

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa Interinstitucional De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas

Dissertação de Mestrado

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO DO FATOR LIBERADOR DE
CORTICOTROFINA NO HIPOTÁLAMO LATERAL NA FUNÇÃO
BARORREFLEXA EM RATOS**

Lilian Liz Reis Silva

Araraquara – SP
2021

Lilian Liz Reis Silva

Envolvimento da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina no hipotálamo lateral na função barorreflexa em ratos

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

Orientador: Prof Dr. Carlos Cesar Crestani

Araraquara – SP

2021



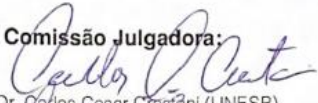
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

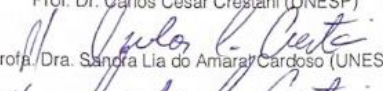
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lillian Liz Reis Silva, realizada em 16/04/2021.

Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)


Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso (UNESP)


Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves (UFLA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por apoiar minhas decisões e se fazer presente, mesmo longe. Em especial, agradeço à minha mãe e à minha irmã, e também melhores amigas, por não medirem esforços para me ver feliz. Eu não estaria onde estou sem a força e exemplo dessas duas mulheres. Aos meus sobrinhos por serem o meu escape da realidade e por me lembrarem a delícia de ser criança.

Aos meus amigos, Larissa, Marineide, Gabriel Silvestre, Gabriel Arthur, Leonardo, Joice, Carlos Roberto, Giselle e Maurílio por serem as melhores companhias, frutos das melhores risadas, pela lealdade e por estarem sempre dispostos a me acolher. Aproveito a sessão de agradecimento aos amigos para agradecer ao meu amiguinho de quatro patas, Adam é dono do abraço capaz de esvair problemas.

Ao professor Carlos Cesar Crestani pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por acreditar e confiar no meu trabalho, por todos os ensinamentos práticos e teóricos durante toda execução dessa pesquisa, além da contribuição para o meu crescimento acadêmico e profissional. Você é minha grande inspiração profissional.

A todos integrantes do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial Lucas Barreto e Ricardo Benini, por participarem da execução do projeto e compartilharem diversos conhecimentos, Leandro, Lucas Gomes, Willian e Celina por todos ensinamentos e amizade.

Aos professores do laboratório de Farmacologia, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin e a Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta.

À secretária do departamento Tírene Pavanelli, aos secretários do PIPGCF Alexandre Chiva (UFSCar) e Cláudia Molina (UNESP).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar/UNESP) pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa

Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/UNESP) pela a oportunidade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O hipotálamo lateral (HL) é uma estrutura diencefálica que tem sido considerada parte do circuito central que regula a função barorreflexa. No entanto, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle do barorreflexo por essa área hipotalâmica são pouco compreendidos. Portanto, no presente estudo nós investigamos o papel da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina (do inglês, CRF) no HL atuando via receptores CRF₁ e CRF₂ nas respostas barorreflexas cardíacas em ratos não-anestesiados. Para isso, a atividade barorreflexa foi avaliada por meio de duas abordagens: i) a abordagem farmacológica, por meio da infusão intravenosa de agentes vasoativos, e ii) a técnica de análise de sequência, que avalia as respostas reflexas durante as variações espontâneas da pressão arterial. A técnica de análise de sequência indicou que o tratamento do HL com o antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) diminuiu o índice de efetividade do barorreflexo, enquanto o antagonista seletivo do receptor CRF₂ (antisalvagina-30) aumentou o encurtamento reflexo do intervalo de pulso durante diminuições espontâneas da pressão arterial. No entanto, a abordagem farmacológica não indicou efeito da microinjeção bilateral de CP376395 ou antisalvagina-30 no HL na taquicardia evocada pela redução da pressão arterial ou na bradicardia causada pelo aumento da pressão arterial. Em suma, esses achados indicam que a neurotransmissão CRFérgica no HL controla as respostas reflexas geradas por variações fisiológicas da pressão arterial, mas não está envolvida no controle barorreflexo durante alterações pronunciadas da pressão arterial. Além disso, os resultados fornecem evidências de que os receptores CRF₁ e CRF₂ presentes no HL modulam de forma oposta a atividade barorreflexa espontânea por meio de diferentes mecanismos.

PALAVRAS-CHAVE: índice de eficácia barorreflexa; cardiovascular; fator de liberação de corticotropina; sistema límbico; técnica de análise de sequência.

ABSTRACT

The lateral hypothalamus (LH) is a diencephalic structure that has been considered part of the central circuitry regulating the baroreflex function. However, the local neurochemical mechanisms involved in baroreflex control by this hypothalamic area are poorly understood. Therefore, in the present study we investigated the role of corticotropin-releasing factor (CRF) neurotransmission within the LH acting via local CRF₁ and CRF₂ receptors in cardiac baroreflex responses in unanesthetized rats. For this, the baroreflex activity was assessed using two approaches: i) the pharmacological approach via intravenous infusion of vasoactive agents, and ii) the sequence analysis technique that evaluates reflex responses during spontaneous arterial pressure variations. The sequence analysis technique indicated that LH treatment with the selective CRF₁ receptor antagonist CP376395 decreased the baroreflex effectiveness index, whereas the selective CRF₂ receptor antagonist antisauvagine-30 increased the reflex shortening of pulse interval during spontaneous arterial pressure decreases. However, the pharmacological approach did not indicate effect of the bilateral microinjection of either CP376395 or antisauvagine-30 into the LH in the tachycardia evoked by blood pressure decrease or the reflex bradycardia caused by blood pressure increase. Overall, these findings indicate that CRF neurotransmission within the LH controls baroreflex function during a narrow range of physiological arterial pressure variations, but without affecting reflex responses during pronounced arterial pressure changes. Besides, results provide evidence that CRF₁ and CRF₂ receptors in the LH oppositely modulate the spontaneous baroreflex activity through different mechanisms.

KEYWORDS: baroreflex efficacy index; cardiovascular; corticotropin-releasing factor; limbic system; Oxford technique; sequence analysis technique.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 O controle autonômico cardiovascular	9
1.2 O Hipotálamo lateral (HL)	11
1.3 O HL e o controle cardiovascular	12
1.4 O sistema CRFérgico	13
1.5 O sistema CRFérgico e o controle cardiovascular	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Drogas, soluções e administrações	18
3.3 Implante de cânulas guias no hipotálamo lateral	19
3.4 Microinjeção de drogas no hipotálamo lateral	20
3.5 Canulação da artéria e veia femoral	20
3.6 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	20
3.7 Infusão de agentes vasoativos	21
3.8 Avaliação da atividade barorreflexa	21
3.8.1 Método farmacológico	21
3.8.2 Método de análise de sequência	22
3.9 Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas	22
3.10 Análise estatística	23
4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	24
5 RESULTADOS	26
5.1 Efeito do tratamento farmacológico do HL com antagonistas dos receptores CRFérgicos nos parâmetros basais da pressão arterial e frequência cardíaca	26
5.2 Efeitos do tratamento farmacológico no HL com antagonistas dos receptores CRFérgicos na função barorreflexa	27
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo experimental.....	25
Figura 2 – Sítios de injeção no hipotálamo lateral (HL).....	26
Figura 3 – Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica.....	28
Figura 4 – Atividade barorreflexa avaliada pelo método de análise de sequência.....	3

1 INTRODUÇÃO

1.1 O controle autonômico cardiovascular

A perfusão tecidual apropriada para diferentes situações é garantida pela manutenção de níveis pressóricos adequados e dentro de uma faixa estreita de variação. Produto do débito cardíaco e da resistência vascular, a pressão arterial é regulada por diferentes mecanismos, que incluem fatores locais, humorais e neurais (KAUFMANN; NORCLIFFE-KAUFMANN; PALMA, 2020). A regulação neural da pressão arterial ocorre através da modulação tônica pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Em resposta ao aumento da pressão arterial, o fluxo simpático eferente é inibido e o fluxo parassimpático é aumentado, culminando em vasodilatação e bradicardia. O oposto ocorre quando a pressão arterial diminui, de forma que o aumento e a diminuição da atividade do sistema nervoso simpático e parassimpático, respectivamente, promovem a vasoconstrição e a taquicardia para corrigir a queda dos níveis pressóricos. Esse processo de regulação da pressão arterial pelo sistema nervoso autônomo é possível devido a existência de um sistema responsável por detectar e enviar informações ao sistema nervoso central sobre as variações de pressão arterial nos grandes vasos.

O sistema barorreflexo constitui o mecanismo mais importante de controle autonômico cardiovascular momento-a-momento (MICHELINI *et al.*, 2015). Nesse sentido, as flutuações da pressão arterial acarretam em alterações na atividade dos barorreceptores arteriais, o que induz mudanças compensatórias na frequência cardíaca, contratilidade cardíaca e tônus vascular (PAPPANO; WIER, 2012). O barorreflexo desempenha um papel não apenas na proteção das flutuações transitórias da pressão arterial, mas também na configuração a longo prazo dos níveis de pressão arterial tônica (LOHMEIER; ILIESCU, 2015). O mau funcionamento desse mecanismo tem sido associado a doenças cardiovasculares como hipertensão, e é preditivo de mortalidade cardiovascular, particularmente morte cardíaca súbita (GRASSI *et al.*, 2006; ROVERE, LA *et al.*, 1988).

Os barorreceptores são terminações nervosas sensíveis ao estiramento distribuídas na bifurcação da artéria carótida e no arco aórtico. Através dos

nervos vago e glossofaríngeo, os barorreceptores transmitem informações sobre a distensão da parede dos vasos para a região bulbar do tronco cerebral (SWENNE, 2013). As aferências barorreceptoras terminam no núcleo do trato solitário (NTS), a partir do qual projeções inervam estruturas relacionadas com a atividade simpática e parassimpática:

- i) via simpática: região ventrolateral caudal do bulbo (do inglês, CVLM) recebe projeções oriundas do NTS, que, por sua vez, projeta-se para a região ventrolateral rostral do bulbo (do inglês, RVLM). No RVLM estão localizados neurônios pré-motores simpáticos que emitem projeções para os neurônios pós-ganglionares na coluna intermédio-lateral da medula espinhal (IML) e estes conectam-se com neurônios pós-ganglionares noradrenérgicos que inervam o coração e a rede vascular;
- ii) via parassimpática: o núcleo dorsal motor do vago (DMV) e núcleo ambíguo (NA), que contém os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares colinérgicas do sistema nervoso parassimpático, também recebem projeções do NTS. As fibras pré-ganglionares projetam-se diretamente ao coração, fazendo sinapses com as fibras pós-ganglionares, também colinérgicas, as quais inervam os nódulos sinoatrial e atrioventricular e os átrios.

Dessa forma, motoneurônios simpáticos e parassimpáticos trafegam para o nódulo sinusal, miocárdio e vasculatura, por meio dos quais a resposta cardiovascular é executada (CRITCHLEY; HARRISON, 2013; THAYER *et al.*, 2009).

Os centros cardiovasculares bulbares se conectam com estruturas cerebrais superiores e corticais (REYES DEL PASO; MATA; MARTÍN-VÁZQUEZ, 2012). Alguns dos neurônios envolvidos no circuito barorreflexo enviam projeções para núcleos supra-bulbares, incluindo, por exemplo, a substância cinzenta periaqueductal (PAG), núcleos dorsomedial e paraventricular no hipotálamo, núcleo central da amígdala, córtex pré-frontal medial, córtex insular, núcleo leito da estria terminal (NLET), bem como para o hipotálamo lateral (BEHBEHANI; PARK; CLEMENT, 1988; DAMPNEY, R. A., 1994; KOOY, VAN DER *et al.*, 1984; PAJOLLA *et al.*, 2001).

1.2 O Hipotálamo lateral (HL)

O hipotálamo lateral (HL) é uma região diencefálica que se estende da área pré-óptica lateral até a área tegmentar ventral, incluindo o feixe prosencéfalo medial (SAPER, C. B.; SWANSON; COWAN, 1979). Essa região pode ser dividida em três sub-regiões rostrocaudais: hipotálamo lateral anterior (HLa), hipotálamo lateral tuberal (HLt) e hipotálamo lateral posterior (HLp). O HLa é contínuo com a área pré-óptica lateral, sendo delimitado medialmente pela área hipotalâmica anterior e pelo fórnix, e lateralmente funde-se com a substância innominata e com a amígdala. O HLt, por sua vez, é limitado lateralmente pelo trato óptico, pela cápsula interna e, mais caudalmente, pelo núcleo sub-talâmico. Já o HLp é delimitado pelo fórnix, pelo trato mamilotalâmico e pela área hipotalâmica posterior, sendo separado dorsalmente do tálamo pela zona incerta e pelos campos de Forel (SIMERLY, Richard B., 2004).

O HL está conectado com diferentes núcleos que controlam a atividade autonômica. Diversas regiões cerebrais enviam fibras aferentes ao HL, dentre elas se destacam a amígdala, o septo, o hipocampo, a substância innominata e as áreas pré-ópticas laterais (SIMERLY, Richard B., 2004). Também o núcleo arqueado envia fibras diretas aos neurônios peptidérgicos do HL (ELIAS *et al.*, 1999). Outras áreas, como a zona periventricular e o núcleo periventricular ântero-posterior, enviam projeções menos densas ao HLt (GU; SIMERLY, R. B., 1997). Além disso, a zona lateral do hipotálamo se projeta a diferentes regiões encefálicas como septo, amígdala, alguns núcleos talâmicos (habenula lateral, núcleo paraventricular do tálamo e intralaminar) (BERK; FINKELSTEIN, 1982; SWANSON; COWAN, 1977). O HL envia projeções, em sua maioria bidirecional, a diversas regiões do tronco encefálico como i) NTS e o núcleo parabraquial, envolvidos em informações sensoriais viscerais e ii) a área tegmentar ventral, substância negra, hipotálamo posterior, PAG, *locus coeruleus* e núcleos da rafe (SAPER, C. B.; LOEWY, 1980; SAPER, C. B.; SWANSON; COWAN, 1979). Ademais, Hosoya e colaboradores (1983) indicaram projeções do HL para a medula espinhal.

Devido às diversas conexões entre o HL e outras regiões encefálicas, o HL é uma das regiões mais heterogêneas funcionalmente, sendo responsável pela regulação de vários comportamentos e processos fisiológicos, dentre eles:

regulação sono-vigília, comportamento alimentar, balanço energético, controle respiratório, comportamento predatório e agressivo (ARRIGONI; CHEE; FULLER, 2018; FUKUSHI; YOKOTA; OKADA, 2018; HALLER, 2018)(HOEBEL; TEITELBAUM, 1962; REDGATE; GELLHORN, 1958; WOODWORTH, 1971). Além do que, estudos têm demonstrado o envolvimento do HL com o controle cardiovascular (ALLEN; CECHETTO, David F., 1993). Assim, o HL foi proposto como parte de uma rede central que modula o sistema cardiovascular e as respostas barorreflexas.

1.3 O HL e o controle cardiovascular

Diferentes estudos buscaram identificar a contribuição do HL no controle da atividade cardiovascular. Cechetto e Chen (1992) demonstraram que a estimulação elétrica do HL em ratos anestesiados causa aumento da pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca, ao passo que outro estudo desenvolvido por Van Der Plas e colaboradores (1995) indicou que estimulação elétrica de baixa intensidade do HL diminui a pressão arterial e causa efeitos variáveis na frequência cardíaca. O bloqueio sináptico não-seletivo no HL evocado pela microinjeção local de CoCl_2 diminuiu a bradicardia reflexa causada por aumento da pressão arterial (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2009). Já a microinjeção de aminoácidos excitatórios como L-glutamato e D,L-homocisteato no HL provocou alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca (GELSEMA; ROE; CALARESU, 1989; SUN; GUYENET, 1986). Pajolla & Corrêa (2004) demonstraram que a estimulação química de cada uma das três sub-regiões do HL com L-glutamato causa respostas hipotensivas em ratos não-anestesiados sem alteração comportamental e que, em ratos anestesiados com uretana, o L-glutamato causa respostas depressoras ou respostas hipotensivas/hipertensivas bifásicas.

Allen & Cechetto (1993) investigaram a organização funcional das diferentes regiões do HL. A microinjeção de L-glutamato ou D,L-homocisteato nas porções tuberal e posterior do HL resultou principalmente em queda da pressão arterial e da frequência cardíaca. Por sua vez, a estimulação dos corpos celulares localizados próximos à área perifornical resultou em aumentos da

pressão arterial e da frequência cardíaca. Além disso, esse estudo identificou que os neurônios das diferentes porções do HL possuem projeções ao tronco encefálico diferencialmente organizadas, fornecendo substrato anatômico para essas diferenças funcionais.

Além da participação direta no controle da atividade cardiovascular, a conexão do HL às diversas estruturas corticais e subcorticais associadas ao controle autonômico também interfere no controle cardiovascular. Nesse sentido, a estimulação elétrica do córtex insular ocasiona efeitos hipotensores dependentes de sinapses no HL e na medula ventrolateral (CECHETTO, D. F.; CHEN, S. J., 1992). Outro estudo eletrofisiológico evidenciou estímulos inibitórios provenientes do HL em neurônios relacionados ao sistema cardiovascular na região rostro-ventrolateral do bulbo (AGARWAL; CALARESU, 2017). Van der Plas e colaboradores (1995) mostraram que a estimulação elétrica de baixa intensidade do HL causa resposta depressora e inibe o disparo de neurônios da PAG espontaneamente ativos, sugerindo participação da PAG no efeito depressor.

Assim, embora alguns resultados tenham demonstrado a participação do HL no controle da atividade cardiovascular, mais estudos precisam ser feitos para identificar os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos.

1.4 O sistema CRFérgico

O fator liberador de corticotrofina (CRF) é um neuropeptídeo formado por 41 aminoácidos, que foi identificado no hipotálamo e descrito como regulador da secreção do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (VALE, Wylie *et al.*, 1981). Desse modo, a princípio o CRF foi descrito como um composto envolvido na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). No entanto, estudos posteriores apontaram o CRF como participante de respostas independentes do eixo HPA, incluindo regulação da função cardiovascular e da atividade autonômica. A distribuição anatômica do CRF no cérebro sugere que esse peptídeo não apenas atua como um mediador do eixo neuroendócrino, mas também é capaz de regular a atividade neuronal de uma forma neuromodulatória. Na verdade, o CRF é expresso em todo o sistema

nervoso central (SNC), incluindo na maioria das estruturas límbicas e corticais (DEDIC; CHEN, A.; DEUSSING, 2017).

O sistema CRFérgico inclui os neurotransmissores CRF, urocortina 1 (UCN1), urocortina 2 (UCN2) e urocortina 3 (UCN3); bem como os receptores CRF₁ e CRF₂ (Dautzenberg & Hauger, 2002; Vale et al., 1981). Foram identificadas três variantes do receptor CRF₂ em humanos (CRF_{2(a)}, CRF_{2(b)}, CRF_{2(c)}) e duas variantes em roedores (CRF_{2(a)}, CRF_{2(b)}), porém as variantes não apresentam diferenças no perfil farmacológico (HAUGER, R. L., 2003). Além disso, o perfil de ligação neurotransmissor-receptor varia de acordo com o ligante: o CRF possui maior afinidade pelo receptor CRF₁, a UCN2 e a UCN3 se ligam seletivamente ao receptor CRF₂ e UCN1 possui afinidade por ambos os receptores (HAUGER, R. L., 2003; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, A., 2016; PERRIN, M. H.; VALE, Wylie W, 2006). As ligações podem também ser moduladas pela ligação dos neurotransmissores à proteína de ligação do CRF, responsável por limitar a disponibilidade desses peptídeos (BEHAN *et al.*, 1995).

Enquanto a projeção do núcleo paraventricular para a eminência mediana continua a ser a principal fonte de CRF cerebral, outras células extra-hipotalâmicas foram visualizadas na amígdala, no NLET e em interneurônios dispersos no córtex cerebral (SWANSON *et al.*, 1983). Os componentes do sistema CRFérgico foram identificados em regiões encefálicas como núcleo accumbens, área pre-óptica, núcleo parabraquial e núcleo dorsomotor do vago (SAWCHENKO, P. E., 1987; SOUZA, Errol B DE *et al.*, 1985; SWANSON *et al.*, 1983). Foi identificado também uma alta expressão de receptores e neurotransmissores do sistema CRFérgico no HL (BITTENCOURT *et al.*, 1999; CHALMERS; LOVENBERG; SOUZA, E B DE, 1995; PETT, VAN *et al.*, 2000; SOUZA, Errol B DE *et al.*, 1985; SWANSON *et al.*, 1983; WITTMANN *et al.*, 2009). Uma particularidade desse sistema diz respeito à localização encefálica dos receptores. Enquanto os receptores CRF₁ estão amplamente distribuídos em regiões neocorticais, límbicas e do tronco encefálico, os receptores CRF₂ estão limitados ao núcleo da rafe, septo lateral, núcleos medial e cortical da amígdala e núcleos paraventricular e ventromedial do hipotálamo (Dautzenberg & Hauger, 2002; Hauger, 2003).

Devido à grande distribuição no sistema nervoso central, esses peptídeos participam também da regulação da cognição, sistemas neuroendócrino e autonômico, respostas imunológicas frente a estímulos aversivos e ingestão alimentar (BALE; VALE, Wylie W., 2004; DAUTZENBERG; HAUGER, Richard L., 2002; HAUGER, R. L., 2003; SHIMIZU; BRAY, 1989; VALE, Wylie *et al.*, 1981). A localização desse sistema no interior de estruturas límbicas e autonômicas também proporciona uma base anatômica para a participação do CRF na coordenação visceral e comportamental (CHAPPELL *et al.*, 1986; SOUZA, Errol B DE *et al.*, 1985; SWANSON *et al.*, 1983). Além de desempenhar funções centrais, o sistema CRFérgico também atua no controle de respostas periféricas, incluindo o sistema cardiovascular (FISHER, Laurel A.; JESSEN; BROWN, Marvin R., 1983).

1.5 O sistema CRFérgico e o controle cardiovascular

As ações centrais combinadas do CRF no funcionamento circulatório se relacionam às reações de defesa. A resposta ao estresse causada pela ativação do eixo HPA é responsável por preparar os animais para uma atividade somatomotora aumentada, para fuga e/ou comportamento agressivo. Por conseguinte, o CRF atua dentro do SNC para aumentar a capacidade cardiovascular, manifestada pelo aumento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca (FISHER, L. A. *et al.*, 1982; FISHER, Laurel A.; JESSEN; BROWN, Marvin R., 1983).

Independente das propriedades adrenocorticotróficas, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de CRF eleva a pressão arterial, produz taquicardia e aumenta a concentração de catecolaminas circulantes mesmo em ratos hipofisectomizados ou adrenalectomizados (BROWN, M. R.; FISHER, L. A., 1985). A administração de CRF no fluído cerebrospinal via ventrículo lateral, terceiro ventrículo ou cisterna magna aumenta a atividade nervosa simpática e, conseqüentemente, eleva a pressão arterial e da frequência cardíaca (BROWN, Marvin R. *et al.*, 1982). Ademais, a injeção central de CRF em diferentes áreas encefálicas, como regiões dorsal, ventromedial e hipotalâmica lateral, modifica a liberação de noradrenalina pelos tecidos de diversos outros órgãos, aumenta a

transmissão de impulsos no nervo renal e provoca aumento tanto na atividade do nervo adrenal quanto a taxa de secreção de catecolaminas na veia adrenal (BROWN, M., 1986; BROWN, M. R.; FISHER, L. A., 1985; KUROSAWA *et al.*, 1986). Esses aumentos simultâneos da pressão arterial e da frequência cardíaca sugerem que a função barorreflexa pode ser modificada pela administração de CRF. Diamant e colaboradores (1992) realizaram a microinjeção de CRF no HL e na região perifornical e observaram um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca. Os efeitos do CRF na atividade cardiovascular foram mais acentuados quando injetado no HLp quando comparados à injeção no HLa. Apesar dessas evidências, um possível papel da neurotransmissão CRFérgica no HL no controle da função barorreflexa nunca foi avaliado. Visto a presença do sistema CRF no HL, bem como o importante papel desse núcleo hipotalâmico no controle da função barorreflexa (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2009), nós testamos a hipótese de que receptores CRF₁ e CRF₂ no HL estão envolvidos na atividade barorreflexa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação da neurotransmissão CRFérgica no HL no controle da atividade barorreflexa em ratos não-anestesiados.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar a participação do receptor CRF₁ no HL no controle da atividade barorreflexa durante variações espontâneas e pronunciadas causadas pela infusão intravenosa de agentes vasoativos da pressão arterial;
- 2) Avaliar a participação do receptor CRF₂ no HL no controle da atividade barorreflexa durante variações espontâneas e pronunciadas causadas pela infusão intravenosa de agentes vasoativos da pressão arterial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar pesando entre 240-260g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). A transferência dos animais para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) foi realizado no mínimo sete dias antes do início dos procedimentos experimentais. Os animais foram aleatoriamente alojados em caixas (47 cm x 31 cm x 16 cm) coletivas com cinco ratos cada, em salas climatizadas ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e ração. Todos os protocolos e procedimentos executados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP, protocolo nº 08/2019.

3.2 Drogas, soluções e administrações

As drogas utilizadas foram:

- i. CP376395 (Tocris, EUA), antagonista seletivo do receptor CRF_1 , via intra-HL na dose 0,01 nmol/100nL;
- ii. Antisalvagina-30 (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores CRF_2 , via intra-HL na dose 0,01 nmol/100nL;
- iii. Fenilefrina, agonista seletivo dos adrenoreceptores α_1 , na dose de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ a 0,4 mL/min, via intravenosa;
- iv. Nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, na dose 100 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ a 0,8 mL/min, via intravenosa;
- v. Lidocaína, anestésico local, administrada 3 μL por animal, via subcutânea;
- vi. Pentabiótico (Fountora-Wyeth, Brasil), antibiótico, 560 mg/mL/kg, via intramuscular;
- vii. Flunixinina meglumina (Banamine ®, Schering Plough, Brasil), anti-inflamatório, 0,5 mg/mL/kg, via subcutânea;

- viii. Isoflurano, anestésico, no volume de 3-5% para indução e 1-2% durante a manutenção, usando um sistema de anestesia de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), via inalatória;
- ix. Uretana (Sigma-Aldrich, EUA), anestésico, na dose de 1,2 g/kg, via intraperitoneal.

O antibiótico e o anti-inflamatório foram diluídos de acordo com as orientações do fabricante. As demais drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%).

3.3 Implante de cânulas guias no hipotálamo lateral

Os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) por via inalatória. Foi realizada a tricotomia da cabeça, e foi administrado lidocaína (2%) com vasoconstritor para anestesia local e redução do sangramento. Cada animal teve a cabeça imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA) e a calota craniana foi exposta através de uma incisão da pele e afastamento do perióstio. A limpeza da região cirúrgica foi realizada com água oxigenada a 10%.

Com auxílio de uma broca odontológica foram feitos dois orifícios no crânio, por onde foram introduzidas cânulas bilaterais direcionadas ao HL, e um orifício para implantação do parafuso de fixação da resina. As cânulas guias foram inseridas bilateralmente 6,6 mm em relação à interaural (ântero-posterior), 1,8 mm lateral a linha média (latero-lateral) e 7,6 mm abaixo do osso craniano (dorso-ventral). Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1986). As cânulas consistiam em um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23G) com 12 mm de comprimento e foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ). Para evitar obstrução da cânula guia e exposição cerebral até o momento da microinjeção, um mandril de aço inoxidável com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido em ambas as cânulas.

Como medida profilática, ao final da cirurgia cada animal recebeu a administração de pentabiótico veterinário por via intramuscular e o anti-

inflamatório por via subcutânea. No período de recuperação os animais foram mantidos em caixas coletivas contendo até cinco animais por caixa.

3.4 Microinjeção de drogas no hipotálamo lateral

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) para microinjeção das drogas no HL mediam 13 mm (um milímetro mais longa em relação às cânulas guias) e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100 nL (CRESTANI, C. C. *et al.*, 2009).

3.5 Canulação da artéria e veia femoral

Os animais foram anestesiados novamente com isoflurano (2%) por via inalatória e foram implantados cateteres na artéria e veia femoral para registro de parâmetros cardiovasculares e infusão de drogas vasoativas, respectivamente. Os cateteres eram compostos por um segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a um segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), que foram preenchidos com solução de heparina e ocluídos com pino de metal. Posterior à implantação, os cateteres foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Por fim, os animais receberam uma nova administração de anti-inflamatório flunixinina meglumina por via subcutânea. Durante os períodos pós-operatório e de registro cardiovascular os animais ficaram alojados em caixas individuais.

3.6 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) por meio de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Australia), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Australia), usando o programa Lab Chart PRO (ADInstruments,

Australia). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), bem como a frequência cardíaca, foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.7 Infusão de agentes vasoativos

Infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenorreceptores α_1) (50 μ g/mL a 0.32mL/min/Kg) e nitroprussiato de sódio (NPS) (doador de óxido nítrico) (70 μ g/mL a 0.8mL/min/Kg) foi realizada utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI *et al.*, 2011). A fenilefrina e o NPS causam aumento e diminuição da pressão arterial, respectivamente.

3.8 Avaliação da atividade barorreflexa

A atividade barorreflexa foi avaliada utilizando dois métodos: 1) método farmacológico e 2) análise de sequência.

3.8.1 Método farmacológico

Esse método avalia a atividade barorreflexa através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio, utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2010).

A análise foi realizada relacionando as variações da pressão arterial média (PAM) com as variações reflexas correspondentes da frequência cardíaca (FC). Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PAM e FC foram traçadas curvas sigmóides, como descritas na literatura (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2010; HEAD; MCCARTY, 1987). A avaliação da curva sigmóide foi feita com base em cinco parâmetros: 1) platô mínimo da frequência cardíaca (P_1 , bpm); 2) platô máximo da frequência cardíaca (P_2 , bpm); 3) variação da FC (ΔFC , 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) (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2010; HEAD; MCCARTY, 1987).

Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de pressão arterial e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para a análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na pressão arterial (CRESTANI *et al.*, 2010b).

3.8.2 Método de análise de sequência

Esse método avalia a atividade do barorreflexo durante as flutuações espontâneas da pressão arterial, sem nenhuma manipulação farmacológica. A pressão arterial sistólica (PAS) e o intervalo pulso (IP) foram avaliados batimento-a-batimento através do software Cardioseries v2.4 (ALMEIDA *et al.*, 2015; COSTA-FERREIRA; GOMES-DE-SOUZA; CRESTANI, C., 2019). Foram identificadas sequências em que o aumento da PAS foi associada ao alongamento do IP (sequência UP) ou a diminuição da PAS associada ao encurtamento do IP (sequência DOWN). O índice de efetividade do barorreflexo (IEB), que indica a porcentagem de alterações da PAS que efetivamente evocam alterações reflexas de IP, também foi avaliado (RIENZO, Marco DI *et al.*, 2001).

3.9 Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas

Ao término de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg) e o corante azul de Evan 1% (100nL) foi injetado para confirmação do posicionamento da injetora. Posteriormente, o cérebro dos animais foi removido e incubado em solução de formaldeído 10% por no mínimo 48 horas. Em seguida, os cérebros foram seccionados coronalmente no criostato em fatias de 40 µm de espessura. Para confirmação do local de injeção, os cortes histológicos foram visualizados em microscópio óptico e apenas os animais com injeção no HL foram considerados positivos.

3.10 Análise estatística

Todos os dados foram analisados no software GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados foram expressos como a média \pm EPM. Os parâmetros das curvas barorreflexas foram comparados usando ANOVA monofatorial seguida pelo pós-teste Dunnet. Os valores basais de PAM e FC antes e depois do tratamento farmacológico no HL foram comparados usando o teste *t* de Student. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

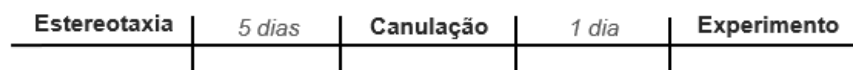
4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilaterais direcionadas aos HL e foram mantidos no biotério, agrupados em cinco animais por caixa, por um período de cinco dias para a recuperação. Os experimentos foram realizados 24 horas após a implantação de cateteres na artéria e veia femorais, que foram utilizados para registro dos parâmetros cardiovasculares e infusão das drogas vasoativas, respectivamente. Após a canulação, os animais foram mantidos na sala de experimentos, em caixas individuais, para recuperação e habituação às condições de som e iluminação (Figura 1A).

No dia do experimento, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa. Inicialmente, foi realizado um registro de 30 minutos para determinação dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca. Posteriormente, conjuntos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no HL de antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395, 0,01nmol/100nL, n=6), de antagonista seletivo dos receptores CRF₂ (Antisalvagina-30, 0,01nmol/100nL, n=6) ou veículo (salina, 100 nL, n=7) (BARRETTO-DE-SOUZA *et al.*, 2021). Quinze minutos após o tratamento farmacológico no HL, foram realizadas as infusões randomizados de fenilefrina e NPS (Figura 1B).

Após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 mg/kg, i.p.), decapitados, e os encéfalos foram removidos e armazenados em solução de formaldeído 10% por 48 horas para posterior confirmação do local de injeção.

A.



B.

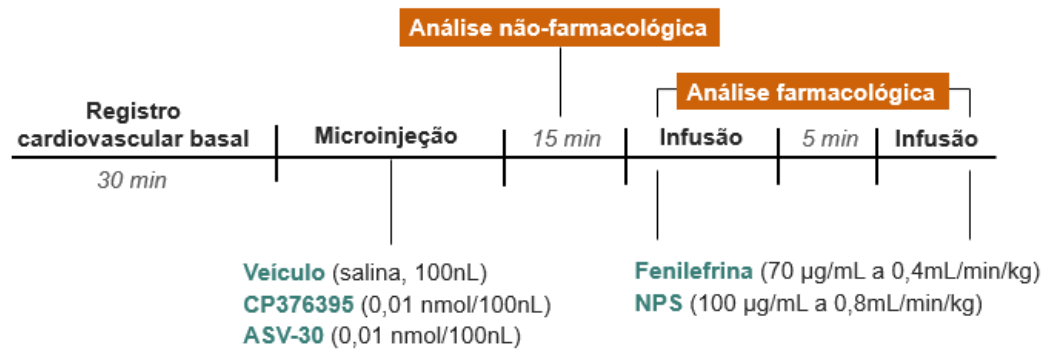


Figura 1 – Protocolo experimental. (A) Procedimentos cirúrgicos. (B) Protocolo experimental para avaliação da participação da neurotransmissão CRFérgica no hipotálamo lateral (HL) na função barorreflexa em animais não-anestesiados.

5 RESULTADOS

A Figura 2 mostra representações diagramáticas baseadas no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de injeção de CP376395, antissalvagina-30 e veículo em todos os animais utilizados nesse protocolo. A Figura 2 também mostra a fotomicrografia de um corte histológico coronal indicando os sítios de microinjeção bilateral no HL de um animal representativo.

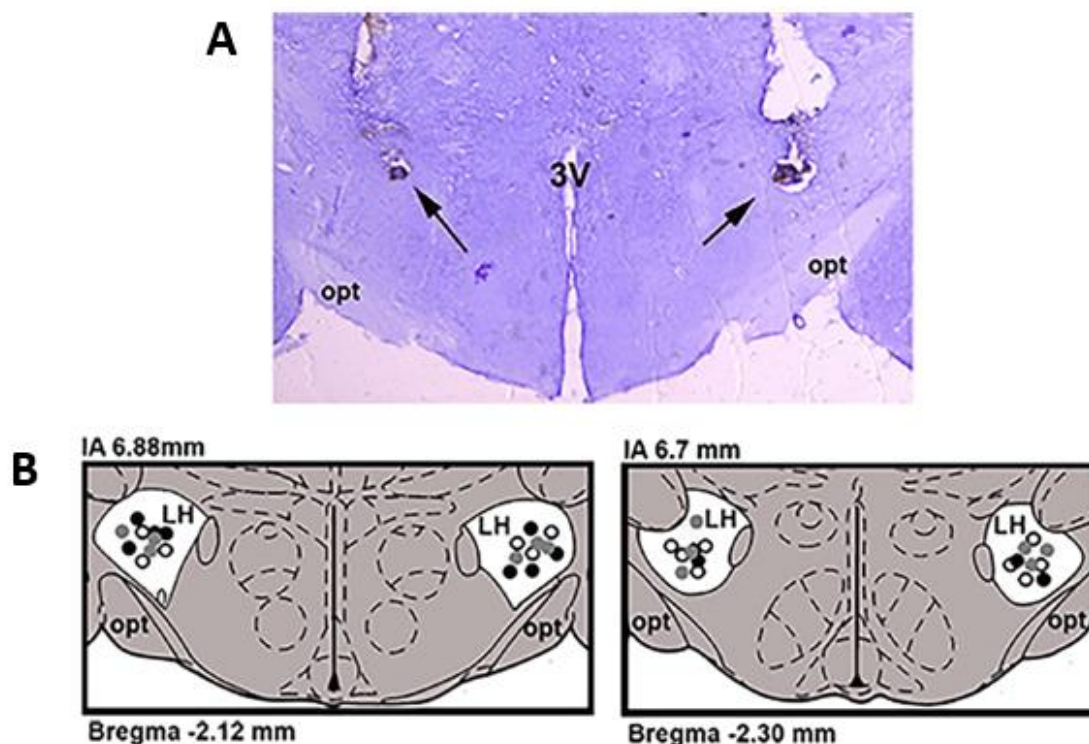


Figura 2 – Sítios de injeção no hipotálamo lateral (HL). (A) Fotomicrografia de uma seção coronal do cérebro mostrando os locais de microinjeção bilateral no hipotálamo lateral (HL) de um animal representativo. Setas indicam os locais de microinjeção. (B) representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL do veículo (círculos brancos), CP376395 (círculos pretos) e antissalvagina-30 (círculos cinza). 3V, terceiro ventrículo; IA, coordenada interaural; opt, trato óptico.

5.1 Efeito do tratamento farmacológico do HL com antagonistas dos receptores CRFérgicos nos parâmetros basais da pressão arterial e frequência cardíaca

A microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01 nmol/100nL, n = 6), do antagonista seletivo do receptor CRF_2

antisalvagina-30 (0,01 nmol/100nL, n = 6) ou de veículo (salina, 100nL, n=7) no HL não afetou os parâmetros basais de PAM e FC (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos que receberam microinjeção bilateral no hipotálamo lateral (HL) do antagonista seletivo do receptor CRF₁ CP376395, do antagonista seletivo do receptor CRF₂ antisalvagina-30 (ASV-30) ou veículo (salina).

Grupos	PAM (mmHg)		FC (bpm)	
	<i>antes</i>	<i>depois</i>	<i>antes</i>	<i>depois</i>
Veículo	109,2	121,2	390,4	387,5
	<i>t = 0,4 P = 0,66</i>		<i>t = 0,1 P = 0,85</i>	
CP376395	103,7	108,5	353,9	412,1
	<i>t = 1,2 P = 0,22</i>		<i>t = 1,5 P = 0,14</i>	
ASV-30	114,9	121,2	370,9	410,2
	<i>t = 1,1 P = 0,29</i>		<i>t = 1,5 P = 0,15</i>	

Valores são a média ± EPM, teste t Student.

5.2 Efeitos do tratamento farmacológico no HL com antagonistas dos receptores CRFérgicos na função barorreflexa

Abordagem farmacológica – A análise não-linear da função barorreflexa (curvas sigmóides) não indicou efeito do tratamento farmacológico no HL com CP376395 (0,01 nmol/100 nL, n = 6) ou antisalvagina-30 (0,01 nmol/100 nL, n = 6) no platô inferior (P1) ($F_{(2,16)} = 1,19$, $P = 0,3288$), platô superior (P2) ($F_{(2,16)} = 0,90$, $P = 0,4263$), na variação entre P₁ e P₂ (ΔFC) ($F_{(2,16)} = 0,53$, $P = 0,6017$), no ganho (G) ($F_{(2,16)} = 2,66$, $P = 0,1011$) e na pressão arterial média (PA50) (ou seja, pressão arterial a 50% da faixa de FC) ($F_{(2,16)} = 1,53$, $P = 0,2498$) quando comparado com animais tratados com veículo (100nL, n = 7) (Figura 3A). Os dados obtidos utilizando a abordagem farmacológica também foram avaliados por meio de análise de regressão linear para avaliação individual das respostas reflexas durante os efeitos pressor e depressor. Análise da inclinação das linhas de regressão para a bradicardia causada pelo aumento da pressão arterial evocado pela infusão intravenosa de fenilefrina não indicou efeito dos tratamentos farmacológicos ($F_{(2,21)} = 0,5525$, $P = 0,5837$) (Fig. 3B). A análise da inclinação das linhas de regressão para a taquicardia causada pela diminuição

da pressão arterial evocada pela infusão intravenosa de NPS também não indicou efeito dos tratamentos ($F_{(2, 21)} = 0,2477$, $P = 0,7828$) (Fig. 3B).

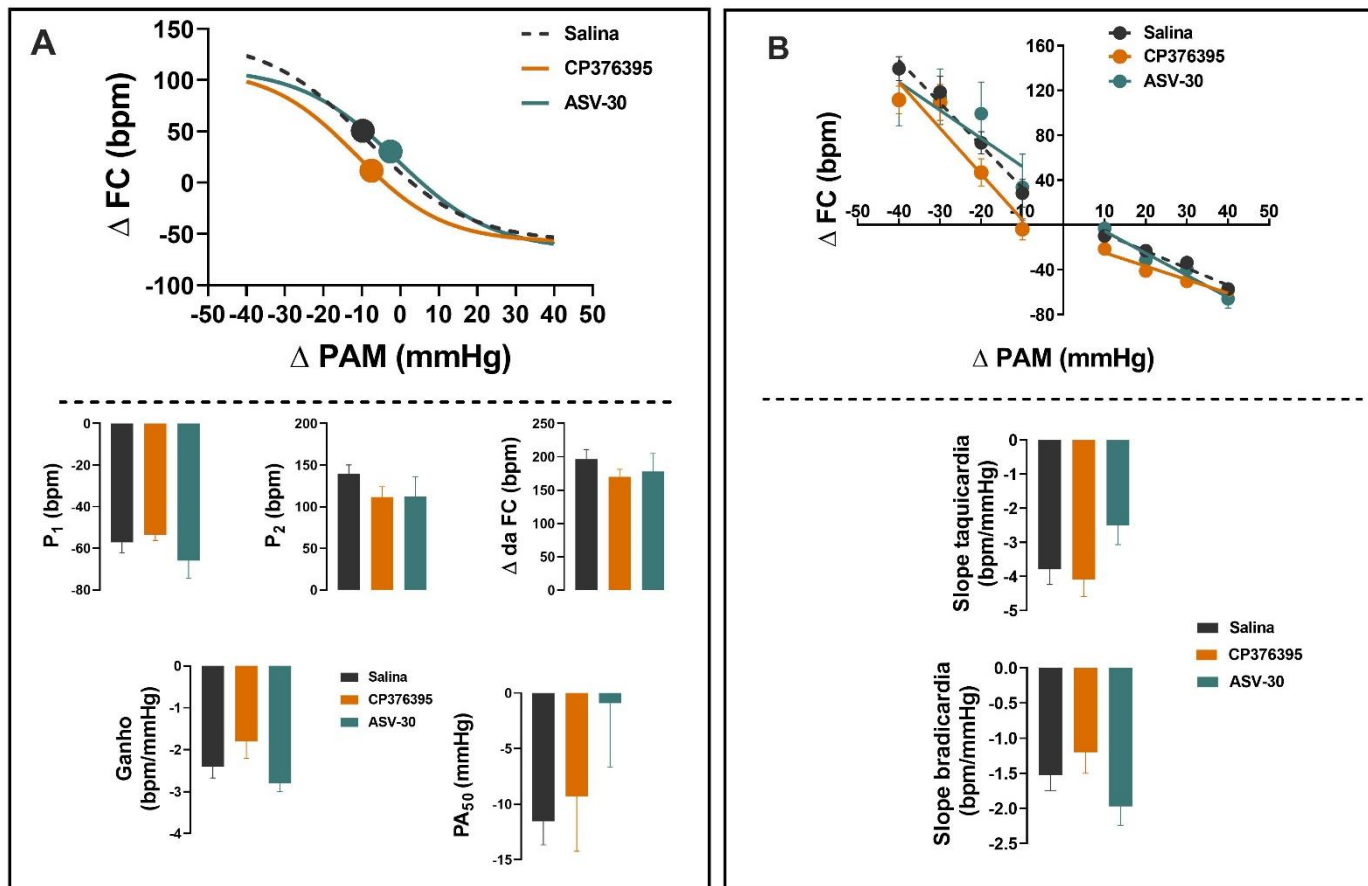


Figura 3 – Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica . Os animais receberam microinjeção bilateral no hipotálamo lateral (HL) do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01 nmol/100 nL), do antagonista seletivo do receptor CRF_2 antisalvagina-30 (0,01 nmol/100 nL) ou veículo (solução salina, 100 nL). **(A)** Análise de regressão não-linear (curva sigmoide) da função barorreflexa correlacionando as alterações da PAM (ΔPAM) causadas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agente pressor) e nitroprussiato de sódio (NPS, agente depressor) e as respostas reflexas da FC (ΔFC). Os símbolos nas curvas sigmoides indicam a BP_{50} . Na parte inferior são apresentados os parâmetros derivados da análise de regressão não-linear para avaliação da função barorreflexa. As barras representam a média \pm SEM. ANOVA monofatorial. **(B)** Análise de regressão linear da função barorreflexa correlacionando a ΔPAM com a ΔFC causada pela infusão venosa dos agentes vasoativos. Na parte inferior é apresentada a inclinação (ou seja, ganho) das linhas de regressão para a diminuição da FC causada pelo aumento da PAM e o aumento da FC evocado pela diminuição da PAM. Os círculos nas curvas e barras representam a média \pm EPM. ANOVA monofatorial.

Método de sequência – A análise da atividade do barorreflexo pela técnica de sequência indicou efeito dos tratamentos farmacológicos no HL no índice de efetividade do barorreflexo (IEB) ($F_{(2,16)} = 4,52$, $P = 0,0278$), na sequência *up* ($F_{(2,16)} = 3,86$, $P = 0,0429$), na sequência *down* ($F_{(2,16)} = 3,81$, $P = 0,0425$) e na média de todas as sequências (ou seja, média das sequências *up* e *down*) ($F_{(2,16)} = 5,29$, $P = 0,0171$) (Figura 4). O pós-teste revelou que a microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01nmol / 100nL, n = 6) no HL diminuiu o IEB ($P = 0,0183$), quando comparado com os animais tratados com veículo (100nL, n = 7) (Figura 4A). Além disso, a microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CRF_2 antisalvagina-30 (0,01nmol / 100nL, n = 6) no HL aumentou tanto a sequência *down* ($P = 0,0293$) quanto a média de todas as sequências ($P = 0,0326$) (Figura 4B).

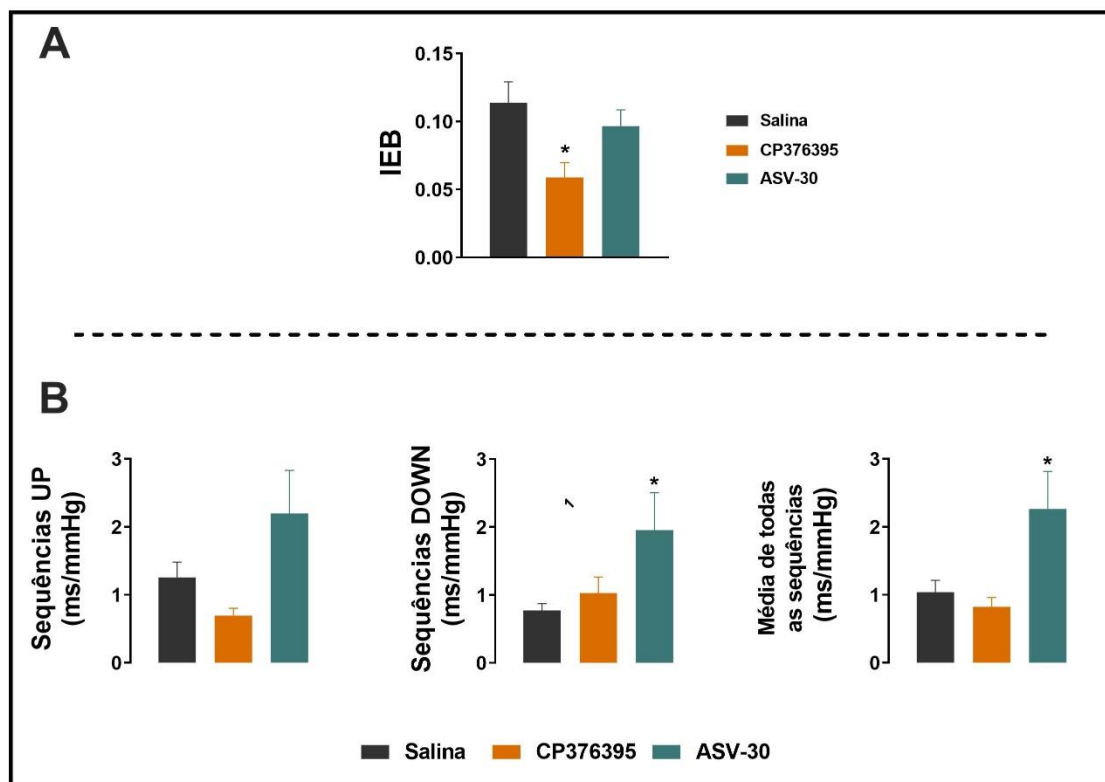


Figura 4 – Atividade barorreflexa avaliada pelo método de sequência. Os animais receberam microinjeção bilateral no hipotálamo lateral (HL) do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01 nmol/100 nL, n = 6), do antagonista seletivo do receptor CRF_2 antisalvagina-30 (0,01 nmol/100 nL, n = 6) ou veículo (solução salina, 100 nL, n = 7). **(A)** Índice de efetividade do barorreflexo (IEB). As barras representam a média \pm EPM. * P < 0,05 vs grupo de veículo, ANOVA monofatorial seguido pelo pós-teste de Dunnet. **(B)** Barorreflexo espontâneo (ou seja, atividade barorreflexa durante flutuações espontâneas da pressão arterial sem manipulação farmacológica com drogas vasoativas para induzir alterações na pressão arterial) durante aumentos (sequência *up*, gráfico à esquerda) e diminuição (sequência *down*, gráfico do meio) da PAS, assim como a média de todas as sequências (média das sequências *up* e *down*, gráfico à direita). As barras representam a média \pm EPM. * P < 0,05 vs grupo de veículo, ANOVA monofatorial seguido pelo pós-teste de Dunnet.t.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências de que os receptores CRFérgicos do HL fazem parte do circuito cerebral que medeia a função barorreflexa. A análise da função barorreflexa pela abordagem farmacológica não indicou uma influência dos receptores CRFérgicos no HL na taquicardia ou bradicardia reflexas observadas durante diminuições e aumentos da pressão arterial, respectivamente. No entanto, a técnica de análise de sequência indicou que i) os receptores CRF₁ no HL desempenham um papel facilitatório na eficácia do barorreflexo durante variações espontâneas da pressão arterial, e ii) os receptores CRF₂ no HL têm uma influência inibitória na taquicardia evocada por diminuições espontâneas da pressão arterial.

Nós relatamos anteriormente o papel do HL no controle das respostas do barorreflexo usando a abordagem farmacológica (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2009). De fato, observamos nesse estudo prévio que a microinjeção do bloqueador sináptico não-seletivo CoCl₂ no HL diminuiu a bradicardia reflexa causada pelo aumento da pressão arterial, mas sem afetar a resposta taquicárdica causada pela redução da pressão arterial. A evidência de uma influência facilitatória do HL nas respostas reflexas evocadas pelo aumento da pressão arterial também foi apoiada por estudos anteriores que indicaram que a estimulação elétrica do HL aumenta a bradicardia evocada pela estimulação elétrica do nervo depressor aórtico em ratos anestesiados (INUI *et al.*, 1995). No presente estudo, a abordagem farmacológica não revelou a participação dos receptores CRFérgicos no HL na função barorreflexa, sugerindo que outros mecanismos neuroquímicos estão envolvidos no controle da resposta reflexa da frequência cardíaca durante alterações pronunciadas da pressão arterial. Nesse sentido, anteriormente, documentamos que o tratamento com antagonista dos receptores não-NMDA no HL mimetizou o efeito do tratamento com CoCl₂ sobre a bradicardia reflexa (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2009), o que indica que a neurotransmissão glutamatérgica no HL está envolvida no controle das respostas barorreflexas durante o aumento da pressão arterial.

A ausência de efeito dos tratamentos farmacológicos no HL na abordagem farmacológica não se deve à ineficácia do bloqueio dos receptores CRFérgicos, uma vez que o mesmo tratamento evidenciou a participação dos

receptores CRFérgicos no HL nas respostas barorreflexas durante mudanças espontâneas da pressão arterial (*ver discussão abaixo*). Além disso, identificamos que a dose utilizada no presente estudo foi eficaz em demonstrar um papel dos receptores CRFérgicos no HL nas alterações cardiovasculares evocadas por um estímulo aversivo (estresse de restrição) (BARRETTO-DE-SOUZA *et al.*, 2021).

O método de sequência tem sido descrito como uma abordagem para investigar a função barorreflexa, que avalia as respostas reflexas durante as flutuações espontâneas da pressão arterial, sem qualquer manipulação farmacológica (BERTINIERI *et al.*, 1985; RIENZO, Marco DI *et al.*, 2001; SILVA, L. E. V.; KATAYAMA, 2017). Este método indicou não apenas papéis opostos dos receptores CRF₁ (facilitatório) e CRF₂ (inibitório) no HL no controle de respostas cardíacas reflexas durante variações espontâneas de PAS, mas também um controle por meio de diferentes mecanismos. Nesse sentido, o controle pelos receptores CRF₂ é responsável pela inibição do encurtamento do IP durante as quedas espontâneas da PAS, o que indica uma influência na magnitude da resposta reflexa. Por outro lado, os resultados do IEB indicaram que os receptores CRF₁ controlam a eficácia do barorreflexo em responder às alterações da pressão arterial. Embora a análise do ganho seja mais comumente usada para análise da função barorreflexa, o IEB foi proposto como um índice complementar para avaliação da função barorreflexa (RIENZO, Marco DI *et al.*, 2001; SILVA, L. E. V.; KATAYAMA, 2017). A relevância das mudanças no IEB pode ser evidenciada pela demonstração de que a diminuição neste parâmetro não foi seguida por alteração no ganho do barorreflexo espontâneo em ratos com insuficiência cardíaca (LATARO *et al.*, 2017) e durante uma ameaça aversiva (BAJI *et al.*, 2010). Portanto, nossos achados fornecem evidências adicionais do IEB e do ganho do barorreflexo espontâneo como medidas complementares que podem ser determinadas e influenciadas por diferentes fatores (REYES DEL PASO; GONZÁLEZ; HERNÁNDEZ, 2004; SILVA, L. E. V.; KATAYAMA, 2017).

Ambos os receptores CRF₁ e CRF₂ atuam principalmente através da via de sinalização Gs/adenilil ciclase/cAMP (DEUSSING; CHEN, A., 2018). Portanto, os diferentes papéis e mecanismos de controle do barorreflexo por esses receptores no HL podem ser explicados por sua expressão em diferentes

populações neuronais locais. Dessa forma, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no controle da função barorreflexa pelos receptores CRFérgicos no HL.

A descoberta de que a neurotransmissão CRFérgica no HL modula seletivamente o barorreflexo espontâneo é apoiado por evidências de que diferentes circuitos estão envolvidos na geração de respostas reflexas durante variações espontâneas e mudanças mais pronunciadas na pressão arterial (CRESTANI, Carlos C., 2016). Por exemplo, o papel do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) no controle da função do barorreflexo foi identificado usando a abordagem farmacológica (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2010), mas a inibição desta área hipotalâmica não afetou o barorreflexo espontâneo (ANDRADE, DE *et al.*, 2014). Essa ideia é apoiada ainda por evidências de que estressores emocionais crônicos afetaram de forma diferente as respostas barorreflexas avaliadas pela técnica de análise de sequência e pela abordagem farmacológica (ALMEIDA *et al.*, 2015; COSTA-FERREIRA *et al.*, 2016; FIRMINO *et al.*, 2019).

Não identificamos um efeito da administração intra-HL de antagonistas dos receptores CRFérgicos nos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca. Esse achado está de acordo com evidências anteriores de que a lesão, o bloqueio sináptico químico não-seletivo ou o antagonismo de receptores GABAérgicos ou glutamatérgicos no HL não afetaram a função cardiovascular basal (CRESTANI, Carlos C. *et al.*, 2009; DEOLINDO *et al.*, 2013; GOMES-DE-SOUZA *et al.*, 2019; HAIBARA *et al.*, 1994). Portanto, apesar das evidências de um papel nas respostas barorreflexas, o HL parece não estar envolvido na manutenção tônica da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Diferentemente das condições de repouso, durante os desafios ambientais (por exemplo, estresse emocional e exercício) o aumento da pressão arterial é seguido por taquicardia (CRESTANI, Carlos C., 2016; DAMPNEY, R.A.L.; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008). O aumento paralelo da pressão arterial e da frequência cardíaca durante essas situações é mediado por uma modulação da função barorreflexa. Na verdade, está bem descrito que o ponto de ajuste do barorreflexo é redefinido para valores de pressão arterial mais elevados durante o exercício e o estresse (CRESTANI, Carlos C., 2016; DAMPNEY, Roger A. L.,

2017; MUELLER *et al.*, 2017; RAVEN; YOUNG; FADEL, 2019), o que permite aumento paralelo da pressão arterial e frequência cardíaca. Esta modulação da função barorreflexa é proposta ser mediada por projeções inibitórias de centros superiores (por exemplo, regiões diencefálicas) para o circuito bulbar do barorreflexo (DAMPNEY, Roger A. L., 2017). Nesse sentido, nós reportamos recentemente que a microinjeção do antagonista do receptor CRF₁ CP376395 no HL reduziu as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca durante uma sessão de estresse emocional (BARRETTO-DE-SOUZA *et al.*, 2021), o que indicou um envolvimento desse receptor no HL na geração das respostas ao estresse. O papel do receptor CRF₂ nas respostas cardiovasculares ao estresse não foi avaliada nesse estudo. Desse modo, a influência facilitatória dos receptores CRF₁ no HL indica que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse emocional parece ser independente da modulação barorreflexa reportada no presente estudo, uma vez que facilitação da atividade barorreflex durante o estresse teria uma influência inibitória sobre as respostas cardiovasculares. Entretanto, a influência inibitória dos receptores CRF₂ no HL na função barorreflexa pode estar envolvida nas mudanças das respostas reflexas durante desafios ambientais, contribuindo assim na geração das respostas da pressão arterial e da frequência cardíaca durante o exercício e ameaças aversivas. No entanto, o papel do receptor CRF₂ no HL controle das respostas cardiovasculares durante desafios ambientais ainda precisa ser descrito.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo fornecem evidências de que a neurotransmissão CRFérgica no HL modula as respostas cardíacas do barorreflexo. No entanto, nossos dados indicam que este mecanismo neuroquímico no HL controla a função barorreflexa durante variações fisiológicas espontâneas da pressão arterial, mas sem afetar as respostas reflexas durante mudanças mais pronunciadas da pressão arterial. Além disso, os resultados do presente estudo indicam que os receptores CRF₁ e CRF₂ no HL modulam de forma oposta as respostas cardíacas reflexas durante as variações espontâneas da pressão arterial por meio de mecanismos diferentes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S. K.; CALARESU, F. R. Supramedullary inputs to cardiovascular neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2017.

ALLEN, G. V.; CECHETTO, D. F. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area. II. Ascending projections. **Journal of Comparative Neurology**, 1993.

ALMEIDA, J. *et al.* Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress**, 2015.

ANDRADE, O. DE *et al.* Paraventricular nucleus of hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. **Neuroscience Letters**, 2014.

ARRIGONI, E.; CHEE, M. J. S.; FULLER, P. M. To eat or to sleep: That is a lateral hypothalamic question. **Neuropharmacology**, [S.l.], 2018.

BAJI, D. *et al.* Temporal analysis of the spontaneous baroreceptor reflex during mild emotional stress in the rat. **Stress**, 2010.

BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF AND CRF RECEPTORS: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 2004.

BARRETTO-DE-SOUZA, L. *et al.* Corticotropin-releasing factor neurotransmission in the lateral hypothalamus modulates the tachycardiac response during acute emotional stress in rats. **Brain Research Bulletin**, 2021. v. 166, p. 102–109.

BEHAN, D. P. *et al.* Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: A novel regulator of CRF and related peptides. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 1995.

BEHBEHANI, M. M.; PARK, R.; CLEMENT, M. E. Interactions between periaqueductal gray the lateral hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**, 1988.

BERK, M. L.; FINKELSTEIN, J. A. Efferent connections of the lateral hypothalamic area of the rat: An autoradiographic investigation. **Brain Research Bulletin**, 1982.

BERTINIERI, G. *et al.* A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, dez. 1985. v. 3, n. 3, p. S79-81.

BITTENCOURT, J. C. *et al.* Urocortin expression in rat brain: Evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. **Journal of Comparative Neurology**, 1999.

BROWN, M. Corticotropin releasing factor: Central nervous system sites of action. **Brain Research**, 1986.

BROWN, M. R. *et al.* Corticotropin-releasing factor: Actions on the sympathetic nervous system and metabolism. **Endocrinology**, 1982.

BROWN, M. R.; FISHER, L. A. Corticotropin-releasing factor: Effects on the autonomic nervous system and visceral systems. **Federation Proceedings**, 1985.

CECHETTO, D. F.; CHEN, S. J. Hypothalamic and cortical sympathetic responses relay in the medulla of the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, set. 1992. v. 263, n. 3, p. R544–R552. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1992.263.3.R544>>.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; SOUZA, E. B. DE. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 1995.

CHAPPELL, P. B. *et al.* Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 1986.

COSTA-FERREIRA, W. *et al.* Involvement of type 1 angiotensin II receptor (AT1) in cardiovascular changes induced by chronic emotional stress: Comparison between homotypic and heterotypic stressors. **Frontiers in Pharmacology**, 2016.

COSTA-FERREIRA, W.; GOMES-DE-SOUZA, L.; CRESTANI, C. C. AT2 and MAS (but not AT1) angiotensinergic receptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the baroreflex activity in rats. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, 2019.

CRESTANI, C. C. *et al.* Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2009.

CRESTANI, C. C. *et al.* Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, 2009.

CRESTANI, C. C. *et al.* N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neuroscience research**, ago. 2010. v. 67, n. 4, p. 317–26.

CRESTANI, C. C. **Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: A review of the influence of stress type.** **Frontiers in Physiology**.

CRITCHLEY, H. D.; HARRISON, N. A. **Visceral Influences on Brain and Behavior.** **Neuron**.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, abr. 1994. v. 74, n. 2, p. 323–364. Disponível em:

<<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1994.74.2.323>>.

DAMPNEY, R. A. L. Resetting of the Baroreflex Control of Sympathetic Vasomotor Activity during Natural Behaviors: Description and Conceptual Model of Central Mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, ago. 2017. v. 11.

DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Autonomic Neuroscience**, nov. 2008. v. 142, n. 1–2, p. 3–10.

DAUTZENBERG, F. M.; HAUGER, R. L. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. **Trends in Pharmacological Sciences**, fev. 2002. v. 23, n. 2, p. 71–77. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614702019466>>.

DEDIC, N.; CHEN, A.; DEUSSING, J. M. The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. **Current Molecular Pharmacology**, 2017. v. 11, n. 1.

DEOLINDO, M. V *et al.* NMDA receptors in the lateral hypothalamus have an inhibitory influence on the tachycardiac response to acute restraint stress in rats. **European Journal of Neuroscience**, ago. 2013. v. 38, n. 3, p. 2374–2381.

DEUSSING, J. M.; CHEN, A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. **Physiological Reviews**, out. 2018. v. 98, n. 4, p. 2225–2286.

DIAMANT, M. *et al.* Corticotropin-releasing factor induces differential behavioral and cardiovascular effects after intracerebroventricular and lateral hypothalamic/perifornical injections in rats. **Neuroendocrinology**, 1992.

ELIAS, C. F. *et al.* Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, 1999.

FIRMINO, E. M. S. *et al.* Effect of chronic stress on cardiovascular and ventilatory responses activated by both chemoreflex and baroreflex in rats. **The Journal of Experimental Biology**, out. 2019. v. 222, n. 20, p. jeb204883.

FISHER, L. A. *et al.* Corticotropin-releasing factor (CRF): central effects on mean arterial pressure and heart rate in rats. **Endocrinology**, 1982.

FISHER, L. A.; JESSEN, G.; BROWN, M. R. Corticotropin-releasing factor (CRF): mechanism to elevate mean arterial pressure and heart rate. **Regulatory Peptides**, 1983.

FUKUSHI, I.; YOKOTA, S.; OKADA, Y. The role of the hypothalamus in modulation of respiration. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, [S.l.], 2018.

GELSEMA, A. J.; ROE, M. J.; CALARESU, F. R. Neurally mediated cardiovascular responses to stimulation of cell bodies in the hypothalamus of the rat. **Brain Research**, 1989.

GOMES-DE-SOUZA, L. *et al.* GABAA but not GABAB receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardiac response to emotional stress in rats.

European Neuropsychopharmacology, maio. 2019. v. 29, n. 5, p. 672–680.

GRASSI, G. *et al.* Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. **Elsevier**, 2006. v. 48, n. 6, p. 407–415.

GU, G. B.; SIMERLY, R. B. Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. **Journal of Comparative Neurology**, 1997.

HAIBARA, A. S. *et al.* Role of lateral hypothalamus on fluid, electrolyte, and cardiovascular responses to activation of the MSA. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, fev. 1994. v. 266, n. 2, p. R496–R502.

HALLER, J. The Role of the Lateral Hypothalamus in Violent Intraspecific Aggression—The Glucocorticoid Deficit Hypothesis. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 2018.

HAUGER, R. L. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotropin-Releasing Factor and Their Ligands. **Pharmacological Reviews**, 2003.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 1987.

HENCKENS, M. J. A. G.; DEUSSING, J. M.; CHEN, A. **Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. Nature Reviews Neuroscience.**

HOEBEL, B. G.; TEITELBAUM, P. Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. **Science**, 1962.

HOSOYA, Y.; MATSUSHITA, M.; SUGIURA, Y. A direct hypothalamic projection to the superior salivatory nucleus neurons in the rat. A study using anterograde autoradiographic and retrograde HRP methods. **Brain Research**, 1983.

INUI, K. *et al.* Facilitation of the arterial baroreflex by the preoptic area in anaesthetized rats. **The Journal of Physiology**, 1995.

KAUFMANN, H.; NORCLIFFE-KAUFMANN, L.; PALMA, J.-A. Baroreflex Dysfunction. **New England Journal of Medicine**, 2020. v. 382, n. 2, p. 163–178.

KOOY, D. VAN DER *et al.* The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. **Journal of Comparative Neurology**, 1984.

KUROSAWA, M. *et al.* Sympatho-adrenal medullary functions in response to intracerebroventricularly injected corticotropin-releasing factor in anesthetized rats. **Brain Research**, 1986.

LATARO, R. M. *et al.* Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in early heart failure assessed by the sequence method. **Journal of Physiology**, 2017.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The baroreflex as a long-term controller of arterial pressure. **Physiology**.

MICHELINI, L. C. *et al.* Neural control of circulation and exercise: A translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 1 ago. 2015. v. 309, n. 3, p. H381–H392.

MUELLER, P. J. *et al.* Integration of Central and Peripheral Regulation of the Circulation during Exercise: Acute and Chronic Adaptations. **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017, p. 103–151.

PAJOLLA, G. P. *et al.* The lateral hypothalamus is involved in the pathway mediating the hypotensive response to cingulate cortex-cholinergic stimulation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2001.

PAPPANO, A. J.; WIER, W. G. **Cardiovascular Physiology, Tenth Edition**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Sydney : Academic Press**. [S.l.]: [s.n.], 1997.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Sydney : Academic Press**, 1986.

PERRIN, M. H.; VALE, W. W. Corticotropin Releasing Factor Receptors and Their Ligand Family. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 6 fev. 2006. v. 885, n. 1, p. 312–328.

PETT, K. VAN *et al.* Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **Journal of Comparative Neurology**, 2000.

PLAS, J. VAN DER *et al.* Cardiovascular effects and changes in midbrain periaqueductal gray neuronal activity induced by electrical stimulation of the hypothalamus in the rat. **Brain Research Bulletin**, 1995.

PUGLIESI PAJOLLA, G.; MORGAN DE AGUIAR CORRÊA, F. Cardiovascular responses to the injection of l-glutamate in the lateral hypothalamus of unanesthetized or anesthetized rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 2004.

RAVEN, P. B.; YOUNG, B. E.; FADEL, P. J. Arterial Baroreflex Resetting During Exercise in Humans. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, jul. 2019. v. 47, n. 3, p. 129–141.

REDGATE, E. S.; GELLHORN, E. Respiratory Activity and the Hypothalamus. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, 1958.

REYES DEL PASO, G. A.; GONZÁLEZ, I.; HERNÁNDEZ, J. A. Baroreceptor sensitivity and effectiveness varies differentially as a function of cognitive-attentional demands. **Biological Psychology**, 2004.

REYES DEL PASO, G. A.; MATA, J. L.; MARTÍN-VÁZQUEZ, M. Relationships between baroreceptor cardiac reflex sensitivity and cognitive performance: Modulations by gender and blood pressure. **Psychophysiology**, 2012.

RIENZO, M. DI *et al.* Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, mar. 2001. v. 280, n. 3,

p. R744–R751.

ROVERE, M. T. LA *et al.* Baroreflex sensitivity, clinical correlates, and cardiovascular mortality among patients with a first myocardial infarction: A prospective study. **Circulation**, 1988.

SAPER, C. B.; LOEWY, A. D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Research**, 1980.

SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 1979.

SAWCHENKO, P. E. Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. **Brain Research**, 1987.

SHIMIZU, H.; BRAY, G. A. Modulation by corticotropin-releasing factor of monoamine metabolism in the lateral hypothalamus. **Neuroscience Letters**, 1989.

SILVA, L. E. V.; KATAYAMA, P. L. Baroreflex-mediated sympathetic overactivation induced by mental stress in post-traumatic stress disorder depends on the type of stressor. **The Journal of Physiology**, set. 2017. v. 595, n. 17, p. 5757–5758.

SIMERLY, R. B. Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration. **The Rat Nervous System**. [S.l.]: [s.n.], 2004.

SOUZA, E. B. DE *et al.* Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. **The Journal of neuroscience**, 1985.

SUN, M. K.; GUYENET, P. G. Hypothalamic glutamatergic input to medullary sympathoexcitatory neurons in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, out. 1986. v. 251, n. 4, p. R798–R810. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1986.251.4.R798>>.

SWANSON, L. W. *et al.* Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, 1983.

SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 1977.

SWENNE, C. A. Baroreflex sensitivity: Mechanisms and measurement. **Netherlands Heart Journal**, 2013. v. 21, n. 2, p. 58–60.

THAYER, J. F. *et al.* **Heart rate variability, prefrontal neural function, and cognitive performance: The neurovisceral integration perspective on self-regulation, adaptation, and health.** **Annals of Behavioral Medicine**.

VALE, W. *et al.* Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. **Science**, 1981.

WITTMANN, G. *et al.* Distribution and axonal projections of neurons coexpressing thyrotropin-releasing hormone and urocortin 3 in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, 2009.

WOODWORTH, C. H. Attack elicited in rats by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. **Physiology and Behavior**, 1971.