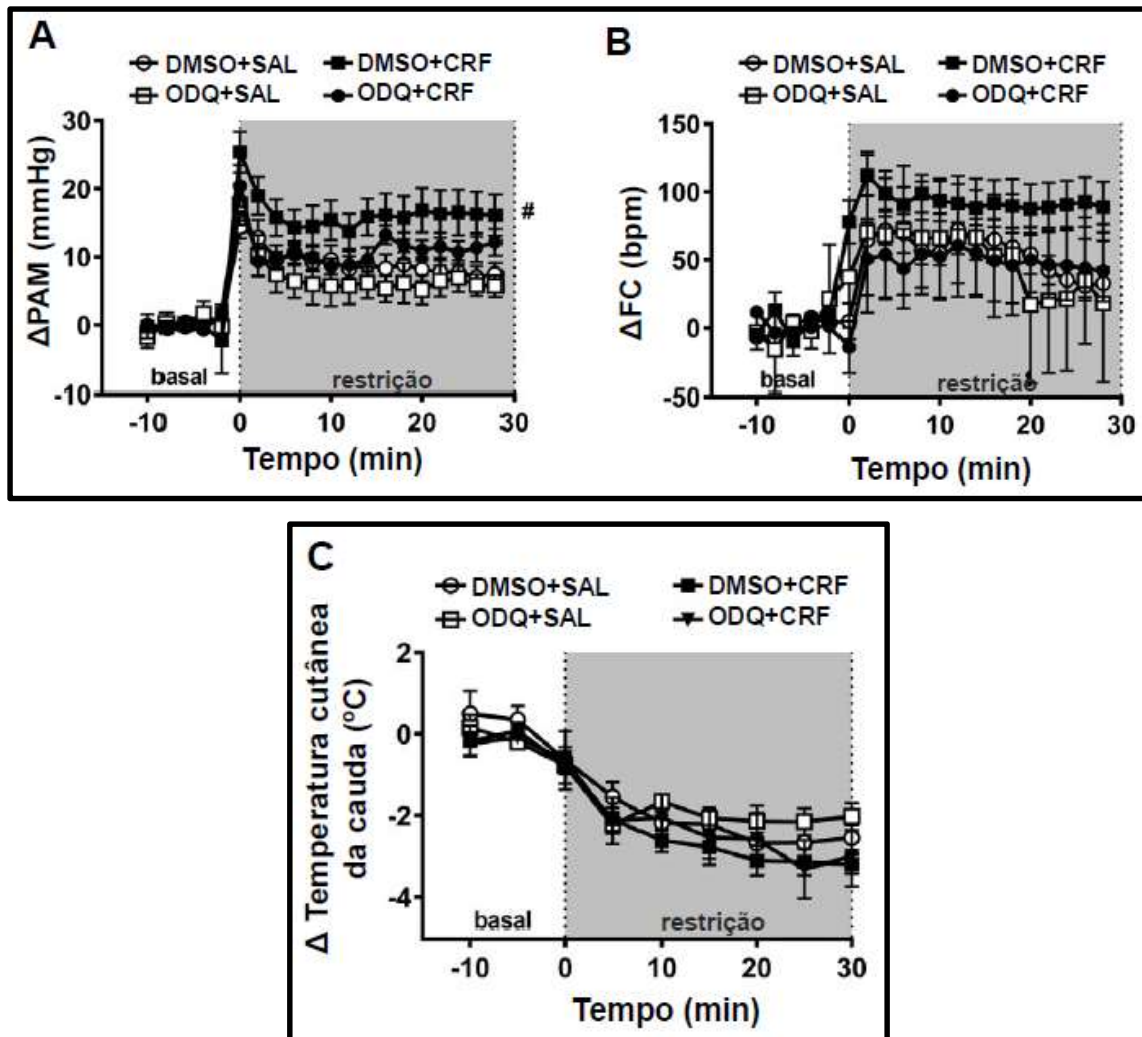
**Figura 10:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média (A;  $\Delta$ PAM), frequência cardíaca (B;  $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda (C;  $\Delta$  temperatura cutânea da cauda) desencadeada pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo (VEÍ) (salina, 100nl) ou NPLA (0,2nmol/100nl) (inibidor seletivo de nNOS), seguida de uma segunda microinjeção de veículo (VEÍ) (salina, 100nl) ou CRF (0,07nmol/100nl) (n=6/grupo). O início do estresse de restrição foi no t=0. Os círculos representam a média e as barras o EPM. #p<0,05 em relação a todo o período de restrição comparado com o grupo veí+veí, ANOVA bifatorial.



**Figura 11:** Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento da enzima nNOS local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET. 3V: terceiro ventrículo; ca: comissura anterior; f: fórnix; IA: coordenada interaural; ci: cápsula interna; et: estria terminal.

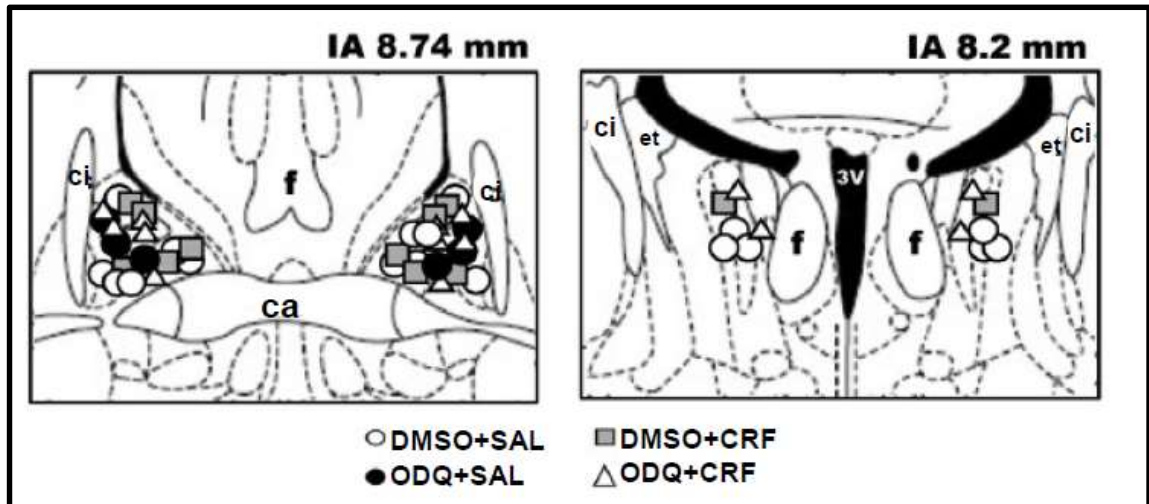
### 6.2.3. Guanilato Ciclase solúvel (GCs)

As microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da GCs, ODQ (0,5nmol/100nl) e/ou CRF (0,07nmol/100nl) no NLET não afetaram os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). Contudo, o estresse de restrição causou aumento sustentado da PAM (tempo:  $F_{(19,399)}=15$ ,  $p<0,0001$ ) e FC (tempo:  $F_{(19,399)}=3$ ,  $p<0,0001$ ) e queda da temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(8,160)}=30$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 12). Além disso, a análise da PAM ( $F_{(3,20)}=26$ ,  $p<0,0001$ ) e FC ( $F_{(3,20)}=4$ ,  $p<0,007$ ), mas não da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,20)}=0,6$ ,  $p>0,05$ ), indicou efeito do tratamento farmacológico no NLET (Figura 12). Porém, a análise não indicou interação entre tratamento x tempo para PAM ( $F_{(57,399)}=0,7$ ,  $p>0,05$ ), FC ( $F_{(57,399)}=0,2$ ,  $p>0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(24,160)}=0,4$ ,  $p>0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que o CRF (veículo + CRF) facilitou as respostas de elevação da PAM ( $p<0,05$ ) durante o estresse de restrição, porém esse efeito não foi identificado nos animais pré-tratados com ODQ no NLET ( $p>0,05$ ) (Figura 12).



**Figura 12:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$  temperatura cutânea da cauda) desencadeadas pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo (VEÍ) (DMSO, 100nl) ou ODQ (0,5 nmol/100nl) (inibidor seletivo da GCs), seguida de uma segunda microinjeção de veículo (VEÍ) (salina, 100nl) ou CRF (0,07nmol/100nl) (n=6/grupo). O início do estresse de restrição foi no t=0. Os círculos representam a média e as barras o EPM. #p<0,05 em relação a todo o período de restrição comparado com o grupo DMSO+salina, ANOVA bifatorial.



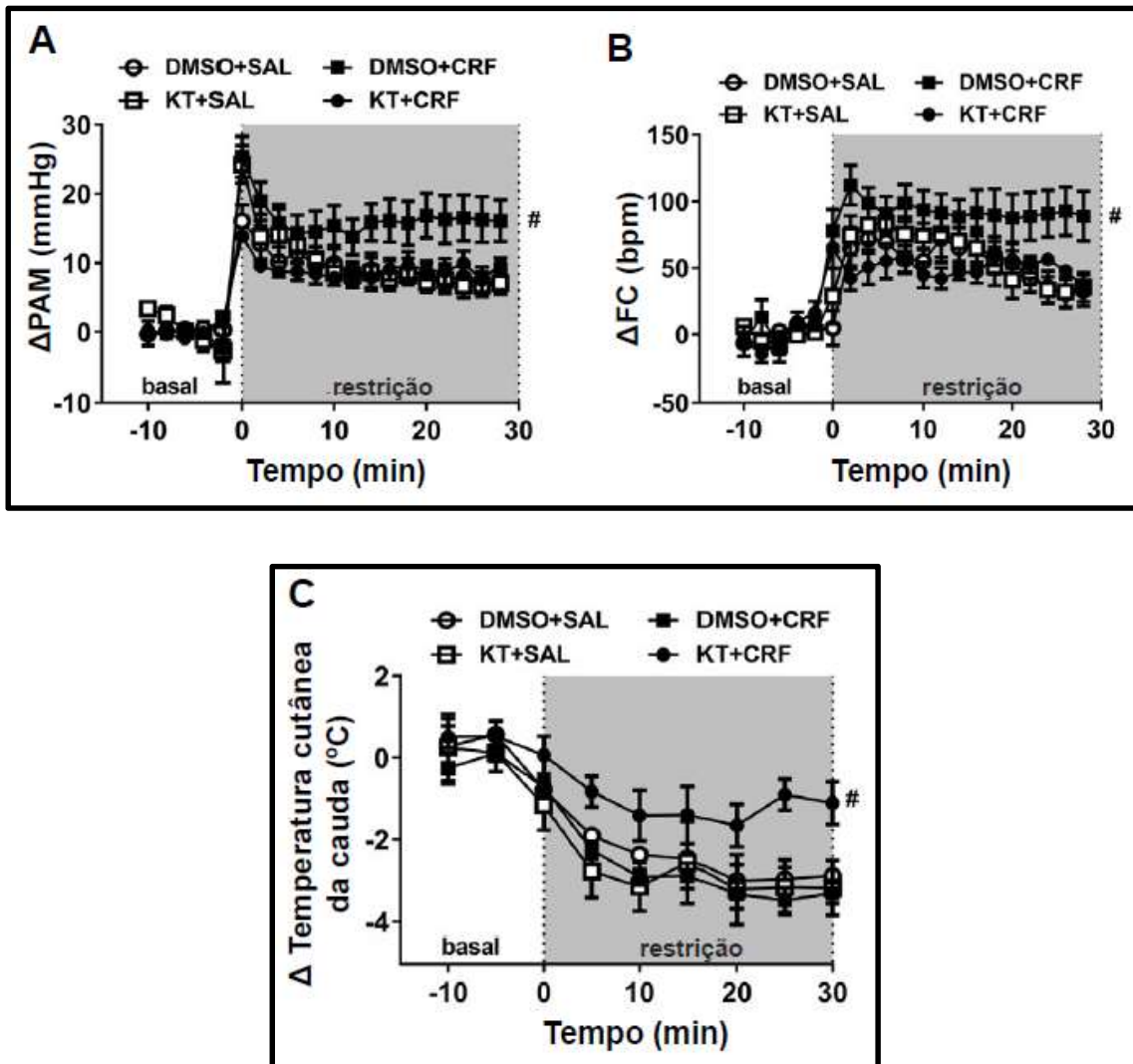


**Figura 13:** Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento da enzima GCs local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET. 3V: terceiro ventrículo; ca: comissura anterior; f: fórnix; IA: coordenada interaural; ci: cápsula interna; et: estria terminal.

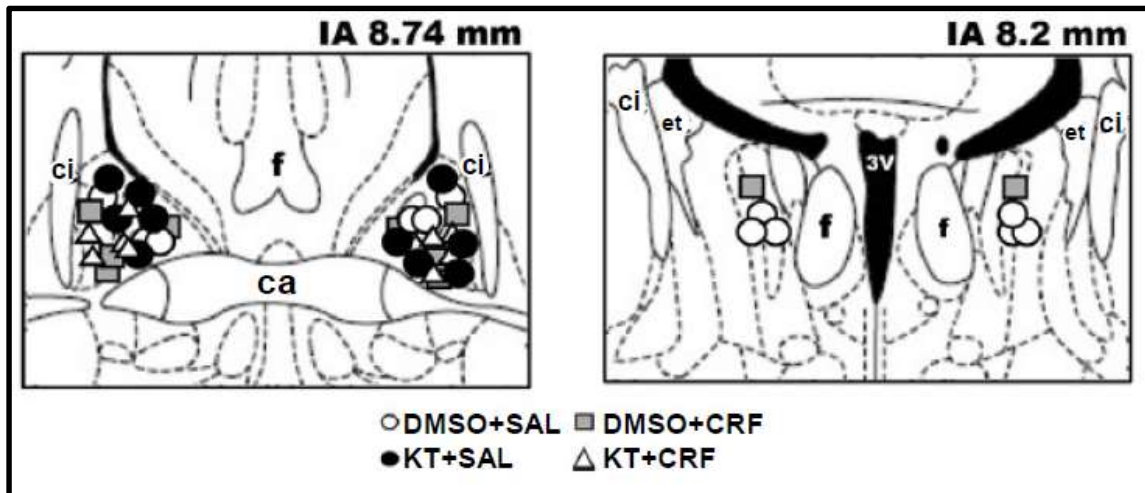
#### 6.2.4. Proteína Quinase G (PKG)

As microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da PKG, KT5823 (0,01nmol/100nl) e/ou CRF (0,07nmol/100nl) no NLET não alteraram os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 2). Entretanto, o estresse de restrição causou aumento sustentado da PAM (tempo:  $F_{(19,342)} = 13$ ,  $p < 0,0001$ ) e FC (tempo  $F_{(19,342)} = 7$ ,  $p < 0,0001$ ) e redução da temperatura cutânea da cauda (tempo:  $F_{(8,144)} = 28$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 14). Além disso, a análise da PAM ( $F_{(3,18)} = 20$ ,  $p < 0,0001$ ), FC ( $F_{(3,18)} = 7$ ,  $p < 0,0002$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,18)} = 18$ ,  $p < 0,0001$ ) indicou efeito do tratamento farmacológico do NLET (Figura 14). Entretanto, a análise não indicou interação entre estresse x tempo para PAM ( $F_{(57,342)} = 0,9$ ,  $p > 0,05$ ), FC ( $F_{(57,342)} = 0,4$ ,  $p > 0,05$ ) e temperatura cutânea da cauda ( $F_{(24,144)} = 0,6$ ,  $p > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que o CRF (grupo veículo + CRF) facilitou as respostas de aumento da PAM ( $p < 0,05$ ) e FC ( $p < 0,05$ ). Os efeitos do CRF sobre as respostas pressora ( $p < 0,05$ ) e taquicárdica ( $p < 0,05$ ) foram inibidos com o pré-tratamento com KT5823 no NLET (Figura 14). Além disso, a resposta de queda da temperatura cutânea da cauda provocada pela restrição foi reduzida nos animais que tiveram o tratamento combinado com KT5823 e CRF (grupo KT+CRF) ( $p < 0,04$ ) (Figura 14). A Figura 15 representa o diagrama dos sítios de injeção no NLET nos ratos utilizados no presente protocolo.

A microinjeção dos antagonistas e inibidores (i.e., LY235959, NPLA, ODQ ou KT5328) e/ou CRF nas estruturas ao redor do NLET não afetaram as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição ( $p > 0,05$ ).



**Figura 14:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média (A;  $\Delta$ PAM), frequência cardíaca (B;  $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda (C;  $\Delta$  temperatura cutânea da cauda) desencadeadas pelo estresse de restrição agudo em ratos tratados bilateralmente no NLET com veículo (VEÍ) (DMSO, 100nl) ou o inibidor seletivo da PKG, KY5823 (0,01 nmol/100nl), seguida de uma segunda microinjeção de veículo (VEÍ) (salina, 100nl) ou CRF (0,07nmol/100nl) (n=5/grupo; exceto DMSO+SAL n=6). O início do estresse de restrição foi no t=0. Os círculos representam a média e as barras o EPM. #p<0,05 em relação a todo o período de restrição comparado com o grupo DMSO+salina, ANOVA bifatorial.



**Figura 15:** Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de todos os animais utilizados para a avaliação do envolvimento da PKG local na modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET. 3V: terceiro ventrículo; ca: comissura anterior; f: fórnix; IA: coordenada interaural; ci: cápsula interna; et: estria terminal.

## **7. DISCUSSÃO**

O presente estudo fornece a primeira evidência de interação entre as neurotransmissões CRFérgica e nitrérgica no NLET. Além disso, os dados reportados aqui são os primeiros a indicar que a modulação das respostas cardiovasculares ao estresse pelo CRF no NLET são mediadas por uma interação com as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica locais. De fato, nós observamos que a microinjeção de CRF no NLET aumentou a formação local de NO durante o estresse de restrição, como evidenciado através do aumento dos níveis de NOx 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 das respostas pressoras e taquicárdicas observadas em consequência da microinjeção de CRF no NLET.

A porção anterior do NLET é proposta como uma região crítica envolvida no controle da atividade autônoma e da função cardiovascular (CRESTANI et al., 2013; DONG et al., 2001). Essa ideia é suportada por resultados neuroanatômicos, demonstrando que a divisão anterior é a região preferencial do NLET conectada com regiões do hipotálamo e do tronco cerebral que estão envolvidas no controle da atividade autônoma (DONG et al., 2001; DONG e SWANSON, 2004), bem como por estudos funcionais reportando que respostas cardiovascular mais robustas são provocadas quando essa região do NLET é estimulada (CIRIELLO & JANSSEN, 1993; ZHANG et al., 2009). Desse modo, a maioria dos sítios de injeção presentes neste estudo atingiram a divisão anterior do NLET. De fato, ambos receptores CRF são expressos na porção anterior do NLET (DABROWSKA et al., 2011; VAN PETT et al., 2000). Além disto, os terminais imunorreativos para CRF e fibras imunorreativas UCN1 e UCN3 foram encontradas nas regiões rostrais do NLET (BITTENCOURT et al., 1999; LI et al., 2002). Neurônios locais imunorreativos para CRF e UCN3 também foram identificados na divisão anterior do NLET (LI et al., 2002; PHELIX E PAUL, 1990; SWANSON et al., 1983). Todas essas evidências reforçam os achados reportados aqui indicando que a microinjeção de CRF nas regiões rostrais do NLET facilita as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

Estudos prévios de nosso grupo revelaram o papel da neurotransmissão CRFérgica presente no NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Por exemplo, reportamos que a microinjeção no NLET de um antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub> reduziu de forma dose-dependente o aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, enquanto o tratamento do NLET com um antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub> reduziu a resposta pressora e a vasoconstrição cutânea mediada pela ativação simpática (OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, a microinjeção no NLET de CRF como um agonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub> ou de UCN3 como um agonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub> facilitaram as respostas cardiovasculares provocadas pelo estresse de restrição (OLIVEIRA et al., 2015). Portanto, a facilitação das respostas de aumento da PAM e FC provocadas pela microinjeção de CRF no NLET reportada no presente estudo estão de acordo com resultados prévios do nosso grupo.

Resultados obtidos utilizando técnicas eletrofisiológicas indicaram que o CRF age pré-sinápticamente através da ativação do receptor CRF<sub>1</sub> facilitando a neurotransmissão glutamatérgica no NLET (SILBERMAN & WINDER, 2013). Isso foi evidenciado através da demonstração *in vitro* de que a aplicação de CRF no NLET aumentou a frequência, mas não a amplitude, de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas e que esse efeito foi inibido após o pré-tratamento com um antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>, mas não por um antagonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub> (KASH et al., 2008; SILBERMAN et al., 2013). Essa facilitação da neurotransmissão glutamatérgica no NLET mediada pelo CRF tem sido implicada como parte dos mecanismos neurobiológicos da dependência à drogas, como evidenciado através da demonstração de que este mecanismo neuroquímico é recrutado após a exposição crônica ao álcool e a cocaína (KASH et al., 2008; NOBIS et al., 2011; SILBERMAN et al., 2013). Entretanto, os achados do nosso estudo fornecem a primeira evidência de que a interação entre CRF e glutamato no NLET está envolvida no controle das respostas fisiológicas durante eventos aversivos. Além disso, os resultados reportados no presente estudo indicam uma nova interação entre CRF e a sinalização nitrérgica no NLET, na qual desempenha um papel no controle das respostas cardiovasculares ao estresse.

A via de sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG sobre o controle das respostas ao estresse parece ser alvo de outros mecanismos neuroquímicos

no NLET. Um estudo de nosso grupo demonstrou que a neurotransmissão endocanabinóide no NLET exerce um papel inibitório sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Mais especificamente, foi demonstrado que o antagonista de receptor CB<sub>1</sub> no NLET facilitou a resposta taquicárdica durante o estresse de restrição de maneira dose-dependente, enquanto que o aumento local de anandamida ou 2-araquidonoilglicerol (2-AG) provocaram efeitos opostos (GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Assim como reportado no presente estudo, foi demonstrado que essa influência inibitória do receptor CB<sub>1</sub> no NLET sobre as respostas de taquicardia provocadas pela restrição é mediada por inibição local da sinalização receptor NMDA/nNOS/GCs/PKG (GOMES-DE-SOUZA et al., 2020). Nesse sentido, uma possível interação entre a neurotransmissão CRFérgica e endocanabinóide no NLET nunca foi investigada. Apesar da evidência do controle oposto das neurotransmissões CRF e endocanabinóide sobre as respostas cardiovasculares ao estresse serem mediadas através da mesma via (i.e, neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica), não podemos excluir a possibilidade de que a inibição local de CRF por receptor CB<sub>1</sub> no NLET também possa afetar as respostas cardiovasculares ao estresse. Entretanto, alguns estudos têm indicado que a neurotransmissão endocanabinóide pode mediar os efeitos decorrentes da ativação da neurotransmissão CRF (KUPFERSCHMIDT et al., 2012a, 2012b). Portanto, mais estudos são necessários para investigar a interação direta entre as neurotransmissões CRF e endocanabinóide no NLET.

Um componente adicional na circuitaria do CRF no NLET é a interação entre as neurotransmissões noradrenérgica e CRFérgica (SILBERMAN & WINDER, 2013). Nesse sentido, dados eletrofisiológicos indicaram que a noradrenalina liberada no NLET ativa neurônios locais contendo CRF (SILBERMAN et al., 2013), o que provavelmente aumenta os níveis de CRF locais (SILBERMAN & WINDER, 2013). Nesse sentido, a elevada concentração de CRF intensifica a atividade glutamatérgica no NLET, aumentando a excitação local (NOBIS et al., 2011; SILBERMAN et al., 2013). O papel da neurotransmissão noradrenérgica do NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse foi reportada previamente (CRESTANI et al., 2013). Foi identificado que o tratamento do NLET com um antagonista seletivo

do adrenoceptor  $\alpha_1$ , mas não com antagonistas seletivos dos adrenoceptores  $\alpha_2$  ou  $\beta$ , facilitou a resposta taquicárdica provocada pelo estresse de restrição, porém sem afetar a resposta pressora (CRESTANI et al., 2009). Essa evidência de um papel inibitório da neurotransmissão noradrenérgica do NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição (CRESTANI et al., 2013; CRESTANI et al., 2009) não suportam a ideia de que a influência facilitatória da neurotransmissão CRFérgica do NLET esteja relacionada com a liberação local de noradrenalina. Assim, a liberação de CRF e peptídeos relacionados no NLET durante eventos aversivos parece ser mediada por mecanismos independentes da neurotransmissão noradrenérgica local. Nesse sentido, além de fontes intrínsecas (i.e, a partir de neurônios locais no NLET), o CRF e seus peptídeos relacionados podem também ser liberados de fontes extrínsecas, como terminais oriundos do núcleo central da amígdala (CeA) e do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (VRANJKOVIC et al., 2017). Nesse sentido, similar a modulação pela neurotransmissão CRFérgica no NLET, um papel facilitatório do CeA e do PVN sobre as respostas cardiovasculares ao estresse foi reportado (BUSNARDO et al., 2013; BUSNARDO et al., 2010b; SANDERS et al., 1994), suportando a ideia de que o CRF e seus peptídeos relacionados podem ser liberados no NLET a partir de terminais oriundos de outras estruturas límbicas.

As respostas cardiovasculares durante eventos aversivos são mediadas por alterações tanto na atividade simpática quanto na atividade parassimpática (CRESTANI, 2016). Por exemplo, aumentos na FC durante situações aversivas são abolidos após a inibição da atividade simpática cardíaca, enquanto que o bloqueio do tônus parassimpático para o coração aumenta essa resposta (CARRIVE, 2006; DOS REIS, 2014). Esses dados indicam uma coativação simpática e parassimpática cardíaca durante eventos aversivos. A resposta pressora durante o estresse é inibida após o tratamento com antagonista do adrenoceptor  $\alpha_1$  (CRESTANI, 2016; DOS REIS et al., 2014), indicando que a vasoconstrição nos leitos renal e cutâneo (BLESSING, 2003; SCHADT e HASSER, 1998; ZHANG et al., 1996) contribui para a resposta pressora. Os neurônios do NLET projetam-se para estruturas bulbares envolvidas no controle da atividade autônoma, como neurônios do núcleo do trato solitário, núcleo ambíguo e regiões ventrolaterais (DONG e SWANSON, 2004; GRAY e



MAGNUSON, 1987). Portanto, o papel facilitatório do CRF no NLET sobre as respostas de taquicardia desencadeadas pelo estresse por restrição pode ser mediado por estimulação tanto de vias facilitatórias para neurônios simpáticos ou vias inibitórias para neurônios parassimpáticos no bulbo, enquanto a facilitação da resposta pressora é mediada por uma facilitação simpática.

A queda na temperatura da cauda identificada nos animais com o tratamento combinado com KT5823 e CRF no NLET (i.e. grupo KT+CRF) foi inesperado. O mecanismo relacionado com esse efeito é desconhecido. Entretanto, o bloqueio da PKG revelou um efeito do CRF em reduzir a vasoconstrição cutânea provocada pela restrição. Assim, embora os achados presentes indiquem que o controle pelo CRF no NLET das respostas cardiovasculares ao estresse é mediado por facilitação da neurotransmissão glutamatérgica local e ativação da sinalização nitrérgica, a diminuição da resposta de temperatura cutânea da cauda encontrada no grupo KT+CRF fornece evidência de que o CRF pode também interagir com outros mecanismos neuroquímicos controlando a vasoconstrição cutânea mediada pelo simpático, que parecem contrariar o efeito mediado pela ativação da PKG. Como mencionado acima, os estudos prévios reportaram uma interação da neurotransmissão CRF com a neurotransmissão noradrenérgica local no NLET (SILBERMAN E WINDER, 2013). Entretanto, o papel da neurotransmissão noradrenérgicas do NLET no controle da resposta de vasoconstrição cutânea ao estresse de restrição nunca foi investigado. Ademais, não podemos excluir a possibilidade de que esse efeito é independente da interação com outros neurotransmissores, sendo o CRF capaz de modular através de uma ação direta nos mecanismos centrais controlando a atividade simpática. De qualquer modo, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nesse efeito.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados descritos no presente capítulo fornecem a primeira evidência de que o CRF ativa a sinalização receptor NMDA/NO no NLET. Além disso, nossos dados sugerem que a influência facilitatória da neurotransmissão CRFérgica no NLET sobre as respostas cardiovasculares provocadas por

estímulos aversivos são medidas através da ativação do receptor glutamatérgico NMDA, nNOS, GCs e PKG locais.

## **9. REFERÊNCIAS**

Adami MB, Barretto-de-Souza; Duarte JO; Almeida J; Crestani CC. Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *J Psychopharmacol* 31 (6), 674-681. Jun 2017.

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

Barretto-de-Souza L, Adami MB, Oliveira LA, Gomes-de-Souza L, Duarte JO, Almeida J, Crestani CC. Nitric oxide-cGMO-PKG Signaling in the bed nucleus of stria terminalis modulates the cardiovascular responses to stress in male rats, *Eur Neuropsychopharmacol* 28(1), 75-84, 2018.

Benini R, Oliveira LA, Gomes-de-Souza L, Crestani CC. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. *Stress*, 22 (1), 151-161, 2019.

Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenki PE. 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, 285-312, 1999.

Blessing, WW. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23, 527-538, 2003.

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

Busnardo C, Crestani CC, Tavares RF, Resstel LB, Correa FM. Cardiovascular responses to l-glutamate microinjection into the hypothalamic

paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. *Brain Res.* 1344,87-95, 2010a.

Busnardo C, Tavares RF, Resstel LB, Elias LL, Correa FM. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton. Neurosci.* 158, 51-57, 2010b.

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

Chan JY, Chan SH, Li FC, Tsai CY, Cheng HL, Chang AY. Phasic cardiovascular responses to mevinphos are mediated through differential activation of cGMP/PKG cascade and peroxynitrite via nitric oxide generated in the rat rostral ventrolateral medulla by NOS I and II isoforms. *Neuropharmacology.* 48(1):161-72, 2005.

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.

Ciriello J, Janssen SA. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. *Am. J. Physiol.* 265, H1516-1522, 1993.

Craven, Zagotta WN. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 375–401, 2006.

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

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

Crestani CC. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. *Front Physiol*, 7, 251, 2016.

Cruz FC, Engi AS, Leão RM, Planeta CS, Crestani CC. Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and

neuroendocrine responses to acute restraint stress. *J Psychopharmacol.* 26(10):1366-74, 2012.

Dabrowska J, Hazra R, Ahern TH, Guo JD, McDonald AJ, Mascagni F, Muller, JF, Young LJ, Rainnie DG. Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotropin-releasing factor and oxytocin systems in the hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: implications for balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology* 36,1312-1326, 2011.

Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38(1-2), 192-246, 2001.

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

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

Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27(11), 2783-2802, 2008.

Gomes-de-Souza L, Oliveira LA, Benini R, Rodella P, Costa-Ferreira W; Crestani CC. Involvement of Endocannabinoid Neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol*, 173(19), 2833-44, 2016.

Gomes-de-Souza L; Costa-Ferreira W, Oliveira LA, Benini R, Crestani CC. 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. *J Psychopharmacol*, 269881119897556, 2020.

Gray TS, Magnuson DJ. 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, 365-374, 1987.

Holfmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86:1-23, 2006.

Kash TL, Nobis WP, Matthews RT, Winder DG. Dopamine enhanced fast excitatory synaptic transmission in the extended amygdala by a CRF-R1-dependent process. *J Neurosci* 28: 13854-13865, 2008.

Kupferschmidt D, Klas P and Erb S. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of corticotropin-releasing factor on the reinstatement of cocaine seeking and expression of cocaine-induced behavioral sensitization. *Br J Pharmacol* 167:196-206, 2012a.

Kupferschmidt DA, Newman AE, Boonstra R and Erb S. 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, 2012b.

Li C, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale WW. Urocortin iii-immunoreactive projections in rat brain: Partial overlap with sites of type 2 corticotropin-releasing factor receptor expression. *J Neurosci* 22:991-1001, 2002.

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

Nobis WP, Kash TL, Silberman Y, Winder DG. Beta-Adrenergic receptors enhance excitatory transmission in the bed nucleus of the stria terminalis through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent and cocaine-regulated mechanism. *Biol Psychiatry* 69(11), 1083-1090, 2011.

Oliveira LA, Almeida J, Benini R, Crestani CC. CRF1 and CRF2 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, 2015.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3 ed Academic Press Sidney, Australia, 1997.

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

Rybalkin SD, Wan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *CircRes*. 93(4):280-91, 2004.

Sanders BJ, Wirtz-Nole C, DeFord SM, Erling BF. Central amygdaloid lesion attenuate cardiovascular responses to acute stress in rats with borderline hypertension. *Physiol Behav* 56(4), 709-713, 1994.

Schadt JC, Hasser EM. Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *Am J Physiol* 274:R814-821, 1998.

Silberman Y, Matthews RT, Winder DG. 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):950-60,2013.

Silberman Y, Winder DG. 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, 2013.

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropinreleasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3), 165-186, 1983.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428(2), 191-212, 2000.

Vianna DM, Carrive P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur J Neurosci.* 21(9):2505-12, 2005.

Vranjkovic O, Pina M, Kash TL, Winder DG, 2017. The bed nucleus of the stria terminalis in drugassociated behavior and affect. A circuit-based perspective. *Neuropharmacology* 122,100-106, 2017.

Zhang W, Zhang N, Sakurai T, Kuwaki T. Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* 1262, 25-37, 2009.

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

Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation and clinical implications. *Nitric Oxide.* 20(4):223-30, 2009.

## *Capítulo 3*

*Os receptores CRF do núcleo leito da estria terminal estão envolvidos com o prejuízo da atividade barorreflexa provocado pelo estresse crônico em ratos*

## 1. INTRODUÇÃO

O modelo de estresse crônico variado (ECV) é amplamente utilizado na literatura (WILNER, 2005; GRIPPO, 2009; HILL et al., 2012; HERMAN, 2013). Esse estressor consiste na exposição repetida de roedores a diferentes estressores inescapáveis de maneira imprevisível. O ECV foi inicialmente descrito como um modelo experimental para avaliação de comportamentos relacionados à depressão (WILNER, 1997, 2005). Entretanto, atualmente esse modelo tem sido utilizado no estudo de uma série de outras respostas relacionadas ao estresse, como alterações neuroendócrinas e cardiovasculares (GRIPPO, 2009; HERMAN, 2013). Devido à alternância dos estímulos estressores, as respostas fisiológicas apresentam um processo reduzido de habituação durante a exposição ao ECV, de modo que esse estressor tem sido proposto como uma alternativa a modelos de estresse crônico homotípicos (i.e., exposição repetida ao mesmo estressor), que apresentam um processo de habituação acentuado (HERMAN, 2013). Portanto, o ECV tem sido proposto como um modelo experimental efetivo para investigar as disfunções cardiovasculares e autônomas provocadas por estresse crônico (CARNEVALI et al., 2017; GRIPPO, 2011).

Além disso, diversas alterações autônomas e cardiovasculares foram descritas em roedores expostos a este estressor crônico, incluindo aumento de pressão arterial leve, taquicardia de repouso, alterações do barorreflexo, redução da latência à arritmia e hiperresponsividade a estressores ambientais novos (i.e., diferentes daqueles utilizados no protocolo crônico), alterações no ciclo circadiano e disfunções vasculares (CARNEVALI et al., 2017; GOLBIDI et al., 2015; GRIPPO, 2011; SCHAEUBLE et al., 2019, GRIPPO et al., 2002, 2004, 2008; d'AUDIFFRET et al., 2010; FLAK et al., 2011; ISINGRINI et al., 2011; DUARTE et al., 2015).



Nesse sentido, o ECV é considerado um modelo útil para a investigação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas complicações cardiovasculares relacionadas ao estresse (GRIPPO, 2009). Entretanto, os circuitos neuronais e neurotransmissores envolvidos nas alterações cardiovasculares associadas ao ECV ainda são pouco compreendidos. Alguns estudos reportaram o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos (GRIPPO et al., 2006; GRIPPO & JOHNSON, 2009), porém a participação de outros mecanismos de sinalização, bem como os sítios específicos no sistema nervoso central envolvidos nas alterações cardiovasculares ao ECV ainda são desconhecidos.

A redução na atividade barorreflexa tem sido descrita como um importante mecanismo envolvido no desenvolvimento e progressão da hipertensão arterial (IRIGOYEN & KRIEGER, 1998; GRASSI et al., 2006; HONZIKOVA & FISER, 2009), além de ser um fator de risco para o desenvolvimento de arritmias cardíacas e morte súbita em diversas patologias cardiovasculares (FARRELL et al., 1991; TAKASE et al., 1992). A redução das respostas do barorreflexo também tem sido relacionada com aumento do tônus simpático (GRASSI et al., 2004). Desse modo, tem sido proposto que alterações na atividade desse mecanismo reflexo podem estar implicadas nas respostas cardiovasculares e autônomas desencadeadas pelo ECV (GRIPPO et al., 2008; DUARTE et al., 2015).

A exposição a protocolos de ECV causa alterações morfológicas e neuroquímicas no NLET, incluindo aumento no conteúdo de CRF e na expressão de receptores CRFérgicos (ALBRECHET-SOUZA et al., 2017; CHOI et al., 2006; ELHARRAR et al., 2013; KIM et al., 2006; KORMOS et al., 2016; STOUT et al., 2000; TRAN et al., 2014; VENTURA-SILVA et al., 2012). Além disso, alterações no gene *Crf* também foram documentadas em animais cronicamente estressados (STERRENBURG et al., 2011). Ademais, a exposição a esse modelo de estresse crônico aumentou a atividade basal de neurônios do NLET para um padrão similar àquele observado em animais não-estressados submetidos a uma sessão aguda de estresse (VENTURA-SILVA et al., 2012). Essas alterações morfológicas, neuroquímicas e funcionais parecem ter um impacto importante no controle de funções fisiológicas pelo NLET. Nesse sentido, foi observado que a exposição prévia a um protocolo de ECV inverteu o papel do NLET no controle das respostas neuroendócrinas ao estresse por

restrição agudo (CHOI et al., 2008). Enquanto a lesão química do NLET reduziu a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal desencadeada pelo estresse por restrição agudo em animais naive, uma facilitação dessa resposta neuroendócrina foi observada após a lesão do NLET em animais previamente expostos ao ECV (CHOI et al., 2008). Um estudo recente também reportou o envolvimento do NLET na anorexia e na redução do ganho de peso corporal induzidas pelo ECV (ROMAN et al., 2012).

Os dados apresentados acima fornecem evidências de que a exposição ao ECV pode afetar o controle da função cardiovascular por mecanismos CRFérgicos no NLET, e essa alteração pode estar relacionada com as complicações cardiovasculares induzidas por esse modelo de estresse crônico. Essa ideia é reforçada por resultados que demonstraram que o tratamento intracerebroventricular com um antagonista não-seletivo de receptores CRFérgicos aboliu as alterações na atividade barorreflexa induzidas pela exposição a um protocolo de estresse crônico (CONTI et al., 2001). Além disso, modelo de ECV foi selecionado para este estudo, pois a maioria das evidências da alteração da neurotransmissão CRF no NLET de animais cronicamente estressados foram obtidos através desse estressor crônico (KIM et al., 2006; KORMOS et al., 2016; STOUT et al., 2000; VENTURA-SILVA et al., 2012). No entanto, os possíveis sítios específicos no sistema nervoso central relacionados com esse efeito não foram elucidados. Assim, nesse estudo nós testamos a hipótese de que a exposição a um protocolo de ECV causa prejuízo na neurotransmissão CRFérgica do NLET, a qual está envolvida nas respostas cardiovasculares induzidas por esse estressor crônico.

## 2. OBJETIVOS

Investigar o envolvimento dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nas alterações dos parâmetros basais de pressão arterial e FC e na atividade do barorreflexo desencadeadas pela exposição a um protocolo de ECV.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Como descrito no item 3.1, Capítulo 1.

#### **3.2. Implantes de cânulas bilaterais no NLET**

Como descrito no item 3.2, Capítulo 1.

#### **3.3. Cirurgia de canulação da artéria e veia femoral**

Como descrito no item 3.3, Capítulo 1.

#### **3.4. Registro de pressão arterial e frequência cardíaca**

Como descrito no item 3.4, Capítulo 1.

#### **3.5. Estresse crônico variado (ECV)**

O ECV, modificado de Marin e colaboradores (2007), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores durante 10 dias consecutivos. A Tabela 3 apresenta o protocolo completo do ECV.

Os animais do grupo controle foram mantidos em repouso, exceto no período de limpeza das caixas, no Biotério do Laboratório de Farmacologia da FCF/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos aos protocolos de estresse. Todas as sessões de estresse foram realizadas em uma sala separada do Biotério.

<b>Dia</b>	<b>Tipo de estresse e cronograma</b>
<b>1</b>	10:00h, nado forçado por 15 min; 19:00h, serragem úmida durante a noite
<b>2</b>	15:00h, frio (4 °C) e isolamento por 60 min; 19:00 h, luzes acesas durante a noite
<b>3</b>	12:00h, luzes apagadas por 180 min; 15:00 h, nado forçado por 5 min
<b>4</b>	07:30h, serragem úmida durante o dia; 19:00h, privação de alimento/água durante a noite
<b>5</b>	13:00 h, campo aberto por 10 min; 19:00 h, isolamento durante a noite
<b>6</b>	14:00 h, frio (4 °C) e isolamento por 15 min; 15:00 h, luzes apagadas por 120 min
<b>7</b>	19:00 h, serragem úmida e luz acesa durante a noite
<b>8</b>	19:00 h, isolamento e privação de alimentos/água durante a noite
<b>9</b>	16:00 h, frio (4 °C) e isolamento por 30 min; 19:00 h, luzes acesas durante a noite
<b>10</b>	09:00 h, labirinto em cruz aberto por 5 minutos; 10:00 h, nado forçado por 10 min

**Tabela 3:** Protocolo de estresse crônico variado

### **3.6. Drogas e soluções**

Como descrito no item 3.5, Capítulo 1.

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

Como descrito no item 3,6, Capítulo 1.

### **3.8. Avaliação da atividade do barorreflexo**

Como descrito no item 3.7, Capítulo 1.

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

Como descrito no item 3.8, Capítulo 1.

### **3.10. Medida dos níveis proteicos dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET**

### 3.10.1. Microdissecção do NLET

Como descrito no item 3.10.1, Capítulo 2.

### 3.10.2 Western Blotting

Brevemente, as amostras foram homogeneizadas por meio de ondas de ultrassom em solução de SDS 1% contendo coquetel de inibidores de fosfatase e proteases (Sigma-Aldrich®). O conteúdo total de proteínas foi determinado utilizando o kit Bio-Rad DC (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). A quantidade de proteína foi ajustada para 30 µg. As proteínas contidas nas amostras foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida 9% por 50-60 min a 200V usando o Bio-Rad Mini-PROTEAN tetra cell com Bio-Rad Powerpac basic supply (Bio-Rad Laboratories Inc.). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF-LFP (GE, Healthcare) usando o Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad Laboratories Inc.). Após o bloqueio com solução T-TBS (0.05% de tween-20 em tris-buffered saline) contendo 5% de leite desnatado por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação, as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra o receptor CRF<sub>1</sub> (Polyclonal Antibody, Rabbit Anti-Corticotropin Releasing Factor Receptor 1®; Millipore) ou o receptor CRF<sub>2</sub> (Polyclonal Antibody, Rabbit Anti-Corticotropin Releasing Factor Receptor 2®; Millipore) por 18 horas (*overnight*) a 4°C. Após a lavagem em tampão T-BST por cinco minutos, as membranas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado fluoróforo (Goat-Rabbit IgG-Cy3; GE Healthcare). Em seguida, protegidas da luz, as membranas foram secas em papel de filtro e a fluorescência das bandas foi detectada diretamente a partir das membranas utilizando-se o escaner Typhoon® Trio (GE Healthcare). A quantidade dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> foi expressa em % em relação ao grupo controle. O controle de carga foi realizado pela coloração das membranas com azul de Coomassie, seguido pela quantificação da proteína total em toda a faixa.

## 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### **4.1. Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET nas alterações da atividade barorreflexa induzidas pelo estresse crônico variado (ECV)**

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nas alterações das respostas cardíacas do barorreflexo induzidas pelo ECV. Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET, e mantidos em recuperação por quatro dias. Depois desse período, os animais foram submetidos ao protocolo de 10 dias de ECV (ver item 3.5, Capítulo 3). Os animais do grupo controle foram mantidos no biotério sem serem perturbados, exceto no período de limpeza das caixas, pelo mesmo período que os animais submetidos ao ECV. No décimo dia do protocolo de ECV, após a última sessão de estresse, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cateteres na artéria e veia femoral. Vinte quatro horas depois, os animais foram levados à sala de experimentação em caixas individuais e mantidos em repouso por 60 minutos, para habituação às condições de luz e som da sala de experimentação. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e FC. Então, grupos independentes de animais controle e submetidos ao ECV receberam microinjeção bilateral no NLET de CP376395 (5 nmol/100nl) (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub>), antisauvagine-30 (5 nmol/100nl) (antagonista seletivo dos receptores CRF<sub>2</sub>) ou veículo (salina, 100 nl). Dez minutos após o tratamento farmacológico do NLET, foram realizadas infusões randomizadas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio para determinação da atividade barorreflexa.

#### **4.2. Efeito do estresse crônico variado (ECV) sobre a expressão dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET**

Este protocolo teve o objetivo de investigar se possíveis alterações no controle da atividade barorreflexa por mecanismos CRFérgicos do NLET após a exposição ao ECV estariam associadas com modificações na expressão dos

receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET. Para tanto, os animais foram expostos ao protocolo de 10 dias de ECV. Vinte quatro horas após a última sessão de estresse os animais foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram removidos e estocados em freezer -80°C para futuro processamento. Os animais do grupo controle foram mantidos no biotério sem serem perturbados, exceto no período de limpeza das caixas, pelo mesmo período que os animais submetidos ao ECV, e foram eutanasiados juntamente com os animais estressados. O NLET de todos os animais foi coletado por microdissecção para quantificação dos níveis proteicos dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> (ver descrição do protocolo acima).

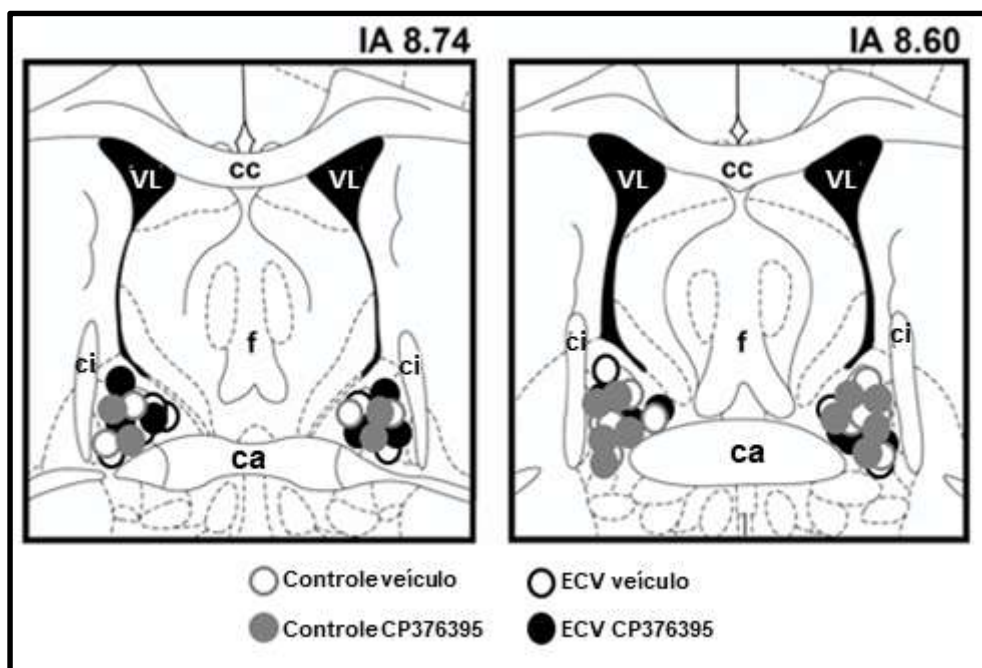
### 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). Os parâmetros das curvas barorreflexa e os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca foram comparadas para cada tratamento utilizando a análise de variância (ANOVA) bifatorial, com estresse (controle vs ECV) e tratamento do NLET (veículo vs fármaco) como fatores independentes. Quando a ANOVA bifatorial indicou efeito, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. Os resultados dos níveis proteicos dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nos animais controle e ECV foram comparados usando o teste t de *Student*. P<0,05 foi assumido como significativo.

### 6. RESULTADOS

#### 6.1. Envolvimento do receptor CRF<sub>1</sub> do NLET nas alterações da atividade barorreflexa induzidas pelo estresse crônico variado (ECV)

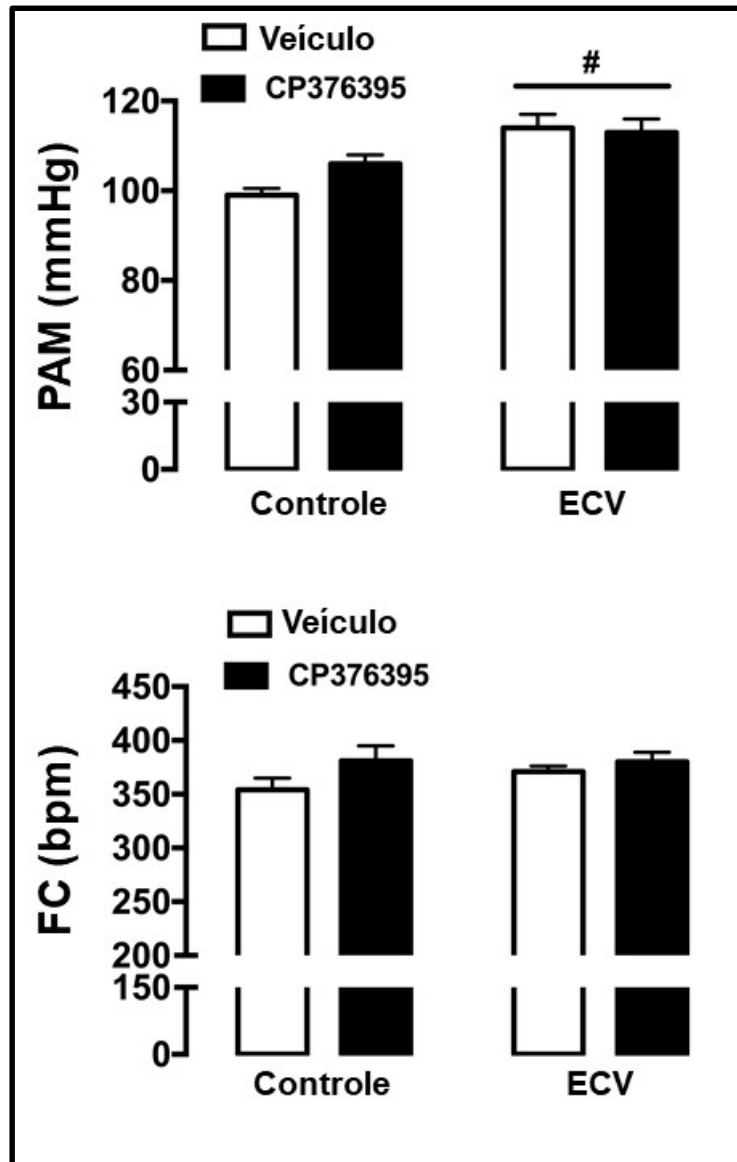
A Figura 16 mostra a representação diagramática das microinjeções bilaterais de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395 e de veículo (salina 100nl) de todos os animais utilizados neste protocolo.



**Figura 16:** Representação diagramática baseada no atlas de encéfalo de rato Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395 ou de veículo (salina) de ratos controle ou expostos ao protocolo de ECV. CC- corpo caloso, vl- ventrículo lateral, f- fornix, ca- comissura anterior, ci- cápsula interna.

A análise dos valores basais de PAM indicaram efeitos do ECV ( $F_{(1,28)}=20$ ,  $p=0,0002$ ) com notável aumento da PAM, porém a microinjeção bilateral de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395 (5nmol/100nl) no NLET não alterou a PAM basal ( $F_{(1,28)}=1,5$ ;  $p=0,2349$ ). A análise indicou interação entre estresse e tratamento ( $F_{(1,28)}=2,6$ ,  $p=0,1173$ ) (Figura 17). A análise dos parâmetros basais de FC não indicaram efeitos do ECV ( $F_{(1,28)}=0,6$ ,  $p=0,0442$ ) ou tratamento ( $F_{(1,28)}=3$ ,  $p=0,0928$ ) ou interação entre tratamento e estresse ( $F_{(1,28)}=0,8$ ,  $p=0,3901$ ) (Figura 17).





**Figura 17:** Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina, barras brancas) ou CP376395 (barras pretas, antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$ ) no NLET. #  $p < 0,05$  versus respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni ( $n=8$ /grupo).

A análise dos parâmetros derivados das cruvas sigmoide (Figura 18, Tabelas 4 e 5) demonstrou que o ECV reduziu o platô inferior ( $P_1$ ) ( $p=0,0102$ ), platô superior ( $P_2$ ) ( $p=0,0006$ ), range ( $\Delta P$ ) ( $p=0,0148$ ) e ganho ( $G$ ) ( $p<0,0001$ ) em ratos que foram tratados com veículo (Figuras 18 e 19, Tabela 4). Além disto, a análise indicou que o tratamento farmacológico no NLET com CP376395 afetou as respostas do barorreflexo em ratos que não foram estressados (Figuras 18 e 19, Tabela 4). Por sua vez, a microinjeção bilateral de antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  no NLET reduziu o platô inferior ( $P_1$ ) ( $p=0,0246$ ), o platô superior ( $P_2$ ) ( $p=0,0002$ ), range ( $\Delta P$ ) ( $p=0,0026$ ) e ganho ( $G$ ) ( $p=0,0005$ ) nos animais controle (Figuras 18 e 19, Tabela 4). Entretanto, o tratamento com antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  no NLET não afetou os parâmetros do barorreflexo em animais cronicamente estressados ( $p>0,05$ ).

Quando as respostas reflexas da FC durante o aumento e a queda da PAM foram avaliadas individualmente através da regressão linear, a análise indicou que o ECV reduziu a resposta de FC durante aumentos de PAM em ratos tratados com veículo ( $p=0,0312$ ) (Figura 18, Tabela 5). A análise também indicou que a microinjeção de CP376395 no NLET, reduziu o reflexo de taquicardia ( $p=0,0239$ ) e de bradicardia ( $p=0,0498$ ) em ratos controle (Figura 18, Tabela 5). Porém, o tratamento farmacológico no NLET não afetou o slope da regressão linear em ratos que foram expostos ao ECV ( $p>0,05$ ).

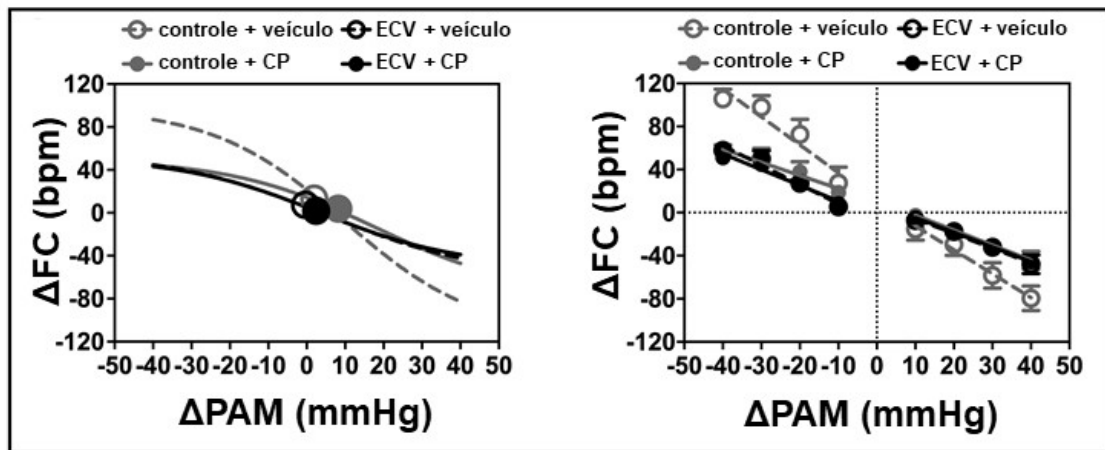
As microinjeções com antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  CP376395 ou salina em regiões ao redor do NLET não alteraram os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade do barorreflexo ( $p>0,05$ ).

Grupo	G (bpm/mmHg)	P <sub>1</sub> (bpm)	P <sub>2</sub> (bpm)	ΔP (bpm)	PA <sub>50</sub> (bpm)
<i>Não- estressado</i>					
<b>Veículo</b>	-2,4±0,3	-80±12	105±9	186±19	-0,7±4
<b>CP376395</b>	<b>-1,3±0,1*</b>	<b>-44±8*</b>	<b>54±8*</b>	<b>102±7*</b>	4±3
<i>ECV</i>					
<b>Veículo</b>	<b>-0,9±0,1#</b>	<b>-39±4#</b>	<b>59±5#</b>	<b>119±17#</b>	-2,4
<b>CP376395</b>	-1,0±0,1	-45±6	51±5	96±7	-0,8±4
<i>Fator</i>					
<b>Estresse</b>	F <sub>(1,28)</sub> =28 <b>p&lt;0,0001</b>	F <sub>(1,28)</sub> =5,4 <b>p=0,0274</b>	F <sub>(1,28)</sub> =12 <b>p=0,0019</b>	F <sub>(1,28)</sub> =6 <b>p=0,0221</b>	F <sub>(1,28)</sub> =0,5 p>0,05
<b>Tratamento</b>	F <sub>(1,28)</sub> =8,5 <b>p=0,0067</b>	F <sub>(1,28)</sub> =3,4 p=0,0762	F <sub>(1,28)</sub> =16,4 <b>p=0,0004</b>	F <sub>(1,28)</sub> =13 <b>p=0,0014</b>	F <sub>(1,28)</sub> =0,5 p>0,05
<b>Interação</b>	F <sub>(1,28)</sub> =12,3 <b>p=0,0015</b>	F <sub>(1,28)</sub> =6,4 <b>p=0,0174</b>	F <sub>(1,28)</sub> =9 <b>p=0,0068</b>	F <sub>(1,28)</sub> =4,3 <b>p=0,0490</b>	F <sub>(1,28)</sub> =0,2 p>0,05

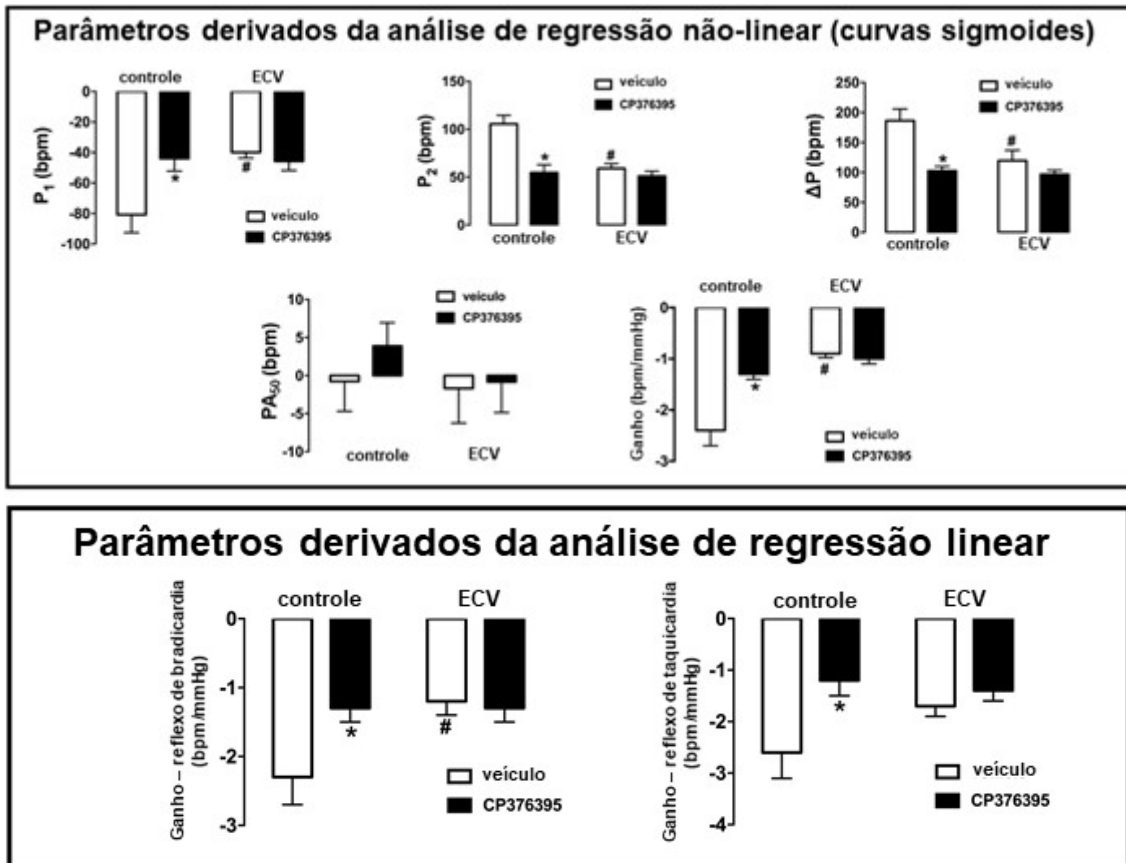
**Tabela 4:** Parâmetros derivados das curvas sigmóides do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam microinjeção de veículo (salina) ou do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395, no NLET. Os dados são apresentados como média± EPM. Anova bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. \* p<0,05 *versus* respectivo grupo veículo, # p<0,05 *versus* respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni (n=8/grupo).

<b>Grupo</b>	<b>Ganho Fenilefrina (bpm/mmHg)</b>	<b>Ganho NPS (bpm/mmHg)</b>
<i>Não-estressado</i>		
<u>Veículo</u>	-2,3±4	-2,6±0,5
<u>CP376395</u>	<b>-1,3±0,2*</b>	<b>-1,2±0,3*</b>
<i>ECV</i>		
<u>Veículo</u>	<b>-1,2±0,2#</b>	-1,7±0,2
<u>CP376395</u>	-1,3±0,2	-1,4±0,2
<i>Fator</i>		
<u>Estresse</u>	F <sub>(1,28)</sub> =4,3 <b>p=0,0469</b>	F <sub>(1,28)</sub> =1,2 p>0,05
<u>Tratamento</u>	F <sub>(1,28)</sub> =3 p>0,05	F <sub>(1,28)</sub> =7 <b>p=0,0139</b>
<u>Interação</u>	F <sub>(1,28)</sub> =4,3 <b>p=0,0469</b>	F <sub>(1,28)</sub> =3 p>0,05

**Tabela 5:** Parâmetros derivados das curvas de regressão linear do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam microinjeção de veículo (salina) ou do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395, no NLET. Os dados são apresentados como média±EPM. Anova bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. \*p<0,05 *versus* respectivo grupo veículo, #p<0,05 *versus* respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni (n=8/grupo).



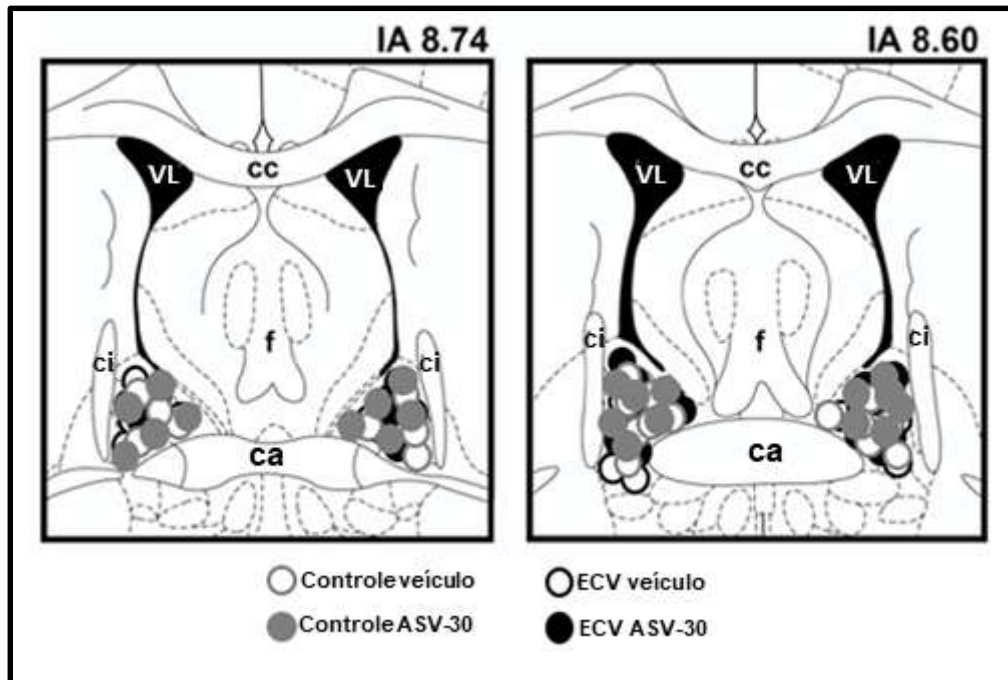
**Figura 18:** Análise de regressão não-linear (gráfico à esquerda) e linear (gráfico à direita) da função do barorreflexo correlacionando as alterações da PAM ( $\Delta PAM$ ) e a resposta reflexa da FC ( $\Delta FC$ ) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina) ou CP376395, antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  no NLET. Os símbolos na curva sigmoide (gráfico à esquerda) indicam a  $BP_{50}$ . Aumentos e quedas na PAM foram induzidos pela infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, respectivamente.



**Figura 19:** Parâmetros derivados da análise das curvas de regressão não-linear (acima) e linear (abaixo) do barorreflexo de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina, barras brancas) ou CP376395 (barras pretas, antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>) no NLET. \*  $p < 0,05$  versus respectivo grupo veículo, #  $p < 0,05$  versus respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni ( $n=8$ /grupo).

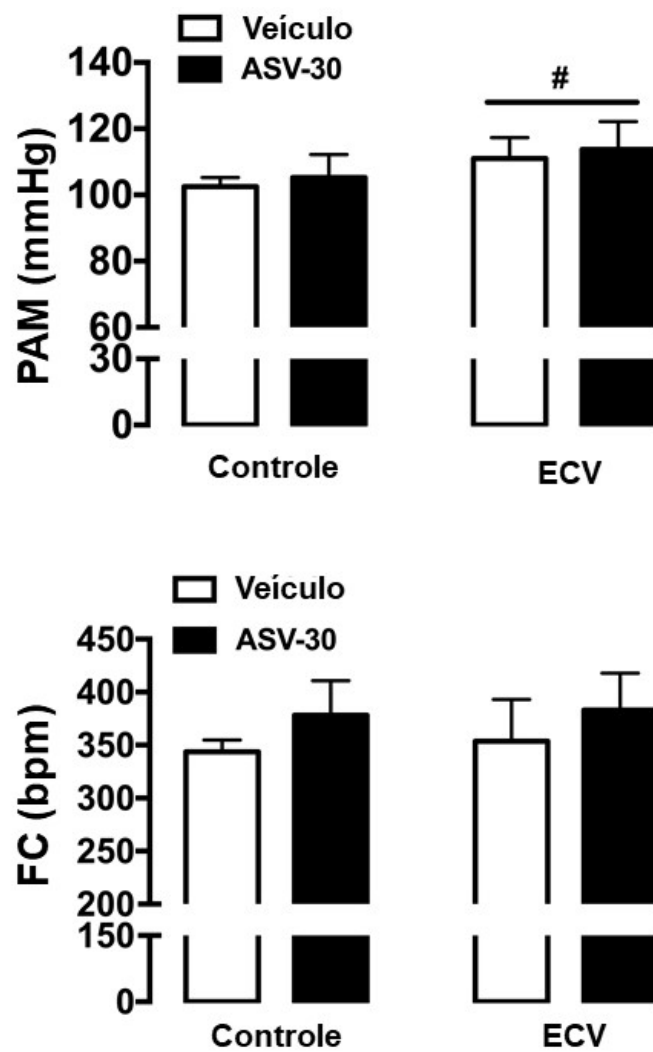
**6.2. Estudo do envolvimento do receptor CRF<sub>2</sub> do NLET nas alterações da atividade barorreflexa induzidas pelo estresse crônico variado (ECV)**

A Figura 20 mostra a representação diagramática dos sítios de microinjeção bilateral no NLET de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 e veículo de todos os animais utilizados neste protocolo.



**Figura 20:** Representação diagramática baseada no atlas de encéfalo de rato Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 ou de veículo (salina) de ratos controle ou expostos ao protocolo de ECV. CC- corpo caloso, vl- ventrículo lateral, f- fornix, ca- comissura anterior, ci- cápsula interna.

A análise dos valores basais de PAM indicaram efeitos do ECV ( $F_{(1,43)}=19,9$ ,  $p<0,0001$ ), como um aumento comparável aos animais testados no protocolo anterior (item 6.1), porém não houve influência da microinjeção bilateral de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 (5nmol/100nl) no NLET ( $F_{(1,43)}=2$ ,  $p=0,1584$ ) e interação entre estresse e tratamento ( $F_{(1,43)}=0,0001$ ,  $p=0,9905$ ) (Figura 21). A análise dos parâmetros basais de FC indicam efeito do tratamento ( $F_{(1,43)}=11,6$ ,  $p=0,0014$ ), mas sem a influência do estresse ( $F_{(1,43)}=0,6$ ,  $p=0,4327$ ) e interação entre estresse e tratamento ( $F_{(1,43)}=0,07$ ,  $p=0,7893$ ) (Figura 21).



**Figura 21:** Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina, barras brancas) ou antisauvagine-30 (barras pretas, antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>) no NLET. # p<0,05 versus respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni (n=11-12/grupo).



Os resultados das análises da atividade do barorreflexo de animais controle e que foram expostos ao ECV, tratados com antagonista de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, estão presentes nas tabelas 6 e 7 e Figuras 22 e 23. A comparação dos parâmetros derivados a partir das curvas sigmóides do grupo veículo (controle *versus* ECV) demonstrou que o ECV reduziu o platô superior (P<sub>2</sub>) (p=0,0016), range ( $\Delta$ FC) (p=0,0109) e ganho (G) (p<0,0001), consistente com os ratos tratados com veículo, descrito no protocolo anterior (item 6.1). A análise de regressão não-linear da função do barorreflexo também indicou que o tratamento farmacológico no NLET com antisauvagine-30 afetou as respostas do barorreflexo em ratos não-estressados. A análise indicou que a microinjeção do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub> no NLET reduziu o platô superior (P<sub>2</sub>) (p=0,0066) e o ganho (G) (p<0,0001) dos animais controle. O antisauvagine-30 no NLET de ratos que foram sujeitos ao protocolo de ECV aumentaram o ganho (G) (p<0,0001), porém os outros parâmetros avaliados não foram alterados (p>0,05).

O reflexo das respostas de FC durante aumentos e quedas da PAM também foram avaliadas individualmente através da análise de regressão linear (Tabela 7, Figuras 22 e 23) A análise revelou que o ECV reduziu as respostas de taquicardia (p=0,0285) e de bradicardia (p=0,0079) do barorreflexo. A análise também indicou que o tratamento no NLET de animais controle com antisauvagine-30 reduziu o ganho do reflexo de resposta de taquicardia (p=0,0335), mas sem afetar o reflexo de bradicardia (p=0,9437). O antisauvagine-30 no NLET de animais que foram expostos ao ECV, aumentou o reflexo de bradicardia quando comparado com os animais estressados que receberam veículo (p=0,0338), mas sem afetar o reflexo de taquicardia (p=0,9613).

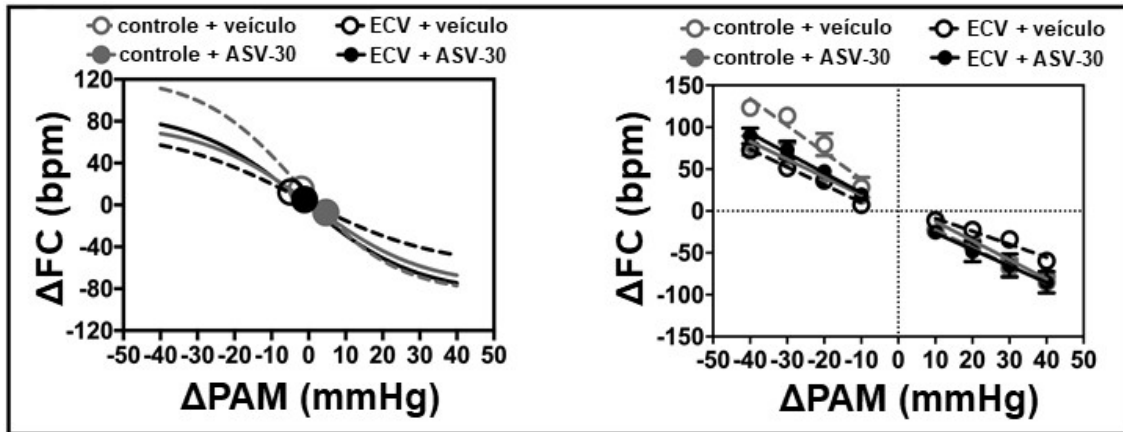
A microinjeção do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub> nas estruturas ao redor do NLET não afetou os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade do barorreflexo (p>0,05).

Grupo	G (bpm/mmHg)	P <sub>1</sub> (bpm)	P <sub>2</sub> (bpm)	ΔP (bpm)	PA <sub>50</sub> (bpm)
<i>Não- estressado</i>					
<b>Veículo</b>	-2,6±0.1	-86±9	123±8	208±13	-5,0±2,0
<b>Antisauvagine-30</b>	<b>-1,9±0.1*</b>	-78±7	<b>78±11*</b>	156±13	5,0±4,0
<i>ECV</i>					
<b>Veículo</b>	<b>-1,3±0.1#</b>	<b>-59±8</b>	<b>73±7#</b>	<b>132±15#</b>	-9,0±4
<b>Antisauvagine-30</b>	<b>-2,1±0,1*</b>	-85±12	89±9	158±21	-4,0±4
<i>Fator</i>					
<b>Estresse</b>	F <sub>(1,37)</sub> =10,2 <b>p=0,0029</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 1,1 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> = 5 <b>P=0,0374</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 5 <b>P=0,0302</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 3 p=0,0838
<b>Tratamento</b>	F <sub>(1,37)</sub> =5,8 <b>p=0,0218</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 0,85 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> = 2,4 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> = 0,6 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> = 4 <b>p=0,05</b>
<b>Interação</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 2,6 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> = 3 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> =12 <b>p=0,0015</b>	F <sub>(1,37)</sub> =6 <b>p=0,0208</b>	F <sub>(1,37)</sub> =0,5 p>0,05

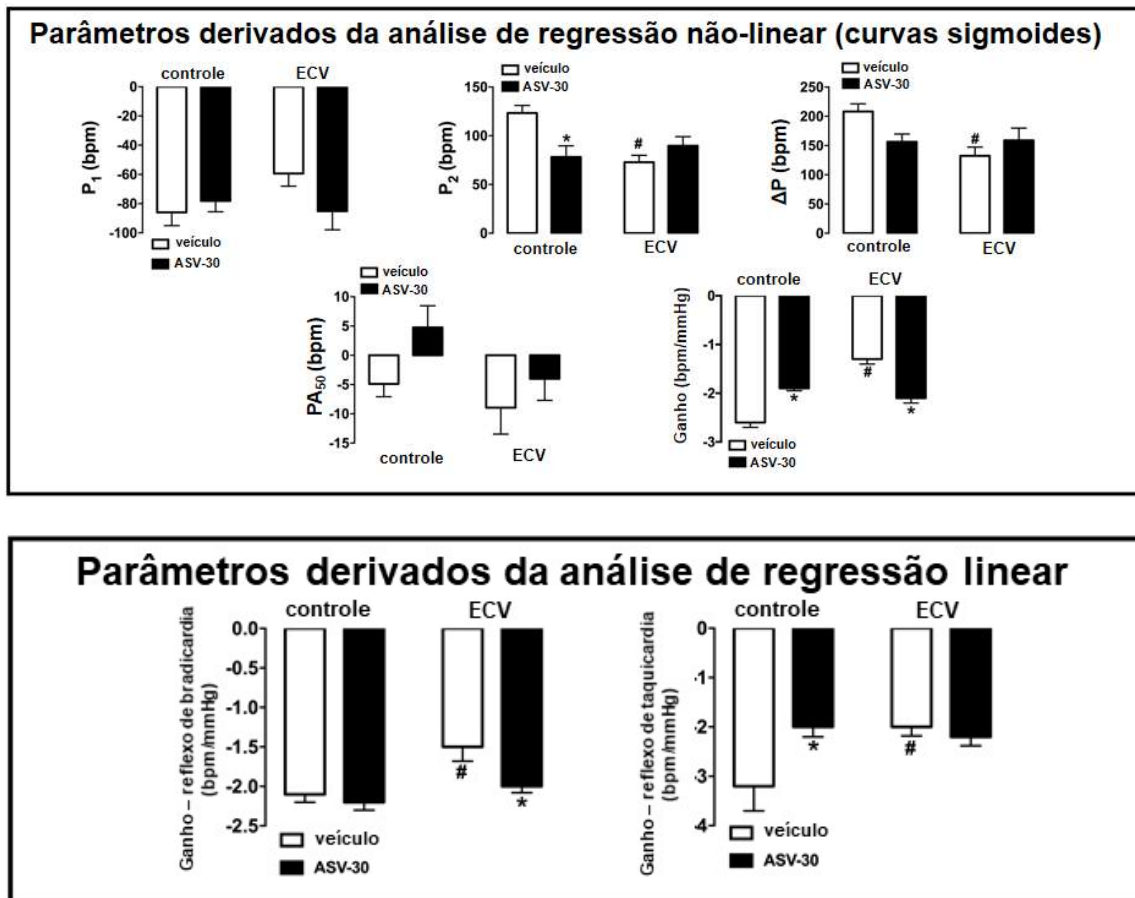
**Tabela 6:** Parâmetros derivados das curvas sigmóides do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina) ou do antagonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, no NLET. Dados são apresentados como média± EPM. Anova bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. \* p<0,05 versus respectivo grupo veículo, # p<0,05 versus respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni (n=10-11/grupo).

Grupo	Ganho Fenilefrina (bpm/mmHg)	Ganho NPS (bpm/mmHg)
<i>Não-estressado</i>		
<u>Veículo</u>	-2,1±0,1	-3,2±0,5
<u>Antisauvagine-30</u>	-2,2±0,1	<b>-2,0±0,2*</b>
<i>ECV</i>		
<u>Veículo</u>	<b>-1,5±0,2#</b>	<b>-2,0±0,2#</b>
<u>Antisauvagine-30</u>	<b>-2,0±0,1*</b>	-2,2±0,2
<i>Fator</i>		
<u>Estresse</u>	F <sub>(1,37)</sub> =10 <b>p=0,0029</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 3 p>0,05
<u>Tratamento</u>	F <sub>(1,37)</sub> = 6 <b>p=0,0218</b>	F <sub>(1,37)</sub> = 3 p>0,05
<u>Interação</u>	F <sub>(1,37)</sub> = 2,6 p>0,05	F <sub>(1,37)</sub> = 5,7 <b>p=0,0223</b>

**Tabela 7:** Parâmetros derivados das curvas de regressão linear do barorreflexo geradas em ratos não-estressados e submetidos ao estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina) ou do antagonista seletivo do receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30, no NLET. Dados são apresentados como média± EPM. Anova bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. \* p<0,05 *versus* respectivo grupo veículo, # p<0,05 *versus* respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni (n=10-11/grupo).



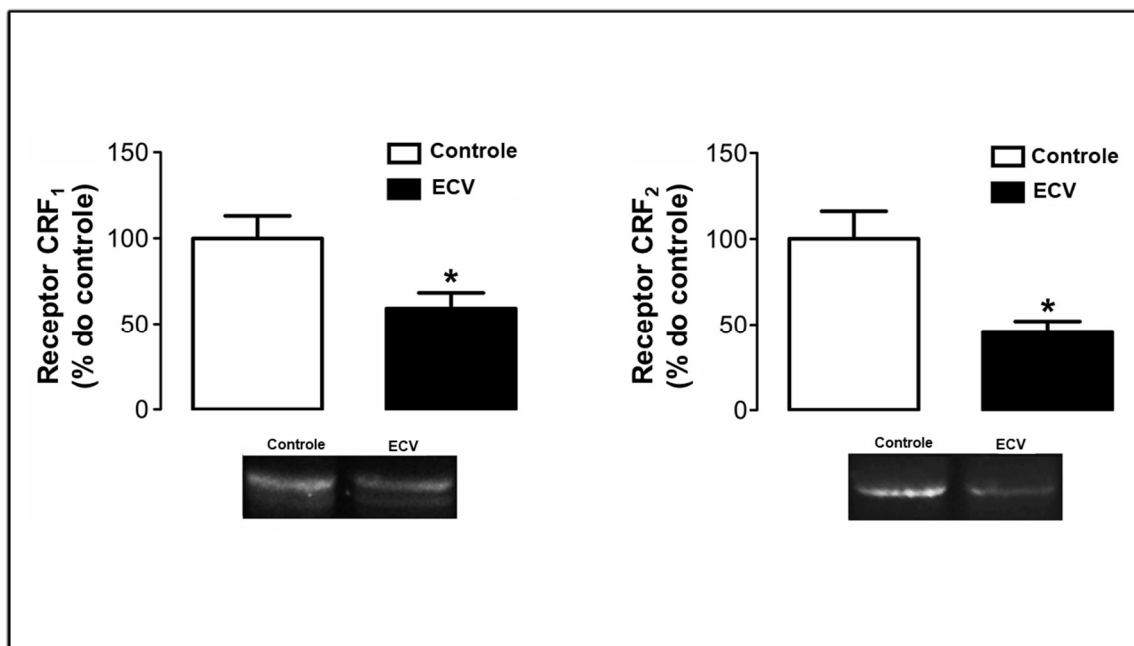
**Figura 22:** Análise de regressão não-linear (gráfico à esquerda) e linear (gráfico à direita) da função do barorreflexo correlacionando as alterações da PAM ( $\Delta PAM$ ) e a resposta reflexa da FC ( $\Delta FC$ ) de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina) ou antisauvagine-30, antagonista seletivo de receptor  $CRF_2$  no NLET. Os símbolos na curva sigmoide (gráfico à esquerda) indicam a BP50. Aumentos e quedas na PAM foram induzidas pela infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio respectivamente.



**Figura 23:** Parâmetros derivados da análise das curvas de regressão não-linear (A) e linear (B) do barorreflexo de ratos controle e submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (ECV) e que receberam a microinjeção de veículo (salina, barras brancas) ou antisauvagine-30 (barras pretas, antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>) no NLET. \*  $p < 0,05$  versus respectivo grupo veículo, #  $p < 0,05$  versus respectivo grupo controle, ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni (n=10-11/grupo).

### 6.3. Efeitos do ECV sobre a expressão de receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> do NLET

A análise demonstrou que o ECV reduziu os níveis proteicos dos receptores CRF<sub>1</sub> ( $t=2,4$ ;  $df=12$ ;  $p=0,0350$ ) e CRF<sub>2</sub> ( $t=2,8$ ;  $df=12$ ;  $p=0,0170$ ) do NLET, quando comparados ao grupo controle (Figura 24).



**Figura 24:** Expressão dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> do NLET de ratos controle (barras brancas) e expostos ao protocolo de ECV (barras fechadas). As barras representam o erro  $\pm$ EPM. \* $p < 0,05$ , teste-t de Student ( $n=6-8$ / grupo). A figura também mostra os blots de receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> de animais representativos controle e ECV.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados reportados no presente estudo são a primeira evidência do papel da neurotransmissão CRF do NLET sobre as alterações autônomas e cardiovasculares provocadas pelo estresse crônico. Nesse sentido, identificamos que a exposição ao ECV por 10 dias elevou a pressão arterial e levou ao prejuízo da função do barorreflexo. A microinjeção bilateral do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395 no NLET reduziu os componentes taquicárdico e bradicárdico do barorreflexo nos animais não estressados (controle). Além disso, o tratamento farmacológico com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 reduziu o reflexo de taquicardia nos animais controle, sem alterar o reflexo de taquicardia. O antagonismo dos receptores CRF<sub>1</sub> do NLET não alterou a resposta do barorreflexo em ratos expostos ao ECV. Entretanto, o tratamento no NLET com o antagonista CRF<sub>2</sub> elevou a resposta bradicárdica nos ratos cronicamente estressados, mas sem afetar o reflexo de taquicardia. Por fim, identificamos que o ECV reduziu a expressão dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET.

Os efeitos dos tratamentos farmacológicos do NLET com os antagonistas dos receptores CRF sobre as respostas barorreflexas observadas nos animais controle, indica que esse mecanismo neuroquímico no NLET desempenha um papel facilitatório sobre as respostas de FC do barorreflexo. Esses achados estão de acordo com os resultados reportados no *Capítulo 1*, que se encontram publicados (OLIVEIRA et al., 2017), onde identificamos que o tratamento local do NLET com os antagonistas seletivos dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> reduziu as respostas de FC do barorreflexo, o que indica um envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET na geração das respostas cardíacas do barorreflexo.

Os resultados a respeito da redução nas respostas de FC do barorreflexo após a exposição ao ECV corroboram com dados anteriores do nosso grupo, que evidenciaram comprometimento na atividade do barorreflexo em animais expostos a esse estressor crônico (ALMEIDA et al., 2015; DUARTE et al., 2015; FIRMINO et al., 2019; VIEIRA et al., 2018). Resultados reportados por outros autores indicaram que o ECV também reduz respostas reflexas do nervo simpático lombar (GRIPPO et al., 2008). Os achados de aumento na pressão

arterial basal nos animais submetidos ao ECV também estão de acordo com estudos anteriores (GRIPPO et al., 2002; GRIPPO et al., 2008), incluindo resultados prévios do nosso grupo (DUARTE et al., 2015). O comprometimento da atividade do barorreflexo tem sido relacionado com o desenvolvimento e progressão da hipertensão (CHAPLEAU, 2012; GRASSI et al., 2006), e é associado com aumentos da atividade simpática (GRASSI, 2004). Desse modo, o aumento na pressão arterial induzido pelo ECV pode estar relacionado com a redução das respostas cardíacas do barorreflexo. Outro fator que pode estar associado com o aumento da pressão arterial é a disfunção vascular, sendo relacionada ao comprometimento do endotélio e dilatação anormal dos vasos sanguíneos (TANG et al., 2010; DUARTE et al., 2015). Nesse sentido, um estudo prévio do nosso grupo não encontrou diferenças na resposta pressora à infusão intravenosa de um agente vasoconstrictor (fenilefrina), porém foi reportado comprometimento na resposta depressora aos agentes vasodilatadores acetilcolina e nitroprussiato de sódio (DUARTE et al., 2015). Desse modo, apesar dos resultados reportados aqui indicarem um envolvimento de comprometimento na atividade barorreflexa no aumento da pressão arterial induzida pelo ECV, nós não podemos descartar o envolvimento de outros mecanismos.

A porção anterior do NLET tem sido descrita como uma região crítica no controle da atividade autônoma e da função cardiovascular (DONG et al., 2001; CRESTANI et al., 2013). Além disso, foram identificados terminais contendo CRF, bem como fibras imunorreativas para urocortina 1 e urocortina 3 na porção anterior do NLET (BITTENCOURT et al., 1999; LI et al., 2002). Como mencionado anteriormente (ver em *Aspectos Gerais*), o CRF possui maior seletividade para o receptor CRF<sub>1</sub>, a urocortina 1 liga-se de maneira similar a ambos os receptores, e a urocortina 3 liga-se seletivamente ao receptor CRF<sub>2</sub> (HAUGER et al., 2003). Desse modo, os sítios de injeção dos tratamentos farmacológicos, bem como as amostras para quantificação da expressão dos receptores CRF, centraram-se em regiões anteriores do NLET no presente estudo.

Diversos estressores crônicos, incluindo o ECV, tem demonstrado aumentar a expressão dos receptores CRF no NLET (ALBERCHET-SOUZA et al., 2017; CHOI et al., 2006; DE ANDRADE et al., 2018; KIM et al., 2006; STOUT et al., 2000; TRAN et al., 2014; VENTURA-SILVA et al., 2012; CHAPPELL et al.,



1986). Entretanto, informações acerca do efeito sobre a expressão dos receptores CRF são limitadas. Nesse sentido, Ventura-Silva e colaboradores (2012) reportaram que os níveis locais de RNAm do receptor CRF<sub>1</sub> foram reduzidos e do receptor CRF<sub>2</sub> foi aumentada no NLET após a exposição a um protocolo de 4 semanas de ECV. Já Hu e colaboradores (2020) reportaram aumento de RNAm de receptor CRF<sub>1</sub>, sem alteração de RNAm de receptor CRF<sub>2</sub> em camundongos expostos a 6 semanas de ECV. Apesar dos nossos achados de redução na expressão do receptor CRF<sub>2</sub> contrastarem com esses resultados prévios, é importante destacar que os nossos dados são os primeiros a fornecerem evidências dos efeitos do ECV sobre os níveis proteicos dos receptores CRFérgicos no NLET. Além disso, os efeitos dos estressores podem depender do tipo de estressor crônico, uma vez que estudos recentes reportaram aumento na expressão proteica dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET após a exposição por 7 dias ao modelo de “estresse de evitar água” (animais são colocados em plataforma montada no centro de um recipiente com água) (TRAN et al., 2014). Apesar disso, estudos que avaliaram protocolos de estresse social identificaram que a derrota social por 20 dias em camundongos não afetou os níveis de RNAm dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET (ALBRECHET-SOUZA et al., 2017), enquanto que um protocolo de 10 semanas de pistas associadas ao predador aumentaram o conteúdo de mRNA do receptor CRF<sub>1</sub> e reduziu o mRNA de receptor CRF<sub>2</sub> no NLET de ratos suscetíveis (ELHARRAR et al., 2013).

Estudos prévios indicaram aumento nos níveis de CRF no NLET após a exposição a protocolos de ECV (STOUT et al., 2000; KIM et al., 2006; VENTURA-SILVA et al., 2012). Além disso, foi reportado aumento na ativação de neurônios CRF no NLET em animais expostos ao ECV (HU et al., 2020; KORMOS et al., 2016). Nesse sentido, uma vez que os receptores CRF possam ser internalizados após sua ativação (WOOD & WOODS, 2007), é possível que a diminuição da expressão do receptor CRF identificada no presente estudo pode ser devida a ativação repetida do receptor a cada sessão de estresse. Assim, estudos prévios reportaram que a superexpressão de CRF no NLET reduz a densidade de ligação do receptor CRF<sub>1</sub> e RNAm (REGEU et al., 2011; SINK et al., 2013). Entretanto, outros autores reportaram que a superexpressão de CRF no NLET aumentou os níveis locais de RNAm de receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> (Qi, 2016). A ideia do aumento local de CRF no NLET não mediar a

diminuição da expressão de receptores CRF identificados no presente estudo é ainda apoiada por evidências em que o aumento do conteúdo CRF e dos neurônios positivos para CRF no NLET de animais submetidos ao estresse crônico foi seguido pelo aumento da expressão dos receptores CRF (HU et al., 2020; TRAN et al., 2014). Portanto, mais estudos são necessários para avaliar os possíveis mecanismos relacionados a reduções dos níveis de receptores CRF por ECV.

De maneira interessante, os achados de redução na expressão dos receptores CRF no NLET foram acompanhados da identificação de que a exposição ao protocolo de ECV inibiu completamente o controle da atividade do barorreflexo pelos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET. De fato, os efeitos de redução das respostas de FC do barorreflexo identificadas nos animais controle tratados com CP376395 e antisauvagine-30 no NLET não foram observados nos animais ECV. Em conjunto, esses achados indicam que a ausência de controle da atividade do barorreflexo pelos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET nos animais cronicamente estressados, está possivelmente relacionada com uma redução na expressão desses receptores em neurônios do NLET envolvidos no controle da atividade barorreflexa. De fato, alterações dos níveis locais de CRF parecem não mediar essas alterações, uma vez que níveis elevados de CRF, ativação e número de neurônios positivos para CRF foram relatados no NLET após a exposição ao ECV (HU et al., 2020; KIM et al., 2006; KORMOS et al., 2016; STOUT et al., 2000; VENTURA-SILVA et al., 2012). Entretanto, um estudo recente reportou aumento em potenciais pós-sinápticos inibitórios em neurônios CRF no NLET após a exposição a um protocolo de ECV (PARTRIDGE et al., 2016), de modo que nós não podemos excluir a possibilidade de que uma redução na liberação local de CRF também contribua para o comprometimento no controle barorreflexo pela neurotransmissão CRFérgica no NLET em animais expostos ao ECV.

O aumento no ganho da curva sigmoide e do *slope* na regressão linear do reflexo de bradicardia nos animais cronicamente estressados, tratados com antisauvagine-30 no NLET, claramente indicam um envolvimento dos receptores CRF<sub>2</sub> do NLET sobre o prejuízo do barorreflexo provocado pelo ECV. Desse modo, a inibição dos efeitos da função do barorreflexo no tratamento farmacológico no NLET com os antagonistas CRF<sub>1</sub> ou CRF<sub>2</sub> identificados nos

animais submetidos ao ECV, bem como a similaridade entre os animais controle tratados com CP376395 *versus* ratos tratados com veículo no NLET, indicam que os receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET estão envolvidos com o prejuízo do barorreflexo provocado por ECV.

Um estudo prévio reportou que a administração intracerebroventricular repetida de um antagonista não-seletivo de receptores CRFérgicos antes de cada uma de cinco sessões de estresse por restrição inibiu a facilitação da atividade do barorreflexo induzida por esse estressor crônico (CONTI et al., 2001). Outro estudo documentou que o tratamento sistêmico (s.c.) com antagonista do receptor CRF<sub>1</sub> antes de cada uma de 7 sessões de estresse de derrota social inibiu a redução da variabilidade da FC induzida por esse estressor crônico (WOOD et al., 2012). Esses achados corroboram com nossos dados, uma vez que a redução da expressão dos receptores CRF identificados no presente estudo pode estar relacionada com o aumento da ativação do receptor CRF (WOOD & WOODS, 2007). De fato, essa redução da expressão dos receptores CRF pode ser resultado da ativação repetida do receptor ao longo das sessões de estresse. Então o tratamento com antagonista de receptor CRF antes de cada sessão pode ter evitado a *downregulation*, inibindo as alterações das respostas cardiovasculares provocadas por estresse. Entretanto, nossos resultados promovem a primeira evidência de um sítio específico no sistema nervoso central através do qual a neuroplasticidade na neurotransmissão CRF ocorre para afetar a função cardiovascular em animais cronicamente estressados. Além disso, essas são as primeiras evidências sobre o envolvimento do receptor CRF<sub>2</sub> sobre a disfunção cardiovascular provocada por estresse crônico.

## 8. CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstram que a neurotransmissão CRFérgica do NLET modula as respostas do barorreflexo de maneira facilitatória em ratos não-estressados. Além disso, o comprometimento da atividade barorreflexa causada pelo ECV é mediado, ao menos em parte, por redução na expressão dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET.

## **9. REFERÊNCIAS**

Albrechet-Souza L, Viola TW, Grassi-Oliveira R, Miczek KA, de Almeida RMM. Corticotropin Releasing Factor in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in Socially Defeated and Non-stressed Mice with a History of Chronic Alcohol Intake. *Front Pharmacol.* 8:762, 2017.

Almeida J, Duarte JO, Oliveira LA, Crestani CC. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. *Stress.* 18(4): 462-74, 2015.

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

Carnevali L, Montano N, Statello R, Sgoifo A. Rodent models of depression-cardiovascular comorbidity: Bridging the known to the new. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76, 144–153, 2017.

Chapleau MW. Baroreceptor reflexes, in: *Primer on the autonomic nervous system.* Elsevier 161-165, 2012.

Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, Bissette G, Ritchie J, Anderson C, Nemeroff CB. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci.* 6(10):2908-14, 1986.

Choi D, Nguyen M, Tamashiro K, Ma L, Sakai R, Herman J. Chronic social stress in the visible burrow system modulates stress-related gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol. Behav.* 89, 301–310, 2006.

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.

Conti LH, Shannon MH, Murry JD, Printz MP. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides.* 35(2):71-81, 2001.

Crestani CC, Alves FH, Gomes FV, Resstel LB, Correa FM, Herman JP. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr Neuropharmacol.* 11(2):141-59, 2013.

D'audiffret AC, Frisbee SJ, Stapleton PA, Goodwill AG, Isingrini E, Frisbee JC. Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? *J Appl Physiol.*, v.108, n.5, p.1041-51, 2010.

de Andrade JS, Céspedes IC, Abrão RO, da Silva JM, Ceneviva R, Ribeiro DA, Bittencourt JC, Viana MB. Effects of acute restraint and unpredictable chronic mild stress on brain corticotrophin releasing factor mRNA in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 337:139-150, 2018.

Dong, H.W.; Petrovich, G.D.; Swanson, L.W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38(1-2), 192-246, 2001.

Duarte, JO; Cruz, FC; Leão, RM; Planeta, CS; Crestani, CC. Stress vulnerability during adolescence: comparison of homotypic vs heterotypic chronic stress regimens. *Psychosom Med.*, 77(2):186-99, 2015.

Elharrar E, Warhaftig G, Issler O, Sztainberg Y, Dikshtein Y, Zahut R, Redlus L, Chen A, Yadid G. Overexpression of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 2 in the Bed Nucleus of Stria Terminalis Improves Posttraumatic Stress Disorder-like Symptoms in a Model of Incubation of Fear. *Biol. Psychiatry* 74, 827–836, 2013.

Farrell, T.G.; Paul, V.; Cripps, T.R.; Malik, M.; Bennett, E.D.; Ward, D. e Camm, A.J. Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients after acute myocardial infarction. *Circulation*, v.83, n.3, Mar, p.945-52. 1991.

Firmino EMS, Kuntze LB, Lagatta DC, Dias DPM, Resstel LBM. Effect of chronic stress on cardiovascular and ventilatory responses activated by both chemoreflex and baroreflex in rats. *J. Exp. Biol.* 222, jeb204883, 2019.

Flak JN, Jankord R, Solomon MB, Krause EG, Herman JP. Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiol Behav.* 104(2):228-34, 2011.

Golbidi S, Frisbee JC, Laher I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 308, H1476–H1498, 2015.

Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Facchini A, Ilardo V, Mancina G. Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. *J Hypertens.* 22:1747-53, 2004.

Grassi G, Trevano FQ, Seravalle G, Scopelliti F, Mancina G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. *Prog Cardiovasc Dis.* 48:407-15, 2006.

Grassi G. Sympathetic and Baroreflex Function in Hypertension: Implications for Current and New Drugs. *Curr. Pharm. Des.* 10, 3579–3589, 2004.

Grippe AJ, Beltz IG, Weiss RM, Johnson AK. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. *Biol Psychiatry* 1559(4) 309-16, 2006.

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

Grippe AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v.282, n.5, p.R1333-41, 2002.

Grippe AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom Med.* 70(4):435-43, 2008.

Grippe AJ, Santos CM, Johnson RF, Beltz TG, Martins JB, Felder RB, Johnson AK. Increased susceptibility to ventricular arrhythmias in a rodent model of experimental depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(2):H619-26, 2004.

Grippe AJ. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neurosci Biobehav Rev.*33(2):171-80, 2009.

Grippe AJ. The Utility of Animal Models in Understanding Links between Psychosocial Processes and Cardiovascular Health. *Soc. Personal. Psychol. Compass* 5, 164–179, 2011.

Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 55(1): 21-6, 2003.

Herman JP. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci* 7:61, 2013.

Hill MN, Hellemans KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(9):2085-117, 2012.

Honzikova N, Fiser B. Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. *Physiol Res.*58:605-12, 2009.

Hu P, Liu J, Maita I, Kwok C, Gu E, Gergues MM, Kelada F, Phan M, Zhou J-N, Swaab DF, Pang ZP, Lucassen PJ, Roepke TA, Samuels BA. Chronic stress induces maladaptive behaviors by activating corticotropin-releasing hormone signaling in the mouse oval bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci.* 40,2519-2537, 2020.

Irigoyen, M.C. e Krieger, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.9, 1213-20, 1998.

Isingrini E, Surget A, Belzung C, Freslon JL, Frisbee J, O'donnell J, Camu V, D'audiffret A. Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. *Physiol Behav.*, v.103, n.5, p.540-6, 2011.

Kim SJ, Park SH, Choi SH, Moon BH, Lee KJ, Kang SW, Lee MS, Choi SH, Chun BG, Shin KH. Effects of repeated tianeptine treatment on CRF mRNA expression in non-stressed and chronic mild stress-exposed rats. *Neuropharmacology.* 50(7):824-33, 2006.

Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience.* 330:335-58, 2016.

Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience* 330, 335–358, 2016.

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

Oliveira LA, Almeida J, Gomes-de-Souza L, Benini R, Crestani CC. CRF<sub>1</sub> and CRF<sub>2</sub> receptors in the bed nucleus of stria terminalis differently modulate the baroreflex function in unanesthetized rats. *Eur J Neurosci*, 2017 Jul;42(2):1805-1812, 2017.

Partridge JG, Forcelli PA, Luo R, Cashdan JM, Schulkin J, Valentino RJ, Vicini S. Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology*. 107:239-250, 2016.

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

Qi X, Guzhva L, Yang Z, Febo M, Shan Z, Wang KKW, Bruijnzeel AW. Overexpression of CRF in the BNST diminishes dysphoria but not anxiety-like behavior in nicotine withdrawing rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 26(9):1378-1389, 2016.

Regev L, Neufeld-Cohen A, Tsoory M, Kuperman Y, Getselter F, Gil S, Chen A. Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles of extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Mol Psychiatry* 16, 714-728, 2011.

Roman CW, Lezak KR, Kocho-Schellenberg M, Garret MA, Braas K, May V, Hammack SE. Excitotoxic lesions of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuate the effects of repeated stress on weight gain: evidence for the recruitment of BNST activity by repeated, but not acute, stress. *Behav Brain Res*. 227(1):300-4, 2012.

Schaeuble D, Packard AEB, McKlveen JM, Morano R, Fourman S, Smith BL, Scheimann JR, Packard BA, Wilson SP, James J, Hui DY, Ulrich-Lai YM, Herman JP, Myers B. Prefrontal Cortex Regulates Chronic Stress-Induced Cardiovascular Susceptibility. *J. Am. Heart Assoc*. 8, e014451, 2019.

Sink KS, Walker DL, reeman SM, Flandreau EI, Ressler KJ, Davis M. Effects of continuously enhanced corticotropin releasing factor expression within the bed nucleus of the stria terminalis on conditioned and unconditioned anxiety. *Mol Psychiatry* 18, 309-318, 2013.

Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Elliott E, Chen A, Peeters BWMM, Roubos EW, Kozicz T. Chronic Stress Induces Sex-



Specific Alterations in Methylation and Expression of Corticotropin-Releasing Factor Gene in the Rat. *PLoS One* 6, e28128, 2011.

Stout SC, Mortas P, Owens MJ, Nemeroff CB, Moreau J. Increased corticotropin-releasing factor concentrations in the bed nucleus of the stria terminalis of anhedonic rats. *Eur J Pharmacol.*401(1):39-46, 2000.

Takase B, Kurita A, Noritake M, Uehata A, Maruyama T, Nagayoshi H, Nishioka T, Mizuno K e Nakamura H. Heart rate variability in patients with diabetes mellitus, ischemic heart disease and congestive heart failure. *J Electrocardiol* v25 n2 p 79-88, 1992.

Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch* 459995-1004, 2010.

Tran L, Schulkin J, Greenwood-Van Meerveld B. Importance of CRF receptor-mediated mechanisms of the bed nucleus of the stria terminalis in the processing of anxiety and pain. *Neuropsychopharmacology.* 39(11):2633-45, 2014.

Ventura-Silva AP, Pêgo JM, Sousa JC, Marques AR, Rodrigues AJ, Marques F, Cerqueira JJ, Almeida OF, Sousa N. Stress shifts the response of the bed nucleus of the stria terminalis to an anxiogenic mode. *Eur J Neurosci.* 36(10):3396-406, 2012.

Vieira JO, Duarte JO, Costa-Ferreira W, Morais-Silva G, Marin MT, Crestani CC. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 81: 426-437, 2018.

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 134(4):319-29, 1997.

Willner, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural/neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 52(2):90-110, 2005.

Wood SK, McFadden KV, Grigoriadis D, Bhatnagar S, Valentino RJ. Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology (Berl).* 222(2):325-36, 2012.

Wood SK, Woods JH. Corticotropin-releasing factor receptor-1: a therapeutic target for cardiac autonomic disturbances. *Expert Opin Ther Targets*. 11(11):1401-13, 2007

## *Capítulo 4*

*Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do núcleo leito da estria terminal (NLET) na resposta comportamental anedônica induzida por estresse crônico variado (ECV).*

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos clínicos e pré-clínicos têm indicado extensa comorbidade entre algumas doenças psiquiátricas, como ansiedade, depressão e complicações cardiovasculares (GLASSMAN, 2007; GRIPPO 2009; ALBUS, 2010; SGOIFO et al., 2014; COHEN et al., 2015). Os resultados pré-clínicos que fundamentam essa associação demonstram que as alterações na função cardiovascular e na atividade autônoma induzidas por estressores crônicos são consistentemente acompanhadas de alterações em comportamentos relacionados à ansiedade e depressão, e uma correlação positiva é observada entre as respostas cardiovasculares/autônomas e comportamentais (GRIPPO, 2009; SGOIFO et al., 2014; CARNEVALLI et al., 2017).

Especificamente com relação ao mecanismo neuroquímico investigado no presente estudo (i.e., neurotransmissão CRFérgica), apesar de estudos anteriores reportarem um envolvimento desse mecanismo neuroquímico na comorbidade (problemas cardiovasculares/depressão), ao investigar o efeito do tratamento sistêmico (subcutâneo) com um antagonista do receptor CRF<sub>1</sub> em ratos submetidos a protocolo crônico de estresse de derrota social (WOOD et al., 2012), os sítios específicos no encéfalo relacionados com o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica na relação doença cardiovascular e transtornos psiquiátricos ainda é pouco compreendido. Desse modo, nossa proposta nesse estudo foi investigar o envolvimento dos receptores CRF<sub>1</sub> do NLET na resposta de anedonia comportamental induzida pelo ECV.

## **2. OBJETIVO**

Investigar o envolvimento dos receptores CRF<sub>1</sub> do NLET sobre a resposta comportamental anedônica induzida por estresse crônico variado (ECV).

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Animais**

Como descrito no Capítulo 1, item 3.1.

### **3.2. Cirurgia de estereotaxia**

Como descrito no Capítulo 1, item 3.2.

### **3.3. Drogas e soluções**

O CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF<sub>1</sub> (Tocris, EUA), o tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich, EUA) foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fountora-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina-meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

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

Como descrito no Capítulo 1, item 3.6

### **3.5. Determinação dos sítios de injeção no NLET**

Como descrito no Capítulo 1, item 3.8.

### **3.6 Teste de preferência à sacarose**

A anedonia, conceituada como a incapacidade de sentir prazer, foi avaliada por meio do teste de consumo/preferência à sacarose, de acordo com protocolo descrito por HAYASE, 2011. O teste foi iniciado 24 horas após o término do protocolo de ECV, e consistiu de duas fases: habituação e teste. No primeiro dia da fase de habituação, os animais foram expostos a dois bebedouros contendo sacarose na concentração de 2% (v/v), os quais foram colocadas no início do ciclo escuro (19 horas) e foram mantidas por 24 horas. Em seguida, as duas garrafas contendo sacarose foram substituídas por duas garrafas contendo água, e os animais tiveram acesso às garrafas com água por 24 horas (dia 2 da habituação).

Após o fim da habituação, os animais foram testados quanto à preferência pela solução de sacarose. Para tanto, dois bebedouros foram oferecidos aos animais, um contendo sacarose na concentração de 2% e outro contendo água. O consumo foi medido durante as 3 primeiras horas e nas 21 horas seguintes por meio da medida da massa dos bebedouros antes e após a exposição aos animais. Após os primeiros 90 minutos da medida de consumo por 3 horas, a posição dos bebedouros na gaiola foi trocada para controle da preferência dos animais por um dos lados da gaiola. A quantidade de líquido perdida nos bebedouros por vazamento ou evaporação foi aferida por meio de bebedouros colocados em gaiolas vazias no mesmo momento em que as soluções foram disponibilizadas aos animais. A quantidade perdida nessas gaiolas vazias foi subtraída da medida obtida das garrafas expostas aos animais.

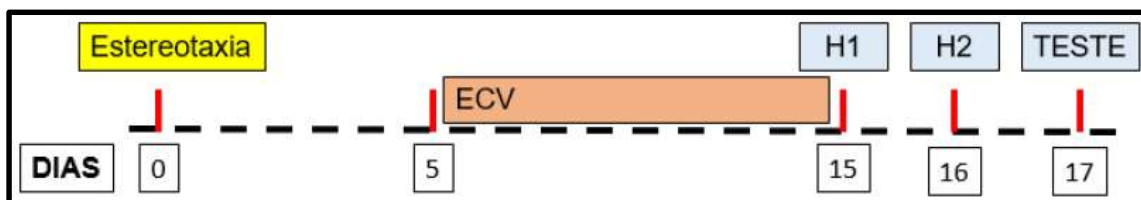
Os valores de consumo de sacarose foram expressos em relação à massa do animal (g/kg) nas primeiras 3 horas e durante o período de 24 horas. A preferência pela solução de sacarose foi calculada como a quantidade total de solução de sacarose consumida/quantidade total de líquidos consumida x 100.

#### **4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

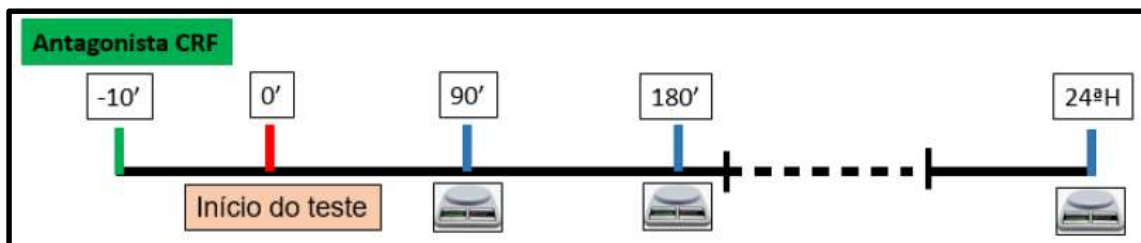
Ratos Wistar com peso em média de 250g foram submetidos à cirurgia de estereotaxia, como descrito no Capítulo 1 (item 3.2). Após 4 dias de recuperação, os animais foram expostos ao protocolo de ECV, como descrito no Capítulo 3 (item 3.5). Os animais controle foram deixados no biotério sem serem

perturbados, exceto durante a limpeza das caixas no biotério no mesmo período que os ratos ECV.

Vinte e quatro horas após o término ECV foi iniciada a fase de habituação do teste de preferência à sacarose. Após o término da fase de habituação, grupos independentes de animais submetidos ao ECV e controle receberam a microinjeção bilateral no NLET de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP 376395 (5,0nmol/100nl), antagonista seletivo de receptor CRF<sub>2</sub>, antisauvagine-30 (5,0nmol/100nl), ou veiculo (100nl, salina) (Figuras 25 e 26). Dez minutos após o tratamento farmacológico no NLET, todos os ratos foram testados quanto à preferência pela solução sacarose por até 24 horas (Figuras 25 e 26).



**Figura 25:** Representação do experimento e teste de preferência à sacarose em dias. ECV: Estresse Crônico Variado; H1: Primeiro dia de habituação; H2: Segundo dia de habituação.



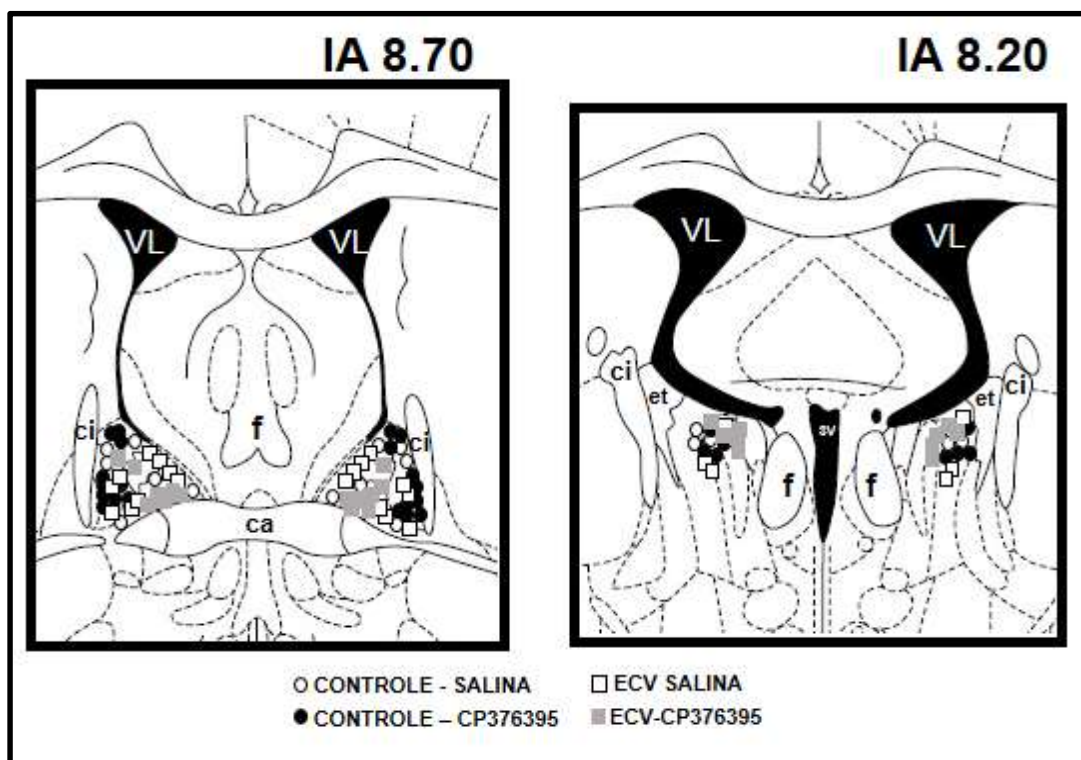
**Figura 26:** Linha do tempo do dia do teste de preferência à sacarose. As balanças representam o momento da pesagem das garrafas.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos média±erro padrão da média (EPM). Os dados de consumo e preferência à sacarose foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) bifatorial, com estresse (controle vs ECV) e tratamento (veículo vs fármacos) como fatores independentes. O pós-teste de Bonferroni foi utilizado para identificar a diferença entre os grupos. Os valores dos testes estatísticos com valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS

A representação diagramática baseada no atlas de Paxino & Watson (1997) do encéfalo de rato indicando os sítios de microinjeção no NLET de CP376395 ou salina de todos os ratos utilizados neste experimento estão representados na figura 27.



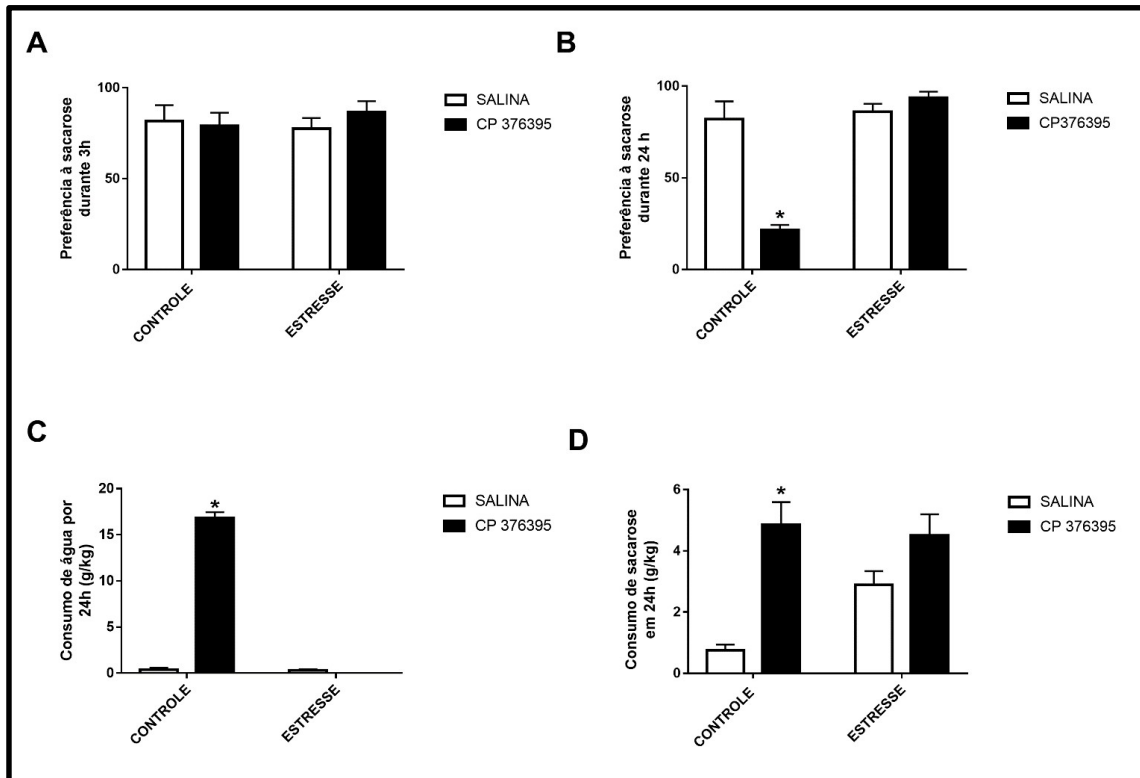
**Figura 27:** Representação diagramática baseada no atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (1997), indicando os sítios de microinjeção bilateral no NLET de antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395 (5nmol/100nl) ou salina (100nl) em ratos controle ou cronicamente estressados. IA: coordenada interaural; ac: comissura anterior; cc: corpo caloso; ECV: estresse crônico variado; et: estria terminal; f: fórnix; ic: cápsula interna; VL: ventrículo lateral.

A análise não indicou efeitos do estresse ( $F_{(1,45)=0,05}$ ;  $p>0,05$ ) ou do tratamento ( $F_{(1,45)} = 0,6$ ;  $p>0,05$ ) na preferência de sacarose durante as 3 horas do teste (Figura 28; quadro A). Entretanto, ao avaliar a preferência pela sacarose por 24 horas houve apenas efeito do tratamento ( $F_{(1,45)}=28$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 28; quadro B). A análise *post-hoc* indicou efeito nos animais controle que



receberam o tratamento farmacológico no NLET ( $p < 0,0001$ ), mas não nos animais estressados cronicamente ( $p > 0,05$ ) (Figura 28; quadro B).

Com esse resultado, decidimos observar os efeitos do estresse e do tratamento farmacológico no NLET sobre o consumo de sacarose e de água no período de 24 horas. A análise estatística revelou que houve apenas efeito do tratamento ( $F_{(1,45)}=20$ ,  $p < 0,0001$ ) sobre o consumo de sacarose em 24 horas (Figura 28; quadros C e D). O pós-teste revelou que esse aumento do consumo ocorreu no grupo controle tratado farmacologicamente no NLET ( $p < 0,0001$ ) (Figura 28; quadro D). No mesmo sentido, quando foi avaliado o consumo de água em 24 horas, a análise indicou apenas efeito do tratamento ( $F_{(1,45)}= 443$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 28, quadro C). A análise pós-hoc revelou que essa diferença está no grupo controle que recebeu o tratamento farmacológico no NLET ( $p < 0,001$ ) (Figura 28, quadro C).



**Figura 28:** Preferência pela sacarose em ratos controle e cronicamente estressados (ECV) tratados com salina (100nl) (barras brancas) ou com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395 (barras pretas). A: Representa a preferência pela sacarose em 3 horas; B: Representa a preferência pela sacarose em 24 horas; C: representa o consumo de água em 24 horas; D: Representa o consumo de sacarose em 24 horas.\* representa a diferença de seu respectivo controle. *Controle + veículo, n=9; Controle + CP376395, n=14; Estressado + veículo, n=12; Estressado+CP376395, n=14.*

## **7. DISCUSSÃO**

A exposição de ratos ao protocolo de ECV por dez dias não produziu redução na preferência pela sacarose e, conseqüentemente, não houve anedonia. Por sua vez, o tratamento farmacológico no NLET com antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>, CP376395, promoveu redução da preferência pela sacarose apenas em ratos não-estressados, e efeito que foi relacionado com aumento no consumo de água e de sacarose durante o período de 24 horas.

A ausência de anedonia nos ratos expostos ao protocolo de 10 dias de ECV contrasta com dado prévio de nosso grupo (COSTA-FERREIRA et al., 2019). A razão para a ausência desse efeito não é clara, mas pode estar relacionada à metodologia. Diferentemente de estudos prévios, os ratos no presente estudo foram submetidos à cirurgia de estereotaxia e tratamento farmacológico no NLET momentos antes do teste. Portanto, a manipulação anterior ao teste pode ter tamponado os efeitos do estresse. Entretanto, mais estudos são necessários para caracterizar o papel de neurotransmissões no sistema nervoso central sobre as respostas de anedonia desencadeadas por estresse.

De maneira surpreendente, a microinjeção de antagonista CRF<sub>1</sub> no NLET em ratos não-estressados reduziu a preferência pela sacarose e aumentou o consumo de água e sacarose durante o teste. Foi demonstrado que a lesão do NLET produziu aumento no consumo diário de água (128%) e de ração (23%) em ratos (PIZZI & LORENS, 1967). Além disso, esse núcleo tem um papel em induzir anorexia mediada por estresse, e está associado com reduções no ganho de peso (CHOI et al., 2008; CHOI et al., 2007; ROMAN et al., 2012). Nesse sentido, um estudo reportou que a infusão de CRF no NLET foi capaz de produzir anorexia (CICCOCIOPPO et al., 2003). Desse modo, não sabemos se o tratamento com antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> no NLET pode ter aumentado o consumo de ração, e conseqüentemente ter aumentado o consumo de água. Assim, a partir de nossos resultados, estudos futuros são necessários para investigar esse efeito sobre o consumo de água mediado pelo antagonismo dos receptores CRF<sub>1</sub> no NLET.

## **8. CONCLUSÃO**

Os achados que estão presentes nesse capítulo demonstram que esse protocolo de ECV não foi capaz de produzir as respostas anedônicas que eram esperadas. Além disto, os receptores CRF<sub>1</sub> do NLET estão envolvidos no aumento de consumo de água e de sacarose apenas em ratos não foram submetidos ao protocolo de ECV.

## **9. REFERÊNCIAS**

Albus C. Psychological and social factors in coronary hart disease. *Ann Med*, 42 (7), 787-94, 2010.

Carnevali L, Montano N, Statello R, Sgoifo A. Rodent models of depression-cardiovascular comorbidity: bringing the known to the new. *Neurosci Biobehav Rev*, 76 (Pt A), 144-153.

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: 818–826, 2008.

Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, 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: 2025–2034, 2007.

Ciccocioppo R, Fedeli A, Economidou D, Policani F, Weiss F, Massi M. The bed nucleus is a neuroanatomical substrate for the anorectic effect of corticotropin-releasing factor and for its reversal by nociception/orphanin FQ. *J Neurosci*, 23 (28), 9445-51, 2003.

Cohen B, Edmondson D, Kronish IM. State of the art review: depression, stress, anxiety and cardiovascular disease. *Am J Hyperts*, 28 (11), 1295-302, 2015.

Costa-Ferreira F, Morais-Silva G, Gomes-de-Souza L, Marin MT, Crestani CC. The AT1 receptor antagonist losartan does not affect depressive-like state and memory impairment evoked by chronic stressors in rats. *Front Pharmacol*, 10, 705, 2019.

Glassman AH. Depression and cardiovascular comorbidity. *Dialogues Clin Neurosci*, 9 (1), 9-17, 2007.

Grippe AJ. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, 33 (2), 171-80, 2009.

Hayase, T. Depression-related anhedonic behaviors caused by immobilization stress: a comparison with nicotine-induced depression-like behavioral alterations and effects of nicotine and/or "antidepressant" drugs. *The Journal of toxicological sciences*, v. 36, n. 1, p. 31-41, 2011.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3 ed Academic Press Sidney, Australia, 1997.

Pizzi WJ, Lorens SA. Effects of lesions in the amygdalo-hippocampo-septal system on food and water intake in the rat. *Psychonomic Science*, volume 7, issue 5, pp 187-188, 1967.

Roman CW, Lezak KR, Kocho-Schellenberg M, Garret MA, Braas K, May V et al (2012). Excitotoxic lesions of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuate the effects of repeated stress on weight gain: evidence for the recruitment of BNST activity by repeated, but not acute, stress. *Behav Brain Res* 227: 300–304, 2012.

Sgoifo A, Carnevali L, Grippe AJ. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 39, 51-60, 2014.

Wood SK, McFadden KV, Grigoradis D, Bhatnagar S, Valentino RJ. Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology (Berl)*, 222(2), 325-36, 2012.

## *Capítulo 5*

Experimento complementar

## 1. INTRODUÇÃO

Como descrito no capítulo 3, os resultados referentes ao *Wester-blotting* demonstraram que houve redução nos níveis dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> no NLET dos ratos expostos ao ECV. Entretanto como uma avaliação complementar, investigamos se a redução da expressão dos receptores CRF no NLET é seguida de alterações na disponibilidade do neurotransmissor. Como o próprio NLET é uma fonte importante de CRF (SILBERMAN et al., 2013), uma atividade adicional desempenhada no laboratório da Dra. Wood foi analisar a quantidade de neurônios imunorreativos ao CRF no NLET de ratos controles e submetidos ao nosso protocolo de ECV. Os experimentos foram realizados no Brasil, e os encéfalos foram enviados aos EUA, para realização do ensaio no laboratório da Dra. Susan Wood.

## 2. OBJETIVO

Quantificar os neurônios imunorreativos CRF de ratos controle e expostos a um protocolo de ECV por 10 dias.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1 Animais

Como descrito no item 3.1, Capítulo 1.

### 3.2 Estresse crônico variado (ECV)

Como descrito no item 3.5, Capítulo 3.

### 3.3 Imunofluorescência

Os cérebros foram coletados, armazenados e enviados ao laboratório da Dra. Susan K. Wood no departamento de Farmacologia, Fisiologia e Neurociência da Faculdade de Medicina da Universidade da Carolina do Sul (SoM-USC) para o processamento. O encéfalo foi seccionado (30-40µm) em posição coronal e as cortes relacionadas ao NLET foram armazenadas em solução crioprotetora. As secções foram rinsadas por 3 vezes em solução PB e incubadas com 1% de borohidreto de sódio em PB (0,1M) por 30 minutos para remoção de aldeídos. Em seguida, os cortes foram rinsados 3 vezes em solução PBS-TX-BSA. O anticorpo primário (anticorpo CRF; Peninsula T-500, 1:2000) foi diluído em PBS-TX-BSA-Azida e incubado *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte, os cortes foram rinsados 3 vezes com PBS-TX-BSA e incubados com anticorpo secundário (*Rhodamine isothiocyanate-conjugated donkey anti-guinea pig*, 1:200) em temperatura ambiente por 2 horas em ausência de luz. Posteriormente, as secções foram rinsadas 3 vezes em TBS-TX e colocadas em lâminas e visualizadas no microscópio para quantificar CRF.

#### 4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratos Wistar foram submetidos ao protocolo de ECV por 10 dias em nosso laboratório (Laboratório de Farmacologia, Escola de Ciências Farmacêuticas, UNESP) enquanto que os animais controle foram deixados no biotério sem serem perturbados, exceto durante a limpeza das caixas no biotério no mesmo período que os ratos ECV. Vinte e quatro horas depois da última sessão de ECV, os animais foram eutanasiados e os cérebros foram rapidamente removidos, congelados e armazenados em freezer a -80°C até serem enviados pelos correios aos Estados Unidos da América (EUA) em uma caixa com gelo seco. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em um criostato e armazenados em solução crioprotetora e posteriormente foi realizada a imunofluorescência.

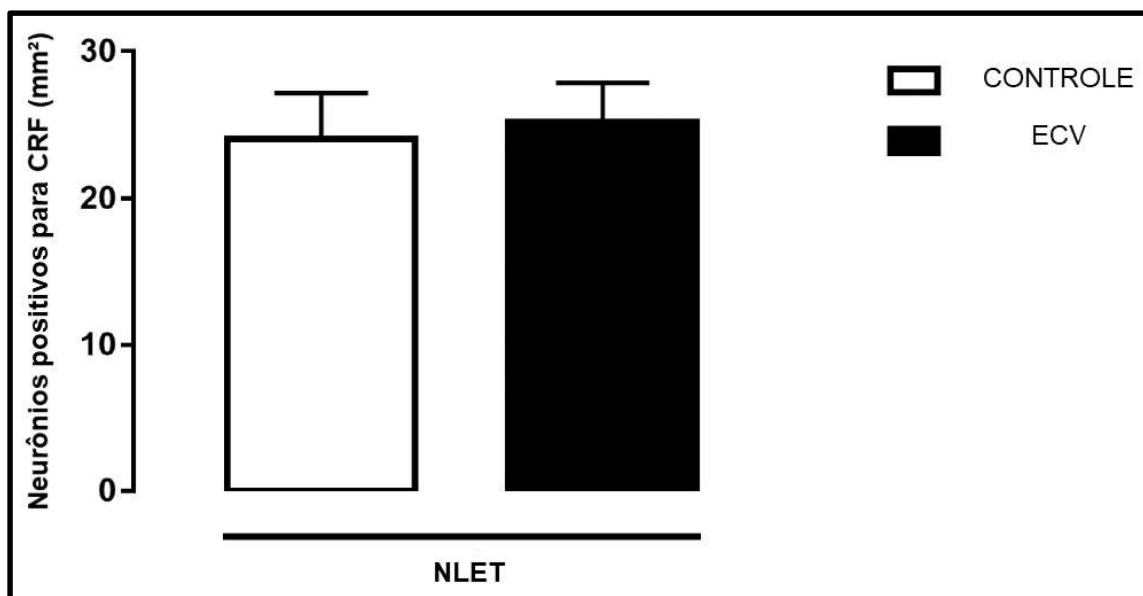
#### 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA



Os dados foram expressos como média±EPM. Todas as marcações foram contabilizadas através do software Image-J. A comparação dos valores obtidos entre os ratos controle e estressados foi realizada utilizando o teste t de *Student*.

## 6. RESULTADO

A exposição de ratos ao ECV não alterou o número de neurônios CRF no NLET ( $t=0,3$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 29).



**Figura 29:** Células positivas para CRF no núcleo leito da estria terminal (NLET) de ratos controle e de animais submetidos ao estresse crônico variado (ECV). (n=11/grupo, teste t de *Student*).

## 7. DISCUSSÃO

Apesar de algumas evidências de aumento de CRF no NLET em animais submetidos ao ECV (STOUT et al., 2000; KIM et al., 2006; VENTURA-SILVA et al., 2012), os achados no presente estudo estão alinhados com dados prévios que demonstraram que esse estressor crônico não alterou os níveis dos peptídeos CRF no NLET (CHAPPELL et al., 1986; DE ANDRADE et al., 2018). Entretanto, mesmo com número similar de neurônios CRF, não podemos excluir

a possibilidade de alterações locais dos níveis de CRF. Além disso, um estudo recente demonstrou o aumento na ativação de neurônios que expressam CRF no NLET em ratos expostos ao ECV (KORMOS et al., 2016), o que sugere que um aumento na neurotransmissão CRFérgica local pode ser observada mesmo na ausência de alterações no número de neurônios que expressam CRF e/ou nos níveis do peptídeo. Portanto, como a elevação da disponibilidade de CRF no NLET demonstrou aumentar os níveis de RNAm dos receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> locais (Qi et al., 2016), mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados com a redução da expressão dos receptores CRF no NLET seguido da exposição a estressores crônicos.

## **8. CONCLUSÃO**

A exposição de ratos a um protocolo de ECV por 10 dias não alterou o número de neurônios CRF no NLET.

## **9. REFERÊNCIAS**

Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, Bissette G, Ritchie J, Anderson C, Nemeroff CB. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci.* 6(10):2908-14-1986.

De Andrade JS, Céspedes IC, Abrão RO, da Silva JM, Ceneviva R, Ribeiro DA, Bittencourt JC, Viana MB. Effects of acute restraint and unpredictable chronic mild stress on brain corticotrophin releasing factor mRNA in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 337:193-150, 2018.

Kim SJ, Park SH, Choi SH, Moon BH, Lee KJ, Kang SW, Lee MS, Choi SH, Chun BG, Shin KH. Effects of repeated tianeptine treatment on CRF mRNA expression in nonstressed and chronic mild stress-exposed rats. *Neuropharmacology.* 50(7):824-33, 2006.

Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csnerus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglödi D, Helyes Z, Gaszner B. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB

expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. 330:335-58, 2016.

Qi X, Guzhva L, Yang Z, Febo M, Shan Z, Wang KKW, Bruijnzeel AW. Overexpression of CRF in the BNST diminishes dysphoria but not anxiety-like behavior in nicotine withdrawing rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 26(9):1378-1389, 2016.

Silberman Y, Matthews RT, Winder DG. A corticotropin releasing factor pathway for ethanol regulation of the ventral tegmental area in the bed nucleus of stria terminalis. *JNeurosci*. 33(3): 950-60, 2013.

Stout SC, Mortas P, Owens MJ, Nemeroff CB, Moreau J. Increased corticotropin-releasing factor concentrations in the bed nucleus of stria terminalis of anhedonic rats. *Eur J Pharmacol*, 401 (1), 39-46, 2000.

Ventura-Silva AP, Pêgo JM, Sousa JC, Marques AR, Rodrigues AH, Marques F, Cerqueira JJ, Almeida OF, Sousa N. Stress shifts the response of the bed nucleus of the stria terminalis to an anxiogenic mode. *Eur J Neurosci*. 36(10):3396-406, 2012.

## *Capítulo 6*

*O papel dos receptores CRF<sub>1</sub> no núcleo leito da estria terminal (NLET) sobre as respostas cardiovasculares, comportamentais e moleculares provocadas pelo estresse de testemunha em ratos*

## 1. INTRODUÇÃO

O modelo de derrota social consiste na exposição de um rato (intruso) à caixa moradia de um rato não-familiar (residente) por um período breve (WOOD et al., 2014). Durante a sessão aguda, a derrota social produz ativação simpática robusta, promovendo o aumento de arritmias (batimentos ventriculares prematuros) em 30 vezes quando comparado com outros estressores como a restrição e o choque nas patas (SGOIFO et al., 1999; WOOD et al., 2014). Outros efeitos sobre o sistema cardiovascular são demonstrados neste molde como, retirada vagal, taquicardia, hipertensão, hipertermia, elevação de catecolaminas plasmáticas e ativação do eixo HPA (TORNATZKY & MICZEK, 1993, 1994; SGOIFO et al., 1999; BHATNAGAR et al., 2006; WOOD et al., 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos neurobiológicos envolvidos.

Estudos mais recentes demonstram uma variação do modelo de derrota social, que consiste em um animal denominado “testemunha” assistir à interação social agressiva, porém com ausência de contato físico (PATKI et al., 2015; FINNELL et al., 2017), permitindo assim a comparação dos componentes físico (intruso) e psicológico (testemunha) do estresse de derrota social (Finnell et al., 2017; 2018). Finnell et al (2017) demonstraram respostas similares de aumento de pressão arterial e frequência cardíaca durante a sessão de derrota social em ratos intruso e testemunha. Entretanto, as alterações comportamentais (anedonia) e cardiovasculares decorrentes da exposição crônica foram mais robustas e duradouras nas testemunhas do que nos ratos derrotados (FINNELL et al., 2017).

Wood et al (2012) demonstraram que o tratamento sistêmico diário com um antagonista seletivo do CRF<sub>1</sub> por 7 dias consecutivos antes das sessões de derrota social inibiu a redução da variabilidade da FC em ratos intrusos (WOOD et al., 2012). Esse resultado demonstra o envolvimento do CRF<sub>1</sub> sobre os ajustes cardiovasculares à derrota social. Entretanto, os sítios específicos onde o

peptídeo CRF age para promover a resposta cardiovascular à derrota social não são totalmente compreendidos.

Nesse sentido, foi demonstrado que os neurônios do NLET são ativados durante a exposição aguda ou crônica à derrota social (LKHAGVASUREN et al., 2014; MARTINEZ et al., 2002; KOLLACK-WALKER et al., 1997; KOLLACK-WALKER 1995; MARTINEZ et al., 1998). Jasnow e colaboradores (2004) reportaram que o tratamento com antagonistas CRF no NLET reduziram as respostas defensivas e aumentaram o comportamento não-social em *hamsters* durante a derrota social condicionada, indicando o envolvimento da neurotransmissão CRF no NLET sobre o controle das respostas comportamentais na derrota social (JASNOW et al., 2004). Entretanto, não há dados na literatura sobre o papel da neurotransmissão de CRF no NLET sobre as respostas fisiológicas em ratos que testemunharam o estresse.

## 2. OBJETIVOS

Investigar o papel dos receptores CRF<sub>1</sub> no NLET sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais desencadeadas pela exposição aguda e crônica ao estresse de testemunha. Nós também avaliamos a ativação do NLET e do núcleo central da amígdala (CeA) de ratos intrusos e que testemunharam o estresse de derrota social.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Animais

Ratos Sprague-Dawley com pesos em torno de 250-275g (intruso, testemunha ou controle) e Long-Evans com pesando entre 680-850g (Charles River, Wilmington MA), foram isolados em caixas individuais durante todo o estudo com acesso a água e ração *ad libidum*, mantidos no biotério com o ciclo de 12 horas claro/escuro. O cuidado e o uso dos animais foram aprovados pela Universidade da Carolina do Sul (IACUC), sendo realizado em acordo com o guia de cuidados e uso de animais do laboratório do *National Institutes of Health* (NIH).

### 3.2. Cirurgia de telemetria

As testemunhas foram submetidas à cirurgia de implante de transmissores de radiotelemetria 10 dias antes do início dos experimentos. O transmissor permite a coleta de dados de eletrocardiograma (ECG) e de pressão arterial (HD-S11-F0, *Data Sciences Int., St Paul, MN*). Para tanto, os ratos foram anestesiados com isoflurano (2,5%), e os transmissores foram implantados seguidos dos cuidados pós cirúrgicos com anti-inflamatório (flunazina 2,5mg/kg), 1ml de salina estéril, alimentação com ração “*Bacon Softies*” (*Bio-Serv, Flemington, NJ*) e dieta em gel (*ClearH20®*, *Portland, Maine*) foram administrados até 48 após a cirurgia.

### 3.3. Cirurgia de estereotaxia

Como descrito no item 3.2, Cap 1. A única diferença é a respeito da anestesia, que foi realizada usando o isoflurano (2,5%).

### 3.4. Aquisição dos dados cardiovasculares

Os registros cardiovasculares foram coletados através de registros contínuos que foram coletados durante a fase clara do ciclo nos dias 1 (exposição inicial, agudo) e 5 (repetido) do momento da microinjeção no NLET até o fim da exposição ao estresse por 15 minutos.

### 3.5. Teste de preferência à sacarose

As testemunhas e os ratos controle foram submetidos ao teste de preferência à sacarose dois dias antes da primeira sessão de estresse social e cinco dias após a última exposição, como previamente publicado (FINNELL et al., 2016). Para tanto, durante a fase de habituação, duas garrafas com água foram oferecidas por 24 horas. Então, as duas garrafas contendo água foram substituídas por garrafas contendo 1% de sacarose. Às 9 da manhã do dia seguinte, todas as águas foram removidas, e os ratos ficaram privados de

qualquer ingestão de líquido até o momento da realização do teste (que foi conduzido das 7 às 10 da noite, durante o ciclo escuro). A preferência à sacarose ([volume 1% de sacarose/total do volume consumido] x100) foi calculada na primeira e terceira hora do ciclo escuro.

### 3.6. Imunohistoquímica

#### 3.6.1. Dupla marcação de neurônios c-fos e CRF no NLET e CeA

Noventa minutos após o fim da sessão aguda ao estresse de testemunha, os ratos foram anestesiados com isoflurano e perfundidos com paraformaldeído (4%) e os encéfalos foram removidos e congelados. Secções coronais seriadas (30-40µm) do NLET foram realizadas e armazenadas em solução crioprotetora. Os cortes foram submetidos à imunohistoquímica de dupla marcação para Fos e CRF. Entretanto, o anticorpo de CRF não funcionou de maneira apropriada, então apenas os dados de Fos foram apresentados. Sabemos que esse experimento foi realizado novamente, mas ainda não tivemos acesso aos resultados.

O procedimento teve início ao lavar os tecidos por 3 vezes em TBS, por 15 minutos em peróxido de hidrogênio e posteriormente mais 3 vezes em TBS. Em seguida, os cortes dos encéfalos foram lavados com TBS+ com *goat sérum* por 20-30 minutos e encubados em anticorpo primário anti-Fos (*rabbit anti-Fos*, Millipore cat.# ABE457) *overnight* em temperatura ambiente. No segundo dia, as secções foram lavadas por 3 vezes em TBS e incubadas com o anticorpo secundário (1:200) em TBS+ e incubados por 2 horas em temperatura ambiente (*unlabeled donkey anti-rabbit*, Jackson, cat #711-005-152). Depois disso, os cortes foram lavados por 3 vezes em TBS e encubados por 90 minutos à temperatura ambiente com anticorpo terciário (*Rabbit PAP*, Jackson, cat#323-005-024) a 1:250 em TBS+. Posteriormente os cortes foram lavados 4 vezes em TBS e colocados em solução DAB preto/azul e encubados em anticorpo primário anti-CRF (*guinea pig anti-CRF*) *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, os cortes foram rinsados em TBS por 3 vezes e incubados com anticorpo secundário (*biotynlated donkey anti-guinea pig*; Jackson, cat#706-065-

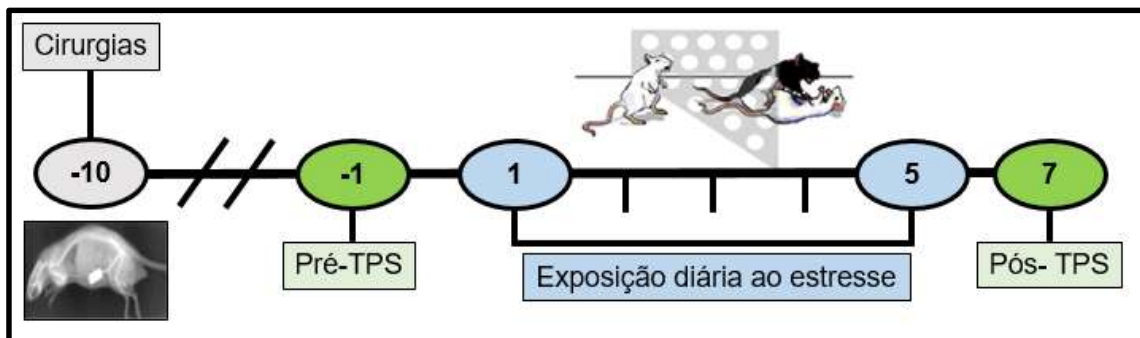


145; 1:1000 em TBS+ e encubado por 90 minutos em temperatura ambiente). Em seguida, os cortes foram lavados 3 vezes em TBS e incubados com anticorpo terciário (*Horseradish peroxidase- conjugated streptavidin*; Jackson, cat #0,16-030-084) a 1:1600 em TBS com Triton X-100 (sem sêrum) e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As secções foram lavadas 4 vezes em TBS e colocadas em solução DAB marrom, com marcação citoplasmática. Os cortes foram colocados em lâminas e visualizados no microscópio para quantificar a dupla marcação de c-fos e CRF.

#### 4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os ratos Sprague-Dawley (~300g) foram submetidos à cirurgia de implantação dos transmissores de telemetria para o registro de PAM e FC. Em seguida, os ratos continuaram sob anestesia e foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para o implante de cânulas guias bilaterais direcionadas ao NLET. Após a cirurgia, todos os ratos receberam os cuidados pós-cirúrgicos como mencionado anteriormente (Anexo 1, item 3.2) e foram mantidos em recuperação por 10 dias. Posteriormente, o pré-teste de preferência à sacarose foi conduzido para determinar se algum rato havia tido algum tipo de aversão à sacarose (Figura 30). A partir do dia seguinte, os ratos testemunha ou controle receberam a microinjeção bilateral de CP376395 (antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub>) ou salina (100nl de salina estéril) por 5 dias. Vinte minutos após a microinjeção, os ratos controle foram manipulados brevemente (10 segundos) e o grupo testemunha foi colocado na caixa de um rato residente (Long-Evans), separado por uma partição plástica perfurada para assistir à derrota social por 15 minutos (Figura 30). Os dados cardiovasculares foram adquiridos a partir de um registro basal contínuo de 30 minutos até o final da exposição ao estresse de testemunha nos dias 1 e 5 (Figura 30). O comportamento das testemunhas também foi registrado através de uma câmera para analisar o comportamento de empurrar a maravalha (*bury*) nos dias 1 e 5 (Figura 30). Nos dias 2 a 4, os procedimentos foram idênticos, porém os parâmetros cardiovasculares e comportamentais não foram registrados. Posteriormente, foi realizado outro teste de preferência à sacarose (Figura 30). No dia seguinte, os ratos foram

anestesiados com isoflurano, eutanasiados, e o cérebro, coração e as glândulas adrenais foram removidos.



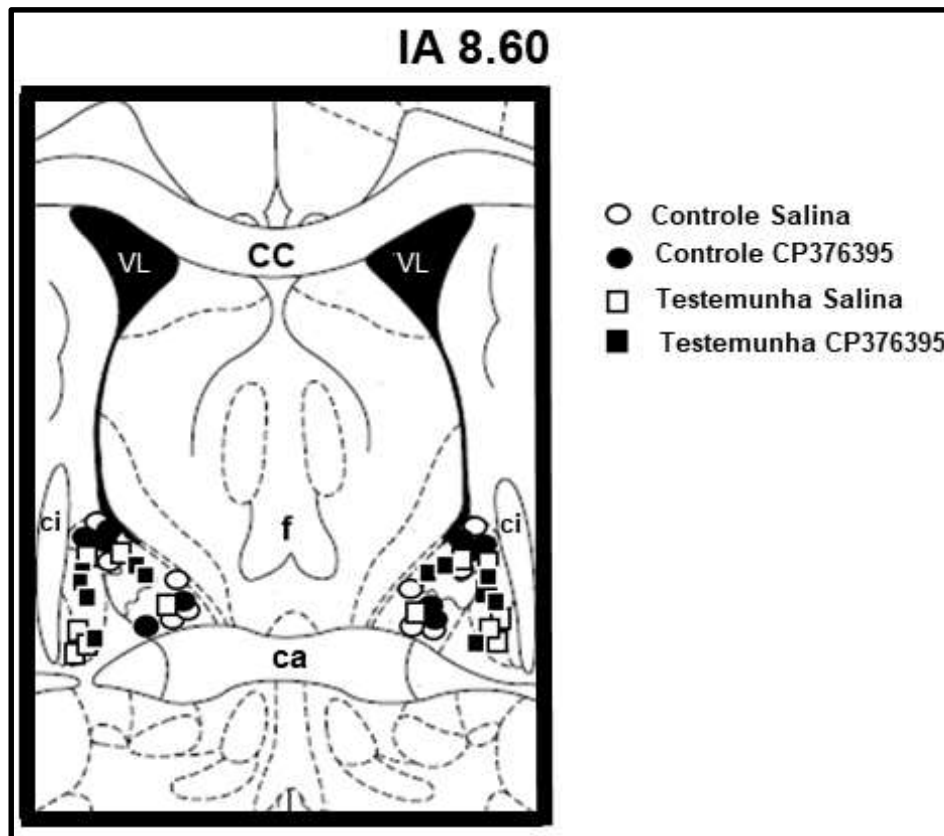
**Figura 30:** Linha temporal do experimento, em dias. TPS: Teste de Preferência à sacarose.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média±EPM. As análises do peso corporal foram realizadas utilizando ANOVA-bifatorial, com estresse e tratamento como fatores principais. O peso do coração e das adrenais foram calculados a partir de seu peso absoluto, dividido por 100g do peso corporal e os valores foram comparados utilizando ANOVA-bifatorial, com estresse e tratamento como fatores principais. Os dados cardiovasculares basais no dia 1 e dia 5 foram submetidos a ANOVA-monofatorial. Já as medidas do dia 5 foram realizadas com ANOVA-bifatorial tendo estresse e tratamento como medidas principais. Todos os dados cardiovasculares foram submetidos à análise multifatorial com estresse, dia, tratamento como medidas principais e tempo como medida repetida. Os dados de imunohistoquímica foram contabilizados através do software Image-J, sendo os resultados de marcação de c-fos analisados por ANOVA-monofatorial. A porcentagem de sacarose consumida foi analisada através de ANOVA bifatorial, com tratamento e estresse como fatores principais. A latência e o tempo gasto no comportamento de empurrar a maravalha foram analisados por análise multifatorial sendo os fatores estresse, comportamento, tratamento e dia. Quando a ANOVA bifatorial indicou efeito, o pós-teste de Fisher foi utilizado para identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. Os valores de  $p < 0,05$  foram assumidos como significativos.

## 6. RESULTADOS

Representação diagramática baseada no atlas de Paxino & Watson (1997) do encéfalo de rato indicando os sítios de microinjeção no NLET de CP376395 ou salina de todos os ratos controle e testemunha utilizados neste experimento estão representados na figura 31.

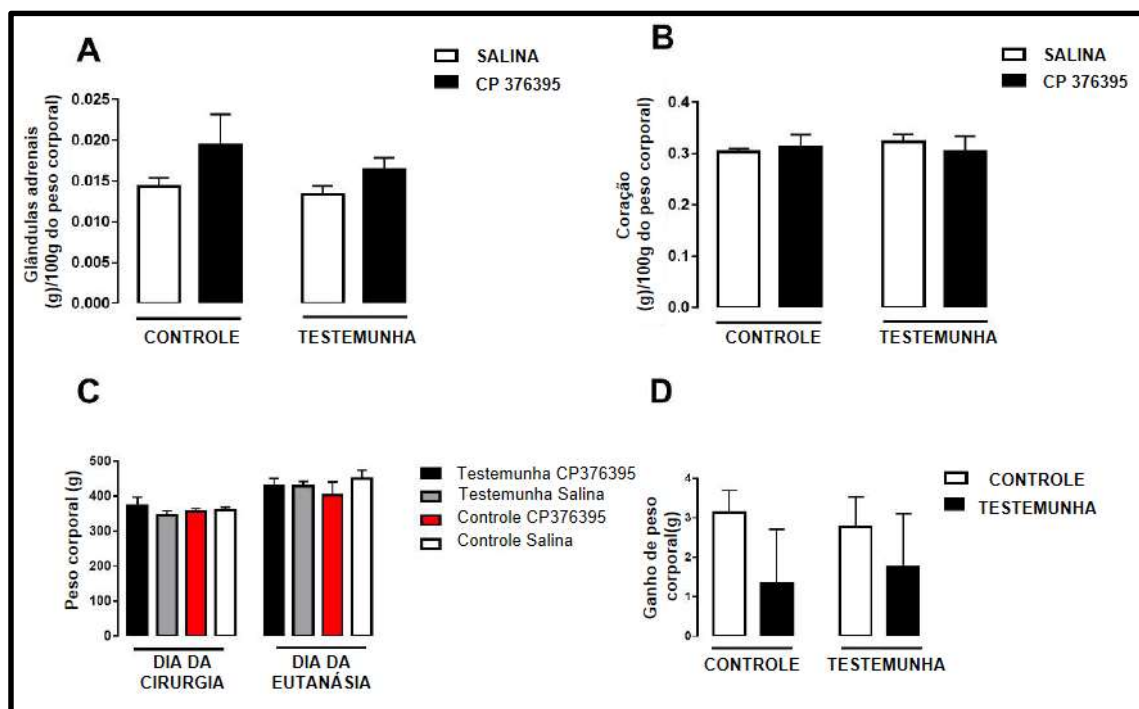


**Figura 31:** Representação esquemática das microinjeções no NLET do antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$ , CP376395 (5 nmol/100nl) em ratos controle (círculos pretos) ou testemunhas (quadrados pretos) ou de veículo (salina, 100nl) nos animais controle (círculos brancos) ou testemunhas (quadrados brancos). CC- Corpo caloso, vl- ventrículo lateral, f- fornix, ca- comissura anterior, ci- cápsula interna.

### 6.1. Análises somáticas

A análise do peso corporal e do ganho de peso corporal não indicou diferenças entre os ratos estressados e controle tratados com salina (100nl) ou

com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395) (5nmol/100nl) no NLET ( $p>0,05$ ). A análise dos pesos das adrenais e do coração também não indicou diferenças entre os grupos experimentais ( $p>0,05$ ) (Figura 32).



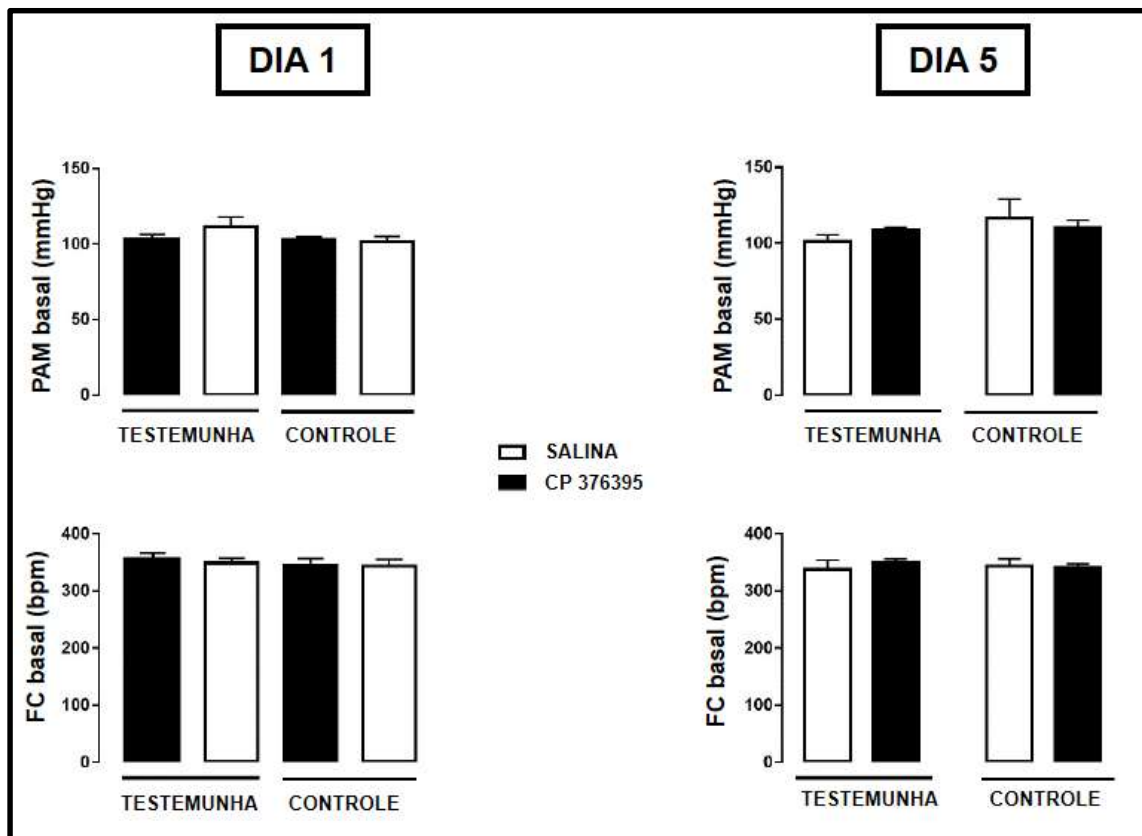
**Figura 32:** Pesos das glândulas adrenais (A), coração (B) e corporal (C e D) em ratos controle e cronicamente estressados com salina (100nl) ou CP376395, antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> no NLET.

## 6.2. Respostas de PAM e FC durante o estresse de testemunha

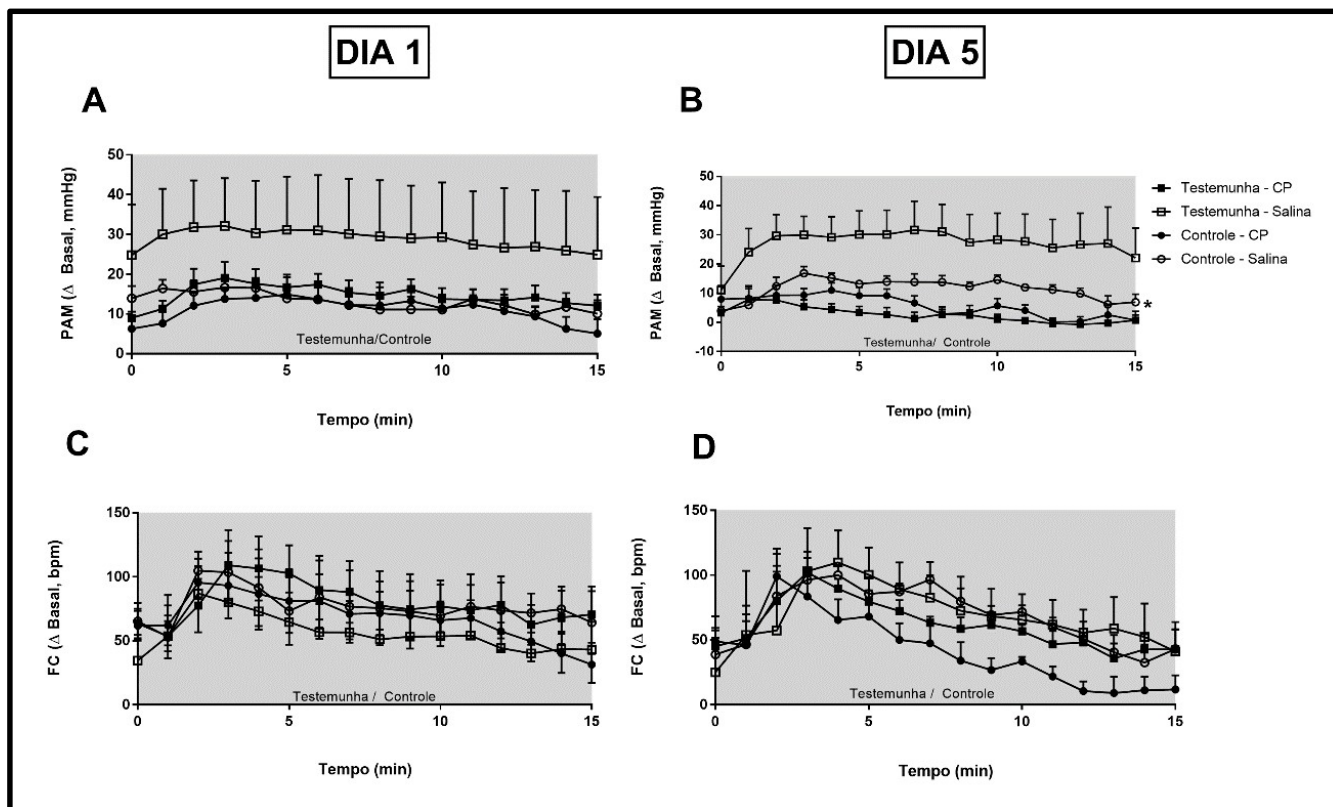
A microinjeção do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395 ou de salina no NLET no primeiro dia não alterou os dados basais de PAM ( $F_{(3,19)}=1$ ;  $p<0,05$ ) ou FC ( $F_{(3,19)}=0,2$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 33). No quinto dia, o estresse não alterou os valores basais de PAM (estresse:  $F_{(1,19)}=0,8$ ;  $p>0,05$ ) e FC (estresse:  $F_{(1,19)}=0,001$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 33). A microinjeção do antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395 no NLET no quinto dia também não alterou os valores basais de PAM (tratamento:  $F_{(1,19)}=0,001$ ;  $p>0,05$ ) e FC (tratamento:  $F_{(1,19)}=0,2$ ;  $p>0,05$ ) dos animais controle ou estressados (Figura 33).

A análise das curvas temporais de PAM e FC indicaram efeitos do tempo (PAM:  $F_{(40,1280)}=22$ ;  $p<0,0001$ ; FC:  $F_{(40,1280)}=29$ ;  $p<0,0001$ ) e interação entre tempo e estresse (PAM:  $F_{(40,1280)}=2,5$ ;  $p=0,0001$ ; FC:  $F_{(40,1280)}=1,4$ ;  $p<0,03$ ). (Figura

34). Para PAM ( $F_{(40,1280)}=4,5$ ;  $p<0,0001$ ), mas não para FC ( $F_{(40,1280)}=1,3$ ;  $p>0,05$ ), a análise também indicou interação entre tempo e tratamento. Porém, a análise não indicou efeito do tratamento e estresse para PAM (estresse:  $F_{(40,1280)}=1,4$ ;  $p>0,05$  e tratamento:  $F_{(40,1280)}=3,5$ ;  $p>0,05$ ) e FC (estresse:  $F_{(40,1280)}=0,5$ ;  $p>0,05$  e tratamento  $F_{(40,1280)}=0,16$ ;  $p>0,05$ ). A análise *post-hoc* de Fisher revelou diferenças entre o tratamento farmacológico das testemunhas que receberam salina ou antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  no NLET no quinto dia ( $p<0,05$ ) (Figura 34).



**Figura 33:** Valores basais de PAM e FC em ratos controle ou estressados (testemunhas) tratados com salina (100nl) ou com antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  CP376395 (5 nmol/100nl) no NLET nos dias 1 e 5. *Controle + veículo*,  $n=4$ ; *Controle + CP376395*,  $n=5$ ; *Testemunha + veículo*,  $n=6$ ; *Testemunha + CP376395*  $n=6$ .

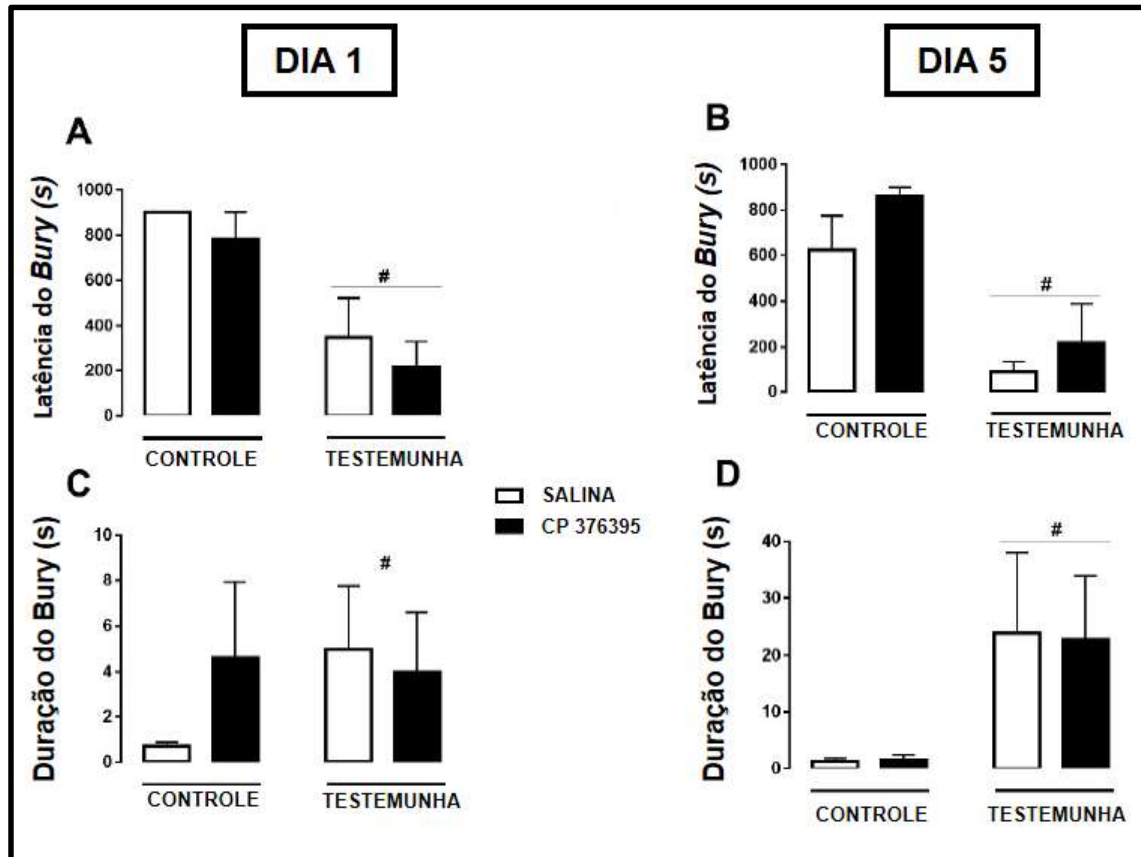


**Figura 34:** Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) de ratos controle (manipulação) e de ratos que testemunharam a derrota social que foram tratados com o antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  CP376395 (5nmol/100nl) ou veículo (100nl) nos dias 1 e 5. (A)  $\Delta$ PAM do dia 1 de testemunha ao estresse. (B)  $\Delta$ PAM do dia 5 de testemunha ao estresse. (C)  $\Delta$ FC do dia 1 de testemunha ao estresse. (D)  $\Delta$ FC dia 5 de testemunha ao estresse. \* representa a diferença de seu respectivo controle. *Controle + veículo*, n=4; *Controle + CP376395*, n=5; *Testemunha + veículo*, n=6; *Testemunha + CP376395*, n=6.

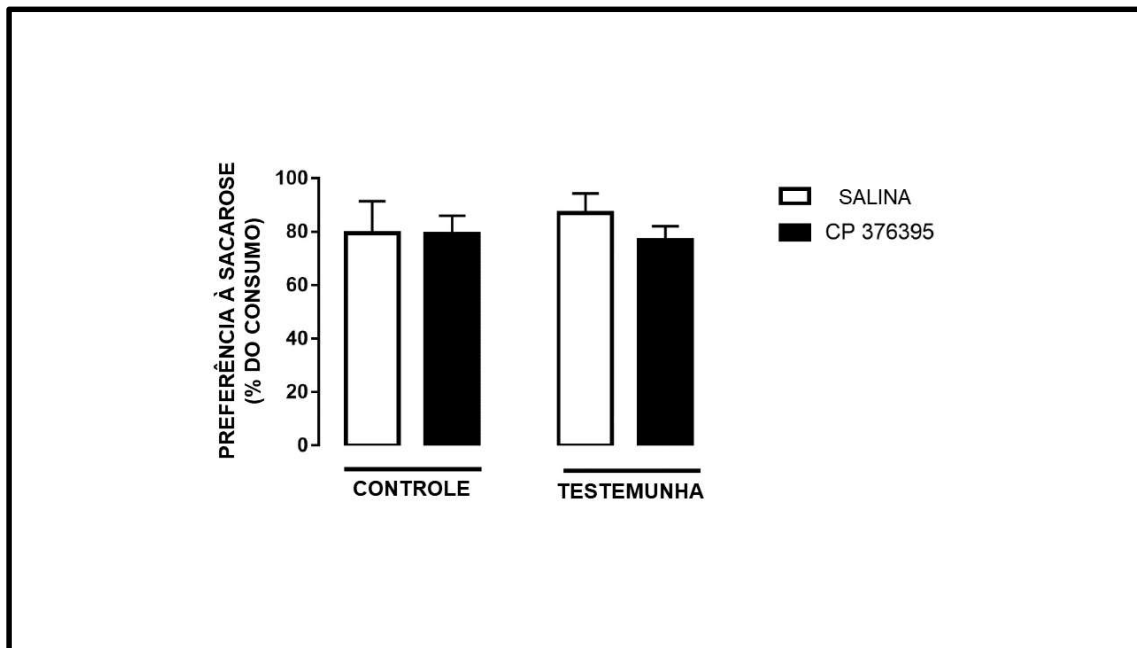
### 6.3. Análises comportamentais

A análise multifatorial sobre a latência do comportamento de empurrar a maravalha (*bury*) demonstrou efeito do estresse ( $F_{(1,41)}=15$ ;  $p<0,0004$ ) (Figura 35). A análise *post-hoc* demonstrou diferenças entre os animais controle e estressados tratados com salina no dia 1 ( $p=0,01$ ) (Figura 35). No mesmo sentido, em relação ao tempo gasto realizando esse comportamento (*bury*), a análise indicou efeito do estresse ( $F_{(1,41)}=8$ ,  $p=0,007$ ) e a análise *post-hoc* revelou diferenças entre os animais controle e estressados tratados com salina no dia 1 ( $p<0,05$ ) (Figura 35).

A análise do teste de preferência à sacarose (TPS) não indicou efeitos do estresse (estresse:  $F_{(1,17)}=0,08$ .  $p>0,05$ ) ou tratamento (tratamento:  $F_{(1,17)}=0,3$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 36).



**Figura 35:** Latência e tempo de duração do comportamento defensivo de empurrar a maravalha (*bury*) em ratos controle e testemunha que foram tratados com salina (100nl) ou com antagonista seletivo de receptor  $CRF_1$  CP376395 (5nmol/100nl) no NLET. # representa o efeito do estresse ( $p < 0,05$ ). (A). Latência do estresse evoca o *bury* durante a primeira exposição. (B) Latência do estresse provoca o *bury* durante a quinta sessão. (C) Tempo gasto na realização do *bury* durante a primeira sessão. (D) Tempo gasto na realização de *bury* durante a quinta sessão. Controle + veículo,  $n=6$ ; Controle + CP376395,  $n=4$ ; Testemunha + veículo,  $n=6$ ; Testemunha + CP376395,  $n=6$ .

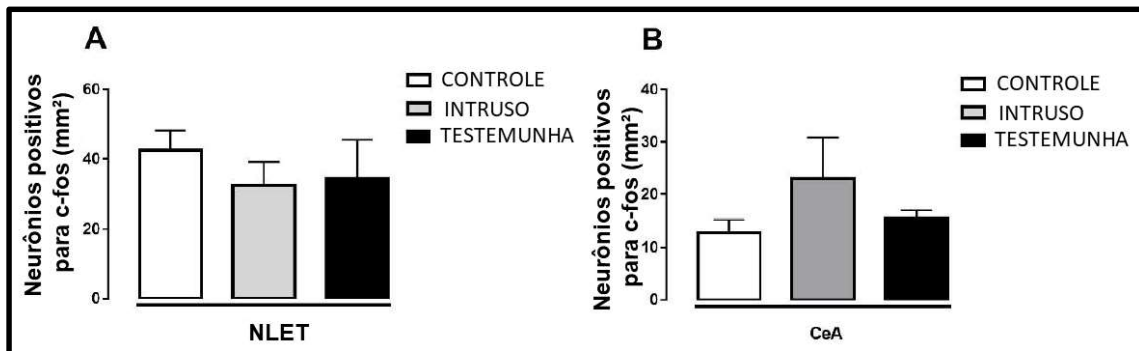


**Figura 36:** Preferência pela sacarose em ratos controle e cronicamente estressados (testemunha) tratados com salina (100nl) ou com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> CP376395. *Controle + veículo, n=6; Controle + CP376395, n=4; Testemunha + veículo, n=6; testemunha+CP376395, n=6.*

#### 6.4. Ativação de neurônios do NLET e CeA de ratos intrusos e testemunhas

Não houve diferenças sobre as expressões de c-fos em ratos não estressados (controle), intruso e testemunha 90 minutos após o fim da derrota social no NLET ( $F_{(2,13)}=0,6$ ;  $p>0,05$ ) e no núcleo central da amígdala CeA ( $F_{(2,16)}=1,2$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 37).





**Figura 37:** Neurônios positivos para c-fos em ratos controle, intruso e testemunha, avaliados 90 minutos após o final da derrota social. (A) Neurônios c-fos positivos no NLET. Controle, n= 8; intruso, n=6; testemunha n=3. (B) Neurônios c-fos positivos no CeA, controle, n=8; intruso, n=6; testemunha, n=6.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que os animais que testemunharam a interação entre ratos residente e intruso apresentaram aumento da PAM e FC, bem como redução da latência e aumento do tempo gasto de escavar (*bury*); e essas respostas foram similares na primeira e última sessão. O tratamento do NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> atenuou a resposta de aumento PAM durante a quinta sessão, porém sem afetar as outras respostas. Por fim, as cinco sessões de estresse de testemunha e o tratamento farmacológico no NLET não afetaram o peso corporal, coração e glândulas adrenais, bem como os parâmetros cardiovasculares basais e a resposta de redução da preferência à sacarose.

O tratamento farmacológico no NLET com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> não alterou os valores basais de PAM ou FC, sugerindo que a neurotransmissão “CRFérgica” não está envolvida na manutenção tônica dos parâmetros cardiovasculares. Esses achados estão de acordo com estudos prévios de nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2015,2017,2018), que não indicaram alterações dos parâmetros cardiovasculares após o tratamento agudo do NLET com antagonistas seletivos de receptores CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub>. Os resultados reportados aqui fornecem a evidência de que mesmo o tratamento repetido com o antagonista de receptor CRF não afeta a função cardiovascular basal.

A ausência das alterações nos níveis basais de PAM seguida de cinco sessões de estresse de testemunha contrastam dados prévios. De fato, Finnell e colaboradores (2017) demonstraram que cinco sessões de estresse de testemunha promovem aumentos basais de PAM, sem alterar a FC. Foi proposto que esse aumento dos valores de pressão arterial pode estar relacionado ao prejuízo da função do barorreflexo, efeitos que ainda não foram avaliados (FINNELL et al., 2017). A razão para essa discrepância nos resultados não é clara, mas pode estar relacionada à diferenças nos procedimentos experimentais. Diferentemente dos estudos prévios, os animais utilizados no presente estudo foram submetidos à cirurgia de estereotaxia e tratamento farmacológico diário no NLET. Portanto, pode ser que o tratamento farmacológico diário no NLET tenha tamponado os efeitos do estresse de testemunha. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor caracterização desse modelo de estresse em causar hipertensão leve.

O presente estudo está de acordo com estudos prévios em que o contato direto com o residente não é requerido para produzir os efeitos simpaticomiméticos significativos que são responsáveis pela resposta cardiovascular à derrota social: apenas testemunhar a interação entre o intruso e residente é suficiente para produzir aumentos sustentados de PAM e FC (FINNELL et al., 2017). Já os mecanismos relacionados às respostas cardiovasculares observadas em animais testemunha são pouco compreendidos. No presente estudo, nós investigamos especificamente o papel dos receptores  $CRF_1$  do NLET. Nesse sentido, nós identificamos que o tratamento do NLET com antagonista de receptor  $CRF_1$  no NLET reduziu o aumento de PAM observado durante a quinta sessão, mas não durante a primeira sessão. Esse dado foi inesperado, uma vez que estudos prévios de nosso grupo reportaram que a neurotransmissão CRF no NLET está envolvida na resposta a outros estressores agudos, como a restrição (OLIVEIRA et al., 2015, 2018) e medo condicionado (NIJSEN et al., 2001). Apesar das evidências da neurotransmissão mediada pelo CRF no NLET nas respostas cardiovasculares a outros estressores emocionais, essa neurotransmissão parece não estar envolvida nas respostas a uma sessão aguda de estresse de testemunha. No entanto, é importante mencionar que alguns grupos experimentais estão com número reduzido de animais, o que pode explicar a

ausência dos efeitos do antagonismo dos receptores CRF<sub>1</sub> durante a primeira sessão. De qualquer modo, é uma questão importante a ser abordada em outros estudos sobre o papel da neurotransmissão CRF no NLET nas respostas cardiovasculares a outros estressores sociais, inclusive em animais intrusos para melhor caracterizar seu envolvimento no controle função cardiovascular durante a exposição a estressores sociais.

A redução da resposta de PAM durante a quinta sessão de testemunha ao estresse em animais tratados no NLET com antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> indica o papel facilitatório desse mecanismo em ratos cronicamente estressados. Esse resultado está de acordo com dados prévios que demonstraram que a administração intracerebroventricular repetida de antagonista não-seletivo CRF antes de cada uma das cinco sessões de estresse de restrição inibiu a facilitação da atividade do barorreflexo induzido por este estressor crônico (CONTI et al., 2001). Outro estudo demonstrou que o tratamento sistêmico (s.c.) com o antagonista seletivo de receptor CRF<sub>1</sub> antes de cada uma das sete sessões de derrota social inibiu a redução da variabilidade de FC induzida pela derrota social (WOOD et al., 2012). Portanto, evidenciamos o papel central da neurotransmissão de CRF sobre as alterações cardiovasculares provocados por estressores sociais crônicos, e indicamos que o NLET é um sítio através do qual o CRF pode agir para modular as respostas cardiovasculares ao estresse social.

A ausência dos efeitos do estresse de testemunha no teste de preferência à sacarose está de acordo com dados anteriores que observaram que os efeitos de anedonia foram identificados durante a avaliação da primeira hora do teste, mas não ao final do teste (FINNEL et al., 2017). Outros autores também reportaram que a derrota social não afetou a resposta comportamental no teste de preferência pela sacarose (VASCONCELOS et al., 2019). Entretanto, apesar do modelo de testemunha parecer ter resposta de anedonia leve, o presente estudo promoveu aumentos de comportamentos defensivos importantes, como o de escavar (*bury*). Mesmo assim, o antagonismo de receptor CRF<sub>1</sub> no NLET não afetou este comportamento defensivo. Esse dado contrasta com dados prévios pelos quais a neurotransmissão CRF no NLET reduziu a interação social e a expressão de comportamento agonístico observado em roedores socialmente derrotados (JASNOW et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2019).

Entretanto, até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a avaliar o papel da neurotransmissão “CRFérgica” no NLET sobre o comportamento defensivo em animais submetidos a estresse por testemunhas.

A ausência da expressão c-fos em neurônios do NLET e CeA em ratos intrusos e testemunhas contrastam com dados prévios que demonstraram ativação dos neurônios dessas estruturas em ratos intrusos após evento de derrota social (LKHAGVASUREN et al., 2014; MARTINEZ et al., 2002; KOLLACK-WALKER et al., 1997, 1995; MARTINEZ et al., 1998). Além disso, um estudo recente reportou aumento da expressão de RNAm de CRF no NLET de camundongos socialmente derrotados (ALBRECHET-SOUZA et al., 2017). A possível explicação para essa discrepância se dá pelo tempo de exposição ou a intensidade de luz não foram mantidos constantes entre os cortes, resultando em diferenças entre as imagens. Apesar disso, o número de sujeitos do estudo é reduzido e pode estar inibindo a significância.

Como mencionado anteriormente, os modelos de estresse social promovem respostas cardiovasculares mais intensas em comparação com outros modelos (SGOIFO et al., 2014), e é possível que grande quantidade de CRF seja liberado no NLET. Apesar do CRF ser seletivo para receptor CRF<sub>1</sub>, o CRF em altas concentrações pode também se ligar ao receptor CRF<sub>2</sub> (HAUGER et al., 2003; DEDIC et al., 2018). Entretanto, os possíveis papéis dos outros neuropeptídios da família CRF não foram investigados no presente estudo. Evidências prévias demonstraram que o receptor CRF<sub>1</sub> está envolvido na resposta pressora e taquicárdica enquanto o receptor CRF<sub>2</sub> controla os aumentos de pressão arterial e a vasoconstrição mediada pelo simpático durante a restrição (OLIVEIRA et al., 2015), indicando que os receptores CRF desempenham papéis no controle das alterações cardiovasculares provocadas por estresse. Além disso, a neurotransmissão CRFérgica do NLET foi reportada desempenhar um papel inibitório sobre a FC durante o medo condicionado (NIJSEN et al., 2001), sugerindo que o controle da resposta cardiovascular ao estresse pela neurotransmissão CRF no NLET é dependente do paradigma de estresse. Desse modo, não excluimos a possibilidade de que os receptores CRF<sub>2</sub> no NLET estão envolvidos nas respostas cardiovasculares provocadas pela testemunha ao estresse. Sendo assim, mais estudos são necessários para

elucidar o papel desse receptor sobre a resposta cardiovascular a estressores sociais, incluindo o estresse de testemunha.

O aumento repetido na PAM durante as cinco sessões parece não promover alterações cardíacas, desde que não haja diferenças no peso do coração. Entretanto, estudos incluindo a avaliação morfológica e análise de marcadores da disfunção cardiovascular são necessários para melhor avaliação das complicações cardíacas provocadas pelo estresse de testemunha. Nesse sentido, um estudo recente do grupo da Dra. Wood encontrou aumentos de biomarcadores de risco cardiovascular (TIMP-1) em animais sujeitos ao mesmo modelo de testemunha e foram reexpostos ao ambiente estressor 6 dias depois (FINNELL et al., 2017). Portanto, mesmo que o remodelamento não ocorra, as testemunhas podem ter o aumento de risco em desenvolver doenças cardiovasculares (FINNELL et al., 2017).

### 8. CONCLUSÃO

Nossos resultados evidenciam o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do NLET agindo via receptores CRF<sub>1</sub> na resposta pressora durante a quinta, mas não na primeira, sessão de testemunha à derrota social. Entretanto, os dados reportados aqui indicam que o receptor CRF<sub>1</sub> no NLET não está envolvido nas respostas de FC e de comportamento defensivo durante a primeira e quinta sessão de estresse.

### 9. REFERÊNCIAS

Abrechet-Souza L, Viola TW, Grassi-Oliveira R, Miczek KA, de Almeida RMM. Corticotropin releasing factor in the bed nucleus of the stria terminalis in socially defeated and non-stressed mice with a history of chronic alcohol intake. *Front Pharmacol*, 8, 762, 2017.

Bhatnagar S, Vining C, Iyer V, Kinni V. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *J Neuroendocrinol*, 18 (1), 13-24, 2006.

Conti LH, Shannon MH, Murry JD, Printz MP. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides*. 35 (2): 71-81,2001

Dedic N; Chen A; Deussing JM. The CRF Family of Neuropeptides and their receptors-mediators of the central stress response. *Curr Mol Pharmacol*; 11(1): 4-31, 2018.

Finnell JE, Lombard CM, Melson MN, Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Fadel JR, Wood CS, Wood SK. The protective effects os resveratrol on social stress-induced cytokine release and depressive-like behavior. *Brain, Behavior and Immunity* 147-157, 2017.

Finnell JE, Muniz LB, Padi AR, Lombard AM, Moffitt CM, Wood CS, Wilson LB, Reagan LP, Wilson MA, Wood SK. Essential role of ovarian hormones in susceptibility to the consequences of witnessing social defeat in female rats. *Biol Psychiatry*, 84 (5), 372-382, 2018.

Finnell JE, Wood SK. Neuroinflammation at the interface of depression and cardiovascular disease: evidence from rodent models of social stress. *Neurobiol Stress*, 4, 1-14, 2016.

Hauger RL. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 55(1):21-6,2003

Jasnow AM, Davis M, Huhman KL. Involvement of central amygdalar and bed nuclei of the stria terminalis corticotropin-releasing factor in behavioral responses to social defeat. *Behav Neurosci*, 118 (5), 1052-61, 2004.

Kollack-Walker S, Newman SW. Mating and agonistic behavior produce different patters of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience* 66(3): 721-36, 1995.

Kollack-Walker S, Watson SJ, Akil H. Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits withing the brain. *J Neurosci* 17(22): 8842-, 1997.

Lkhagvasuren B, Oka T, Nakamura Y, Hayashi H, Sudo N, Nakamura K. Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. *Neuroscience [Internet]*. 272:34-57, 2014.

Martinez M, Calvo-Torrent A, Hebert J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress Int J Biol Stress* 5(1):3-13, 2002.

Martinez M, Phillips PJ, Herbert J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur Neurosci* 10(1):20-33, 1998.

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

Oliveira LA, Almeida J, Benini R, Crestani CC. Corticotropin-releasing factor receptors in the bed nucleus of stria terminalis modulate the autonomic responses to acute restraint stress in rats. *Pharmacol Res.* 95-96: 53-62, 2015.

Oliveira LA, Almeida J, Gomes-de-Souza L, Benini R, Crestani CC. CRF and CRF2 receptors in the bed nucleus of stria terminalis differently modulate the baroreflex function in unanesthetized rats. *Eur J Neurosci*, 42(2): 1805-1812, 2017.

Oliveira LA; Gomes-de-Souza L, Benini R, Crestani CC. 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: 168-173, 2018.

Patki G, Salvi A, Liu H, Salim S. Witnessing traumatic events and post-traumatic stress disorder: insights from an animal model. *Neurosci Lett.* 600:28-32, 2015.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3 edn. Academic Press, 1997.

Sgoifo A, Carnevali L, Grippo AJ. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 39:51-60, 2014.

Sgoifo A, Koolhaas J, De Boer S, Musso E, Stilli D, Buwalda B, P Meerlo. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 23 (7), 915-23, 1999.

Tornatzky W, Miczek KA. Behavioral and autonomic responses to intermittent social stress: differential protection by clonidine and metoprolol. *Psychopharmacology (Berl)*, 116 (3), 346-56, 1994.

Tornatzky W, Miczek KA. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Psychol Behav*, 53 (5), 983-93, 1993

Vasconcelos M, Stein DJ, Albrechet-Souza L, Miczek KA, de Almeida RMM. Recovery of stress-impaired social behavior by an antagonist of the CRF binding protein, CRF6-33, in the bed nucleus of stria terminalis on male rats. *Behavi Brain Res* 357-358, 104-110, 2019.

Wood SK, McFadden KV, Grigoriadis D, Bhatnagar S, Valentino RJ. Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology (Berl)*, 222(2)325-36, 2012.

Wood SK, Walker HE, Valentino RJ, Bhatnagar S. Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: role of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*, 151 (4), 1795-805, 2010.

Wood SK. Individual differences in the neurobiology of social stress: implications for depression-cardiovascular disease comorbidity. *Curr Neuropharmacol*, 12 (2), 205-11, 2014