

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Fármacos e Medicamentos
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP

**Envolvimento da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina
(CRF) no hipotálamo lateral nas respostas cardiovasculares e
comportamentais ao estresse em ratos**

Lucas Barretto de Souza

Araraquara
2023

Lucas Barretto de Souza

Envolvimento da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina (CRF) no hipotálamo lateral nas respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse em ratos

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Araraquara

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Relatório de Defesa de Tese

Candidato: Lucas Barretto de Souza

Aos 26/09/2023, às 08:30, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a defesa de tese de doutorado sob o título: Envolvimento da neurotransmissão do fator liberador de corticotrofina (CRF) no hipotálamo lateral nas respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse em ratos, apresentada pelo candidato Lucas Barretto de Souza. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Profa. Dra. Mirela Barros Dias
Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes
Profa. Dra. Daniela Baptista de Souza
Prof. Dr. Felipe Villela Gomes

Função Instituição

Presidente UNESP
Titular UNESP
Titular UFMG
Titular UNESP
Titular USP

Conceito

A
A
A
A
A

Resultado

Final
Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora*:

O candidato apresentou de maneira clara e objetiva os dados obtidos e respondeu de maneira segura todos os questionamentos durante a arguição.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, representante do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Representante do PPG: Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Profa. Dra. Mirela Barros Dias

Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes

Profa. Dra. Daniela Baptista de Souza

Prof. Dr. Felipe Villela Gomes

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Mirela Barros Dias, Marco Antônio Peliky Fontes, Daniela Baptista de Souza, Felipe Villela Gomes e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

() Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

Observações:

- a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Ciências Fisiológicas, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Momaya e Ocimar, e ao meu irmão, Bruno. A concretização dele se deve a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Carlos C. Crestani** pela orientação durante toda minha carreira acadêmica, que foi fundamental em minha evolução como cientista e profissional.

À **minha família** por ter me apoiado e incentivado durante todas as etapas dessa caminhada.

A todos os **integrantes do laboratório de farmacologia da UNESP Araraquara** que fazem ou fizeram parte do meu dia a dia. Cada um teve e tem um papel importante nessa jornada.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara** por ter cedido o espaço para realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2018/14.284-4)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, processo 164856/2018-8)** pelo apoio financeiro.

Por fim, meu máximo respeito a todos os **animais** utilizados nesta pesquisa. Reconheço a responsabilidade envolvida em seu uso e o impacto positivo para o avanço do conhecimento científico.

RESUMO

O hipotálamo lateral (HL) é uma área hipotalâmica implicada na integração das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse. De fato, foi demonstrado o envolvimento do HL nas respostas cardiovasculares ao estresse e no controle de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão. O sistema do fator liberador de corticotrofina (CRF) foi demonstrado ser um importante mecanismo neuroquímico no sistema nervoso central envolvido na etiologia das alterações comportamentais e nos ajustes fisiológicos induzidos pela exposição a situações aversivas. Além disso, a exposição crônica a situações aversivas afeta a expressão dos componentes do sistema “CRFérgico” em regiões encefálicas envolvidas no controle das respostas ao estresse. Assim, a hipótese de nosso trabalho foi que a neurotransmissão “CRFérgica” presente no HL está envolvida nas alterações cardiovasculares e comportamentais relacionadas à ansiedade induzidas pelo estresse de restrição agudo ou repetido, assim como nas alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico variável (ECV). Inicialmente, investigamos o efeito da microinjeção bilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) ou antisauvagine-30 (ASV-30; antagonista seletivo do receptor CRF₂) nas respostas cardiovasculares durante o estresse de restrição agudo. Foi identificado que a microinjeção de CP376395 ou ASV-30 diminuiu a resposta de taquicardia durante uma sessão aguda de estresse de restrição, porém sem alterar as respostas pressora e a queda de temperatura cutânea da cauda. Nós também comparamos o efeito do tratamento do HL com os antagonistas dos receptores CRF₁ ou CRF₂ sobre as respostas cardiovasculares durante a 1^o e a 10^o sessão de estresse de restrição. Assim como observado nos animais estressados agudamente, nós identificamos que o tratamento do HL com CP376395 ou ASV-30 reduziu a resposta de taquicardia durante a 10^o sessão de estresse de restrição. Além disso, o tratamento do HL com CP376395 aumentou a resposta de queda da temperatura cutânea da cauda durante a 10^o sessão de restrição. Adicionalmente, foi realizada a avaliação do envolvimento dos receptores CRF₁ e CRF₂ do HL no controle do comportamento do tipo ansioso induzido por uma sessão aguda ou 10 sessões de estresse de restrição. Nós identificamos que o tratamento do HL com CP376395 ou ASV-30 inibiu a resposta comportamental do tipo ansiogênica avaliada no labirinto em cruz elevado (LCE) desencadeada pela sessão aguda de estresse de restrição. Nós não identificamos alterações comportamentais no LCE nos animais submetidos repetidamente ao estresse de restrição, e os tratamentos farmacológicos também não tiveram nenhum efeito comportamental quando administrados antes da 10^o sessão de restrição. A avaliação da influência do sistema “CRFérgico” nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV indicou que o

antagonismo dos receptores CRF₁ ou CRF₂ no HL evitou o prejuízo na atividade barorreflexa observada nos animais submetidos ao ECV. Por fim, foi avaliado o efeito da exposição ao estresse repetido de restrição (ERR) ou ao ECV sobre os níveis proteicos dos receptores “CRFérgicos” no HL. Foi observado que o ERR não teve influência nos níveis de ambos os receptores CRFérgicos, porém o ECV promoveu um aumento dos níveis proteicos do receptor CRF₂, sem alterar os níveis do receptor CRF₁. Em suma, os dados do presente estudo indicam que a neurotransmissão “CRFérgica” no HL participa do controle de respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse agudo e crônico.

ABSTRACT

The lateral hypothalamus (LH) is a hypothalamic area implicated in the integration of physiological and behavioral responses to stress. Indeed, it has been demonstrated the involvement of the LH in cardiovascular responses to stress and in the control of behavioral responses related to anxiety and depression. The corticotropin-releasing factor (CRF) system has been shown to be an important neurochemical mechanism in the central nervous system involved in the etiology of behavioral changes and physiological adjustments induced by exposure to aversive situations. In addition, chronic exposure to aversive situations affects the expression of CRF components in brain regions involved in the control of stress responses. Therefore, the hypothesis of our work was that the CRF neurotransmission present in the LH is involved in the cardiovascular and anxiety-like behavioral changes induced by acute or repeated restraint stress, as well as in the cardiovascular changes induced by chronic variable stress (CVS). Initially, we investigated the effect of bilateral microinjection of the selective CRF₁ receptor antagonist CP376395 or the selective CRF₂ receptor antagonist antisauvagine-30 (ASV-30) on cardiovascular responses during acute restraint stress. It was identified that microinjection of CP376395 or ASV-30 into the LH decreased the tachycardia response during an acute session of restraint stress, but without altering the pressor responses and tail skin temperature drop. We also compared the effect of LH treatment with CRF₁ or CRF₂ receptor antagonists on cardiovascular responses during the 1st and 10th session of restraint stress. As observed in the acutely stressed animals, we identified that treatment of the LH with CP376395 or ASV-30 reduced the tachycardia response during the 10th restraint stress session. Furthermore, treatment of the HL with CP376395 increased the tail skin temperature drop response during the 10th restraint session. In addition, we evaluated the involvement of LH CRF₁ and CRF₂ receptors in the control of anxiety-like behavior induced by an acute or 10 sessions of restraint stress. We identified that treatment of the LH with CP376395 or ASV-30 inhibited the ansiogenic-like effect in the elevated plus maze (EPM) induced by the acute session of restraint stress. We did not identify behavioral changes in the EPM in animals repeatedly subjected to restraint stress, and pharmacological treatments also had no behavioral effect when administered before the 10th restraint session. The evaluation of the influence of the CRF system on the cardiovascular changes induced by CVS indicated that antagonism of either CRF₁ or CRF₂ receptors in the LH prevented the impairment in baroreflex activity observed in animals subjected to CVS. Finally, the effect of exposure to repeated restraint stress (RRS) or CVS on protein levels of CRF receptors in the LH was assessed. It was observed that RRS had no influence on the levels of both CRF receptors, but CVS caused an increase in CRF₂ receptor

protein levels, but without altering CRF₁ receptor levels. In summary, the data of the present study indicate that CRF neurotransmission in the LH mediates cardiovascular and behavioral responses to acute and chronic stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática ilustrando os parâmetros analisados nas curvas sigmóides.....33
- Figura 2** - Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ no HL no controle cardiovascular pelo estresse agudo de restrição.....39
- Figura 3** - Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ e CRF₂ no HL no controle cardiovascular por uma sessão aguda ou a 10^o de estresse de restrição.....40
- Figura 4** - Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ e CRF₂ no HL no controle do comportamento relacionado a ansiedade evocado por uma sessão aguda ou 10^a de estresse de restrição.....42
- Figura 5** - Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ e CRF₂ no HL nas alterações dos parâmetros cardiovasculares e barorreflexos evocado pelo ECV.....43
- Figura 6** - Linha do tempo ilustrando o protocolo experimental para avaliação dos níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL após a exposição o ERR ou ECV.....44
- Figura 7** - Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda induzidas por uma sessão aguda de estresse de restrição em animais tratados com CP376395 no HL nas doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol.....47
- Figura 8** – Registros de pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos representativos antes, durante e após a sessão de estresse de restrição, ilustrando o efeito do tratamento local do LH com veículo ou o antagonista do receptor CRF₁ (CP376395) em doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol.....48
- Figura 9** - **A.** Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro de um rato representativo mostrando sítios de microinjeção bilaterais no hipotálamo lateral. **B.** Representação diagramática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral de salina e CP376395 nas doses de 1 nmol, 0,1 nmol e 0,01nmol.....49
- Figura 10** - Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda induzidas durante uma sessão aguda e pela 10^o sessão de estresse de restrição em animais tratados com CP376395 ou veículo no HL.....53
- Figura 11** – Pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca antes, durante e após a sessão aguda e 10^o sessão de estresse de restrição de ratos representativos submetidos a tratamento local do HL com veículo ou CP376395.....54
- Figura 12** – **A.** Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro de um rato representativo mostrando sítios de microinjeção bilaterais no hipotálamo lateral. **B.** Representação

diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral de veículo e de CP376395 em animais submetidos a uma sessão ou a 10 sessões de estresse de restrição.....55

Figura 13 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda induzidas durante uma sessão aguda e pela 10^o sessão de estresse de restrição em animais tratados com antisauvagine-30 nas doses de 0,01nmol ou 5nmol ou veículo no HL.....58

Figura 14 - Pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca antes, durante e após a sessão aguda e 10^o sessão de estresse de restrição de ratos representativos submetidos a tratamento local do HL com veículo ou ASV-30.....59

Figura 15 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral de veículo e de antisauvagine-30 em animais submetidos a uma sessão ou a 10 sessões de estresse de restrição.....60

Figura 16 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado por cinco minutos em animais não-estressados e imediatamente após uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição em animais que receberam microinjeção bilateral de CP376395 ou veículo no HL.....63

Figura 17 - Imagens representativas mostrando a exploração do LCE após a sessão aguda ou a 10^a sessão de estresse de restrição em animais tratados com veículo ou CP376395 no HL.....64

Figura 18 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral de salina e de CP376395 em animais submetidos a uma sessão ou a 10 sessões de estresse de restrição.....65

Figura 19 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado por cinco minutos em animais não-estressados e imediatamente após uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição em animais que receberam microinjeção bilateral de antisauvagine-30 ou veículo no HL.....68

Figura 20 - Imagens representativas mostrando a exploração do LCE após a sessão aguda ou a 10^a sessão de estresse de restrição em animais tratados com veículo ou ASV-30 no HL.....69

Figura 21 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral de salina e de antisauvagine-30 em animais submetidos a uma sessão ou a 10 sessões de estresse de restrição.....70

Figura 22 - Análise espectral do IP em animais controle e ECV tratados com veículo ou o antagonista seletivo do receptor CRF₁ CP376395 no HL.....72

Figura 23 - Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF ₁ CP376395 ou veículo em animais não-estressados ou submetidos ao ECV.....	74
Figura 24 - Atividade barorreflexa avaliada pelo método de sequência em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF ₁ CP376395 ou veículo.....	76
Figura 25 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no HL de veículo ou de ASV-30 em animais controle ou submetidos ao ECV.....	77
Figura 26 - Análise espectral do IP em animais controle e ECV tratados com veículo ou o antagonista seletivo do receptor CRF ₂ ASV-30 no HL.....	79
Figura 27 - Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF ₂ ASV-30 ou veículo em animais não-estressados ou submetidos ao ECV.....	81
Figura 28 - Atividade barorreflexa avaliada pelo método de sequência em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF ₂ ASV-30 ou veículo.....	83
Figura 29 - Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson indicando os sítios de microinjeção no HL de veículo ou de ASV-30 em animais controle ou submetidos ao ECV.....	84
Figura 30 - A. Fotomicrografia de uma seção coronal do cérebro representando o local de retirada de tecido do HL utilizado nas análises. B. Curva temporal do peso corporal de ratos controle e submetidos ao ERR ou ECV. C e D. Níveis proteicos do receptor CRF ₁ e CRF ₂ no HL em animais controle, expostos ao ERR ou ECV.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de estresse crônico variável.....	32
Tabela 2 - Parâmetros basais da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do HL com CP376395.....	46
Tabela 3 - Parâmetros basais da pressão arterial média frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do HL com CP376395 ou veículo em animais sujeitos a uma sessão aguda ou a exposição repetida ao estresse de restrição.....	50
Tabela 4 - Parâmetros basais de pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do HL com antisauvagine-30 ou veículo em animais sujeitos a uma sessão aguda ou a exposição repetida ao estresse de restrição.....	56
Tabela 5 - Parâmetros basais da pressão arterial média e frequência cardíaca após o tratamento farmacológico do HL com CP376395 ou veículo em animais controle ou sujeito a exposição ao ECV.....	71
Tabela 6 - Parâmetros basais da pressão arterial média e frequência cardíaca após o tratamento farmacológico do HL com antisauvagine-30 ou veículo em animais controle ou sujeito a exposição ao ECV.....	78
Tabela 7 - Resumo dos achados obtidos no presente estudo.....	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. HIPOTÁLAMO LATERAL E AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO TIPO ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE	16
1.2. NEUROTRANSMISSÃO “CRFÉRGICA” E AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO TIPO ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE	20
1.3. HIPOTÁLAMO LATERAL E AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO TIPO ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE: NEUROTRANSMISSÃO “CRFÉRGICA”	22
2. OBJETIVOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1. ANIMAIS	27
3.2. IMPLANTE DE CÂNULAS GUIAS DIRECIONADAS AO HIPOTÁLAMO LATERAL	27
3.3. CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL	28
3.4. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	29
3.5. REGISTRO DA TEMPERATURA CUTÂNEA DA CAUDA	29
3.6. ANÁLISE COMPORTAMENTAL NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	29
3.7. DROGAS E SOLUÇÕES	30
3.8. MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	30
3.9. ESTRESSE	31
3.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTÔNOMA ATRAVÉS DA ANÁLISE ESPECTRAL	32
3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BARORREFLEXA	33
3.12. DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO DAS DROGAS NO ENCÉFALO	34
3.13. MEDIDAS DOS NÍVEIS PROTEICOS DOS RECEPTORES CRF₁ E CRF₂ NO HL	34
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	38
4.1. Efeito do tratamento do HL com diferentes doses do antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) nas respostas cardiovasculares induzida pelo estresse de restrição agudo em ratos	38
4.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição	39
4.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL no comportamento do tipo ansioso após uma sessão aguda ou 10 sessões de estresse de restrição	40
4.4. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV	42
4.5. Estudo do efeito do ERR e ECV sobre os níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂	43
5. RESULTADOS	45
5.1. Efeito do tratamento do HL com diferentes doses do antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) nas respostas cardiovasculares induzida pelo estresse de restrição agudo em ratos	45
5.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição	50
5.2.1. Estudo do envolvimento do receptor CRF₁ no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição	50
5.2.2. Estudo do envolvimento do receptor CRF₂ no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição	56
5.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL na resposta do tipo ansiogênica após uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição	61

<i>5.3.1 Efeito do tratamento do HL com antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) na resposta do tipo ansiogênica após uma sessão aguda e a 10^o sessão de estresse de restrição em ratos</i>	61
<i>5.3.2. Efeito do tratamento do HL com antagonista seletivo do receptor CRF₂ (antisauvagine-30) na resposta do tipo ansiogênica após uma sessão aguda e a 10^o sessão de estresse de restrição em ratos</i>	66
5.4. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV	71
<i>5.4.1. Estudo do envolvimento do receptor CRF₁ no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV</i>	71
<i>5.4.1.1. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF₁ nos parâmetros cardiovasculares basais em animais controle e submetidos ao ECV</i>	71
<i>5.4.1.2. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF₁ na atividade autônoma cardíaca em animais controle e submetidos ao ECV</i>	72
<i>5.4.1.3. Efeitos do tratamento farmacológico do HL com o antagonista dos receptores CRF₁ na atividade barorreflexa de animais controle e submetidos ao ECV</i>	73
<i>5.4.2. Estudo do envolvimento do receptor CRF₂ no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV</i>	78
<i>5.4.2.1. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF₂ nos parâmetros cardiovasculares basais em animais controle e submetidos ao ECV</i>	78
<i>5.4.2.2. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF₂ na atividade autônoma cardíaca em animais controle e submetidos ao ECV</i>	79
<i>5.4.2.3. Efeitos do tratamento farmacológico do HL com o antagonista dos receptores CRF₂ na função barorreflexa de animais controle e submetidos ao ECV</i>	80
5.5. Estudo do efeito da exposição repetida ao estresse de restrição (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV) sobre os níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL	85
6. DISCUSSÃO	87
6.1. NEUROTRANSMISSÃO “CRFÉRGICA” NO HL E AS REPOSTAS CARDIOVASCULARES AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO	88
6.2. NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA NO HL E A RESPOSTA COMPORTAMENTAL DO TIPO ANSIOGÊNICA AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO	94
6.3. NEUROTRANSMISSÃO “CRFÉRGICA” NO HL E AS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES DESENCADEADAS PELO ECV	97
7. CONCLUSÃO	103
8. REFERÊNCIAS	104
9. ANEXOS	117
9.1. ANEXO I - ARTIGO PUBLICADO COM DADOS OBTIDOS DO PROTOCOLO 4.1. DESSE ESTUDO	117
9.2. ANEXO II - ARTIGO PUBLICADO COM DADOS OBTIDOS DOS PROTOCOLOS 4.2, 4.3 E 4.5 DESSE ESTUDO	118
9.3. Anexo III - Artigo publicado com dados obtidos no estágio de pesquisa no exterior (BEPE – FAPESP) realizado no Boston College na cidade de Boston/EUA sob a supervisão do Prof. Dr. John P. Christianson	119

1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência e a adaptação de todas as espécies a situações de estresse requerem um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (CRESTANI, 2016a; MCEWEN, 2017; STERLING, 2012; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009a). As respostas fisiológicas ao estresse são geradas a partir de alterações na atividade autônoma, neuroendócrina e imunológica (CRESTANI, 2016a; MCEWEN, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009a). O sistema nervoso autônomo promove as respostas imediatas ao estresse, que são caracterizadas principalmente por aumento das catecolaminas circulantes e da atividade nervosa simpática e alteração na atividade do barorreflexo, que por sua vez contribuem para as respostas cardiovasculares, incluindo aumento na pressão arterial e frequência cardíaca e redistribuição do fluxo sanguíneo (redução na perfusão cutânea e visceral e aumento na musculatura esquelética) (CRESTANI, 2016a; DAMPNEY, 2015a; DAMPNEY; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008). A diminuição do fluxo sanguíneo nos leitos cutâneos reduz a temperatura da pele durante situações aversivas (BUSNARDO et al., 2013; VIANNA; CARRIVE, 2005).

As respostas fisiológicas a estímulos aversivos são consideradas adaptativas a curto prazo, sendo necessárias para a sobrevivência e a adaptação das espécies (STERLING, 2012). Entretanto, a ativação repetida ou prolongada dessas respostas, como observada em situações de exposição crônica a eventos estressores, pode causar alterações morfofuncionais, que podem levar em último caso a doenças (CRESTANI, 2016a; MCEWEN, 2007, 2017). De fato, foi reportado que a exposição repetida a estímulos estressores (i.e., estresse crônico) promoveu alterações na função cardiovascular de roedores, incluindo: aumento nos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca, alterações no balanço da atividade simpática e parassimpática cardíaca, disfunção cardíaca (cardiomiopatia, isquemia e arritmia), comprometimento na atividade do barorreflexo e disfunção vascular (e.g., disfunção endotelial) (CARNEVALI et al., 2017; CRESTANI,

2016a; GOLBIDI; FRISBEE; LAHER, 2015; GRIPPO, 2009; SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014a).

Estudos clínicos e pré-clínicos também demonstraram uma associação entre a exposição a eventos estressores e o desenvolvimento de vários transtornos neuropsiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão (CAMPOS et al., 2013; CARNEVALI et al., 2017; YANG et al., 2015). De fato, estudos em roedores evidenciaram que a exposição tanto a eventos estressores agudos quanto crônicos aumentaram a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão (BUSNARDO et al., 2013; CARNEVALI et al., 2017; GRIPPO, 2009; KORTE; DE BOER, 2003; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; SEVGI; OZEK; EROGLU, 2006; SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014b). Transtornos de humor e de ansiedade são considerados fatores de risco para a morbidade e mortalidade cardiovascular, ao passo que doenças cardiovasculares podem aumentar a incidência de quadros de depressão e ansiedade (GLASSMAN, 2007; HARE et al., 2014; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999; SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014b). Essas evidências indicam uma possível relação entre as alterações comportamentais e as disfunções cardiovasculares induzidas pelo estresse. Entretanto, apesar da importância das respostas cardiovasculares e comportamentais durante sessões agudas de estresse, bem como das disfunções observadas após a exposição crônica a eventos estressores, os mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas respostas ainda são pouco compreendidos.

1.1. Hipotálamo lateral e as respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo ansiogênica ao estresse

As respostas fisiológicas durante o estresse psicológico são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central (SNC), através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (DAMPNEY, 2015b; FONTES et al., 2011; JOËLS; BARAM, 2009; MYERS, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009b). O hipotálamo lateral (HL) é uma região

diencefálica complexa que se estende da área pré-óptica lateral até a área tegmentar ventral, e inclui o feixe prosencefálico medial (SAPER; SWANSON; COWAN, 1979). O HL é conectado a regiões límbicas como o córtex pré-frontal medial, a área septal lateral, a amígdala, o núcleo leito da estria terminal (NLET), o hipocampo e outras regiões hipotalâmicas; além de enviar projeções para núcleos localizados no hipotálamo e no tronco cerebral envolvidos na geração das respostas comportamentais e autônomas ao estresse (ALLEN; CECHETTO, 1992; BARONE et al., 1981; DONG; SWANSON, 2004; JIMENEZ et al., 2018; MARCINKIEWCZ et al., 2016; MYERS et al., 2014; PAJOLLA et al., 2001; RISOLD; SWANSON, 1997; SAPER et al., 1976a). Desse modo, o HL foi descrito como uma das áreas hipotalâmicas envolvidas na integração de respostas defensivas (CANTERAS, 2008). Nesse sentido, o HL foi reportado como uma das estruturas ativadas durante situações aversivas (BRISKI; GILLEN, 2001; CULLINAN et al., 1995; FURLONG et al., 2014; MOTTA; CANTERAS, 2015), e essa área hipotalâmica é implicada na integração das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse (CANTERAS, 2008; MOTTA; CANTERAS, 2015; MYERS, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009b).

Com relação à participação do HL nas respostas cardiovasculares ao estresse, evidências neuroanatômicas mostraram que o HL compõe a circuitaria simpática através de conexões diretas, e indiretas via a região ventrolateral do bulbo, com neurônios simpáticos na coluna intermediolateral da medula espinhal; além de possuir projeções para neurônios pré-ganglionares parassimpáticos no núcleo ambíguo e no núcleo dorsal do vago (ALLEN; CECHETTO, 1993; SAPER et al., 1976b; TER HORST; LUITEN; KUIPERS, 1984). Estudos iniciais forneceram evidências do envolvimento do HL na resposta de aumento da pressão arterial desencadeada por estímulos aversivos condicionados (IWATA; LEDOUX; REIS, 1986; LEDOUX et al., 1988; SMITH et al., 1980). Essas evidências foram posteriormente reforçadas pela demonstração da ativação de neurônios pré-motores simpáticos no HL durante a exposição a um estímulo aversivo condicionado (CARRIVE; GORISSEN, 2008). Entretanto, a participação do HL no controle das respostas

cardiovasculares à estímulos aversivos não-condicionados foi reportada somente recentemente. Nesse sentido, Deolindo e colaboradores (2013) demonstraram que o bloqueio sináptico não-seletivo do HL facilitou a resposta de taquicardia causada pelo estresse de restrição agudo, porém sem afetar a resposta pressora. Esse efeito foi mimetizado pelo tratamento local com um antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA, o que sugeriu um envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica local (DEOLINDO et al., 2013b). Adicionalmente, Gomes-de-Souza e colaboradores (2019) demonstraram que o tratamento do HL com um antagonista seletivo do receptor GABA_A, mas não com antagonista seletivo do receptor GABA_B, atenuou a taquicardia induzida pelo estresse de restrição agudo.

O envolvimento do HL nas respostas comportamentais desencadeadas pelo estresse foi pouco investigado. Entretanto, foi reportado que a inibição química de neurônios do HL através da microinjeção local de muscimol (agonista do receptor GABA_A) diminuiu a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) (HAKVOORT SCHWERDTFEGER; MENARD, 2008a). Um papel do HL em comportamentos relacionados à ansiedade foi também evidenciado em um estudo que comparou animais com fenótipo de alta ansiedade versus baixa ansiedade, em que foi identificado que animais com fenótipo de alta ansiedade apresentaram maior ativação do HL quando expostos ao campo aberto e ao braço aberto do LCE (SALOMÉ et al., 2004). Adicionalmente, dados recentes evidenciaram que neurônios positivos para galanina no HL modulam comportamentos do tipo ansioso (Owens-French et al., 2022). Além disso, dados indicam o HL como um importante sítio envolvido na resposta ansiogênica decorrente da ativação hipocampal (JIMENEZ et al., 2018). Um possível envolvimento do HL nas respostas comportamentais ao estresse é também fundamentada por achados de que a inibição da resposta ansiogênica ao estresse de restrição após o tratamento sistêmico com nicotina foi acompanhada por redução na ativação de neurônios no HL (HSU et al., 2007).

Outro aspecto relevante são as evidências de alterações funcionais e neuroquímicas no HL após a exposição a protocolos de estresse crônico. Por exemplo, a redução na ativação de células expressando o receptor tipo 1 do peptídeo semelhante a glucagon (receptor GLP-1) foi abolido após a exposição repetida ao estresse de restrição, quando comparada com a ativação após uma sessão aguda de restrição; ao passo que a ativação de células expressando o receptor de melanocortina do tipo 4 (MC4) foi mantida (CHAGRA et al., 2011). Por outro lado, a ativação de células positivas para o peptídeo relacionado a agouti foi identificado somente em animais repetidamente expostos ao estresse de restrição (CHAGRA et al., 2011). Além disso, foi identificado que o ERR foi capaz de aumentar a quantidade de neurônios positivos para o hormônio concentrador de melanina no HL (do inglês, MCH) (KIM; HAN, 2016).

Outro fato importante é que a ativação neuronal no HL induzida pelo estresse de ambiente novo foi reduzida em animais previamente expostos a um protocolo de estresse crônico variável (ECV) (OSTRANDER et al., 2009). O ECV também diminuiu o limiar para autoestimulação do HL, o que sugere um aumento da eficácia de recompensa da autoestimulação (LIN et al., 2002); além de alterar a expressão gênica de neuropeptídeos como substância P (aumento), orexina (aumento) e galanina (diminuição) no HL (ITO et al., 2009; SERGEYEV et al., 2005). O fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, BDNF), no qual é responsável pela sobrevivência e plasticidade de neurônios, também foi aumentado no HL de animais expostos ao estresse de imobilização repetido (SMITH et al., 1995). Esses dados fornecem evidências de que a exposição crônica prévia a eventos aversivos pode alterar o perfil de controle das respostas ao estresse pelo HL, além de sugerir um envolvimento dessa região hipotalâmica nas disfunções causadas pela exposição a estressores crônicos.

Os dados apresentados acima indicam um envolvimento do HL nas respostas cardiovasculares ao estresse. Entretanto, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos nesse controle ainda são pouco compreendidos. Como reportado acima, foi evidenciado

uma participação das neurotransmissões glutamatérgica e GABAérgica no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo HL (DEOLINDO et al., 2013b; GOMES-DE-SOUZA et al., 2019), porém a participação de outros neurotransmissores e neuromoduladores nunca foi reportada. Além disso, apesar das evidências de alterações funcionais e neuroquímicas no HL após a exposição a protocolos de estresse crônico, a influência da experiência prévia a estressores crônicos no controle das respostas cardiovasculares e do comportamento do tipo ansioso ao estresse pelo HL é pouco compreendida.

1.2. Neurotransmissão “CRFérgica” e as respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo ansiogênica ao estresse

O fator liberador de corticotrofina (CRF) foi inicialmente identificado no hipotálamo e caracterizado como regulador da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior (VALE et al., 1981). Posteriormente, foi reportada a presença do CRF e de receptores de CRF em outras regiões encefálicas (F. PHELIX; LIPOSITS; WILLIS, 1994; REUL; HOLSBOER, 2002; SWANSON et al., 1983). Portanto, o CRF, atuando como neurotransmissor no SNC, vem sendo demonstrado estar envolvido no controle de respostas independentes do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), incluindo o controle de respostas cardiovasculares e comportamentais a estressores sistêmicos e psicológicos (DEUSSING; CHEN, 2018; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016; JOËLS; BARAM, 2009; STENGEL; TACHÉ, 2010; WOOD, 2014).

O sistema “CRFérgico” inclui o CRF e outros três peptídeos denominados urocortina 1, urocortina 2 e urocortina 3 (BALE; VALE, 2004; DEDIC; CHEN; DEUSSING, 2018; HAUGER et al., 2003). Os efeitos do CRF e dos demais peptídeos do sistema “CRFérgico” são mediados pela ativação de dois receptores, os receptores CRF₁ e CRF₂ (Bale & Vale, 2004; Hauger et al., 2003) e atuam principalmente através da via de sinalização Gs/adenilato ciclase/cAMP (DEUSSING; CHEN, A., 2018). Os ligantes endógenos apresentam

diferenças no perfil farmacológico de ligação aos receptores CRF₁ e CRF₂. O CRF possui uma afinidade maior ao receptor CRF₁, ao passo que a urocortina 2 e a urocortina 3 ligam-se seletivamente ao receptor CRF₂ (DEUSSING; CHEN, 2018; HAUGER et al., 2003; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016). A urocortina 1 possui afinidade semelhante para ambos os receptores (DEUSSING; CHEN, 2018; HAUGER et al., 2003; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016). As ações dos ligantes são também moduladas pela ligação à *proteína de ligação do CRF*, na qual limita a disponibilidade dos peptídeos “CRFérgicos” e pode servir como um reservatório (BEHAN et al., 1995). Essa proteína pode também ter outras ações intracelulares e extracelulares, porém esses efeitos ainda são pouco compreendidos (DEUSSING; CHEN, 2018; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016; SEASHOLTZ; VALVERDE; DENVER, 2002).

Como mencionado acima, estudos prévios reportaram um envolvimento da neurotransmissão CRFérgica nas respostas cardiovasculares ao estresse (GAO; GAO, 2019). Por exemplo, foi reportado redução nas respostas cardiovasculares a diferentes estressores após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de antagonistas não-seletivos dos receptores CRF (MORIMOTO et al., 1993; NAKAMORI; MORIMOTO; MURAKAMI, 1993, 2017; NIJSEN et al., 2000). Foi também demonstrado que antagonistas não-seletivos dos receptores CRF reduziram as respostas comportamentais ao estresse, incluindo as respostas comportamentais do tipo ansiosas e depressivas (HEINRICHS et al., 1992; KOOB; HEINRICHS, 1999; MENZAGHI et al., 1994). Apesar desses resultados forneceram evidências do envolvimento de receptores CRF no SNC na geração das respostas ao estresse, o subtipo de receptor envolvido ainda não está totalmente elucidado. Nesse sentido, estudos indicaram a participação do receptor CRF₁ na ansiedade induzida pelo estresse (GRIEBEL et al., 2002; LIEBSCH et al., 1995). Além disso, foi reportado a participação do receptor CRF₂, mas não do CRF₁, na diminuição induzida pelo estresse de restrição da inibição promovida por um pré-pulso da resposta de sobressalto induzida por pulso (SUTHERLAND; CONTI, 2011). Além disso, os sítios específicos no SNC onde os peptídeos “CRFérgicos”

agem para controlar as respostas ao estresse vêm sendo alvo de estudos. Com relação às respostas cardiovasculares ao estresse, estudos prévios reportaram o envolvimento do núcleo dorsal motor do vago no bulbo e do NLET (NIJSEN et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2015, 2020; STIEDL, 2005), porém a ação em áreas hipotalâmicas foi menos explorada.

1.3. Hipotálamo lateral e as respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo ansiogênica ao estresse: neurotransmissão “CRFérgica”

Foi identificada a expressão dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL (CHALMERS; LOVENBERG; DE SOUZA, 1995; DE SOUZA et al., 1985; PETT et al., 2000; ROSINGER et al., 2017; WINSKY-SOMMERER, 2004). Terminais imunorreativos para o CRF oriundos do núcleo central da amígdala (CeA), do NLET e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) também foram reportados no HL (DEUSSING; CHEN, 2018; GIARDINO et al., 2018a; LI et al., 2020; MARCINKIEWCZ et al., 2016; POMRENZE et al., 2015; SWANSON et al., 1983). Estudos imunohistoquímicos também revelaram a presença de neurônios expressando CRF, urocortina 3 e urocortina 1 no HL (BITTENCOURT et al., 1999; HORJALES-ARAÚJO; HELLYSAZ; BROBERGER, 2014; SWANSON et al., 1983; WITTMANN et al., 2009), além de fibras imunorreativas para urocortina 1 e urocortina 3 (BITTENCOURT et al., 1999; LIN et al., 2002).

Uma participação da neurotransmissão “CRFérgica” do HL no controle da função cardiovascular foi inicialmente evidenciado pela demonstração de que a microinjeção de CRF no HL causou aumento dose-dependente da pressão arterial e frequência cardíaca (FC) em animais em repouso (DIAMANT et al., 1992). No entanto, o papel da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares e comportamentais desencadeadas por estímulos aversivos não foi explorado. A hipótese de um envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL no controle das respostas ao estresse é suportada por dados que indicaram uma redução na ativação de neurônios no HL induzida por choque nas patas ou estresse de restrição em animais *knockout* para os receptores CRF₁^(-/-) (WINSKY-

SOMMERER, 2004). Além disso, dados sugerem que o CRF no HL tenha um papel importante na insônia induzida por estresse (LI et al., 2020)

A restrição é um estressor não-condicionado e inescapável, que consiste na limitação dos movimentos do animal por meio da introdução do animal inteiro em um tubo cilíndrico (alternativamente, em alguns estudos o animal foi envolto em uma malha de arame) (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009). Esse estressor é amplamente utilizado para avaliação das respostas fisiológicas (e.g., neuroendócrinas e cardiovasculares) observadas durante situações aversivas em roedores (BALI; JAGGI, 2015; BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; JAGGI et al., 2011). O estresse de restrição também é comumente empregado para avaliação de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade induzidas pelo estresse (BALI; JAGGI, 2015; BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; KORTE; DE BOER, 2003). *Desse modo, considerando as evidências prévias de que o HL tenha uma influência inibitória nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (Deolindo et al., 2013; Gomes-de-Souza et al, 2019), juntamente com resultados fornecendo evidências de que a ativação de neurônios no HL causa efeitos ansiolíticos (Hakwoort et al, 2008), uma das hipóteses testadas no presente estudo foi a de que a neurotransmissão CRFérgica no HL, atuando via o receptor CRF₁ e CRF₂, tenha uma influência inibitória nas respostas cardiovasculares e comportamentais relacionadas à ansiedade induzidas pelo estresse de restrição agudo.*

A exposição a protocolos de estresse crônico afeta a expressão dos receptores “CRFérgicos”, além de alterar a quantidade de CRF e urocortinas em regiões encefálicas envolvidas no controle das respostas ao estresse (ANISMAN et al., 2007; GIARDINO; PUGLISI-ALLEGRA; CECCATELLI, 1996; HARRIS et al., 2006; KIM et al., 2006; LAN et al., 2015; LENGLOS et al., 2013; MAKINO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2020; SANTIBAÑEZ; GYSLING; FORRAY, 2006; SUTHERLAND et al., 2010a; WANG et al., 2010; WISŁOWSKA-STANEK et al., 2016). Alterações epigenéticas nos genes *crf* e *crhr1* também foram reportadas em animais expostos a estressores crônicos (STERRENBURG et

al., 2011; WAN et al., 2014). Além disso, uma diminuição no limiar para os efeitos comportamentais decorrentes da administração central de CRF foi reportada após a exposição repetida ao estresse de restrição (HARRIS, 2017). Como mencionado acima, alterações morfológicas e neuroquímicas foram identificadas no HL após a exposição repetida a eventos estressores crônicos (CHAGRA et al., 2011; ITO et al., 2009; LIN et al., 2002; OSTRANDER et al., 2009; SERGEYEV et al., 2005; SMITH et al., 1995). Apesar dessas evidências, em uma ampla busca na literatura nós não encontramos estudos que tenham investigado o efeito de estressores crônicos sobre a neurotransmissão “CRFérgica” no HL. *Desse modo, uma segunda hipótese testada no presente estudo foi a de que a exposição repetida ao estresse de restrição cause alterações na neurotransmissão “CRFérgica” no HL, e essas alterações alteraram o controle das respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo ansiogênica ao estresse de restrição por esse mecanismo neuroquímico no HL.*

Ainda com relação à estressores crônicos, o estresse crônico variável (ECV) é um modelo experimental de estresse crônico amplamente utilizado na literatura (CRESTANI, 2016a; GOLBIDI; FRISBEE; LAHER, 2015; GRIPPO, 2009; HERMAN, 2013; WILLNER, 2005), que consiste na exposição repetida de roedores a diferentes estressores inescapáveis e imprevisíveis. O ECV foi inicialmente descrito como um modelo experimental para avaliação de comportamentos relacionados à depressão em roedores (WILLNER, 2005), porém vem sendo consistentemente demonstrado que as respostas comportamentais induzidas pelo ECV são acompanhadas de importantes alterações na atividade autônoma e na função cardiovascular, incluindo aumento da pressão arterial e frequência cardíaca basal, elevação no tônus simpático cardíaco e vascular, comprometimento na atividade barorreflexa, redução no limiar para arritmias cardíacas e disfunções cardíacas e vasculares (CRESTANI, 2016a; GOLBIDI; FRISBEE; LAHER, 2015; GRIPPO, 2009). Esses efeitos cardiovasculares são consistentes com as alterações autônomas e cardiovasculares observadas na depressão em humanos (GRIPPO, 2009). Além

disso, devido à alternância dos estímulos estressores, as respostas fisiológicas apresentam um reduzido processo de habituação durante a exposição ao ECV, de modo que o ECV tem sido descrito como uma alternativa a modelos de estresse crônico homotípicos (i.e., exposição repetida ao mesmo estressor) para avaliação de disfunções induzidas pelo estresse crônico, uma vez que estressores homotípicos apresentam um acentuado processo de habituação (HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016b). Assim, o ECV vem sendo amplamente utilizado para investigar a interação entre respostas comportamentais do tipo depressivas e complicações cardiovasculares (ALMEIDA et al., 2015; BROOKS et al., 2018; GRIPPO et al., 2006; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2008a; VIEIRA et al., 2018). *Desse modo, uma última hipótese testada no presente estudo foi a de que a neurotransmissão “CRFérgica” no HL esteja envolvida nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV.*

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse em ratos.

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- 1) Investigar o envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo ansiogênica induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos.
- 2) Avaliar o efeito da exposição repetida prévia ao estresse de restrição no controle das respostas cardiovasculares e comportamentais do tipo ansiogênica a esse estressor pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL em ratos.
- 3) Investigar o envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas alterações nos parâmetros cardiovasculares basais, na variabilidade cardíaca e na atividade do barorreflexo induzidas pela exposição a um protocolo de ECV em ratos.
- 4) Avaliar o efeito da exposição ao ERR ou ao ECV sobre os níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL de ratos.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal variando entre 240-260g (60 dias de idade). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP) e foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com acesso livre a alimento e água. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP (protocolo número 23/2018).

3.2. Implante de cânulas guias direcionadas ao hipotálamo lateral

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (5% para indução e 1,6% para manutenção) usando um sistema de anestesia de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Após a tricotomia, a cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA), e em seguida foi realizada a assepsia do campo cirúrgico com álcool 70% e solução de iodo. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Foram realizadas as medidas para o posicionamento bilateral de cânulas direcionadas ao HL. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997), e foram como segue:

Anteroposterior: +6,2 mm em relação à interaural

Lateral: +1,8 mm a partir da linha média

Vertical: -7,6 mm em relação ao osso parietal

Após os cálculos e posicionamento das cânulas de aço inoxidável no local desejado, foram feitos orifícios no crânio com auxílio de uma broca odontológica, por onde as cânulas foram introduzidas bilateralmente direcionadas ao HL. As cânulas foram constituídas por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23G) com 13 mm de comprimento, e foram fixadas ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ). Pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana para fixação da resina. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido nas cânulas para evitar sua obstrução durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam pentabiótico veterinário (560 mg/ml/kg, Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) pela via intramuscular e o anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (0,5 mg/ml/kg, Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

3.3. Canulação da artéria e veia femoral

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano (como descrito na *sessão 3.2.*), e foi implantado um cateter na aorta descendente através da artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares e outro cateter na veia femoral para infusão de drogas vasoativas nos experimentos para avaliação da atividade barorreflexa. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (20 U/ml de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação dos cateteres, eles foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam o anti-inflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (0,5 mg/ml/kg, Banamine®, Schering Plough, Brazil) por via subcutânea para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

3.4. Registro da pressão arterial 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 (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 um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments, Australia). Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.5. Registro da temperatura cutânea da cauda

O registro da temperatura cutânea da cauda foi realizado utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica (IRISYS 4000), e a temperatura foi representada como variações na intensidade de cor (BUSNARDO et al., 2013; VIANNA; CARRIVE, 2005). Para a análise das imagens, a medida da temperatura foi realizada em cinco pontos ao longo de toda a extensão da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (BUSNARDO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

3.6. Análise comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliação dos efeitos do estresse de restrição sobre comportamentos relacionados à ansiedade. O aparato utilizado para o teste consistiu em dois braços abertos e dois braços fechados, de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada um, unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Os braços fechados possuíam paredes de madeira de 40 cm de altura que os circundam, e os braços abertos uma borda lateral de acrílico de 1 cm para evitar a queda dos animais. No intervalo entre os testes de cada animal, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool 20%. O comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo por um período de 5 minutos

e foram analisados utilizando o programa Anymaze (Stoelting, EUA). Foi registrado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. No teste de LCE os roedores evitam os braços abertos, e fármacos ansiolíticos aumentam a exploração dos braços abertos, sem interferir com o número de entradas nos braços fechados de modo que uma diminuição na exploração dos braços abertos é interpretada como uma resposta comportamental do tipo ansiogênica (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; PELLOW et al., 1985)

3.7. Drogas e soluções

O CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) (Tocris, EUA), a antisauvagine-30 (ASV-30; antagonista seletivo dos receptores CRF₂) (Tocris, EUA), a fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoreceptores α_1) (Sigma- Aldrich, EUA), o nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) (Sigma-Aldrich, EUA) e a uretana (SigmaAldrich, 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.

3.8. Microinjeção de drogas no sistema nervoso central

As agulhas injetoras (33G, Small Parts, EUA) utilizadas para a microinjeção das drogas no HL foram 1 mm mais longas do que as cânulas guias fixadas ao crânio. A administração das drogas foi realizada utilizando uma seringa de 2 μ l (7002KH, Hamilton, EUA) conectadas a agulha de injeção através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100nL (CRESTANI et al., 2009a; DEOLINDO et al., 2013b; GOMES-DE-SOUZA et al., 2019; REIS-SILVA et al., 2021).

3.9. Estresse

3.9.1 Estresse de restrição

O estresse de restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de 1/2 polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo). No presente estudo realizamos, em grupos independentes de animais, uma sessão aguda ou a exposição repetida ao estresse de restrição.

3.9.1.1 Estresse de restrição agudo

No protocolo de estresse agudo os animais foram mantidos por um período de 60 minutos no tubo de restrição (CRESTANI et al., 2009b, 2010a; DEOLINDO et al., 2013b; GOMES-DE-SOUZA et al., 2019). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação (BENINI et al., 2019, 2020).

3.9.1.2. Estresse de restrição repetido

Para o estresse de restrição repetido (ERR), os animais foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição, como descrito na seção 3.9.1.1, por 10 dias consecutivos (COSTA-FERREIRA et al., 2016; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; VIEIRA et al., 2018). As sessões de estresse foram iniciadas sempre às 9:00 horas e realizadas na sala em que foram realizados os testes.

3.9.2. Estresse crônico variável (ECV)

O protocolo de ECV consistiu na exposição diária dos animais a diferentes estressores, alternando-os durante 10 dias consecutivos (DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; VIEIRA et al., 2018). A Tabela 1 apresenta o protocolo completo do ECV. Animais controle foram mantidos em repouso, exceto no período de limpeza das caixas, no Biotério do Laboratório de Farmacologia da FCFAr/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos ao protocolo de estresse.

Tabela 1 - Protocolo de estresse crônico variado (ECV)

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

3.10. Avaliação da atividade autônoma através da análise espectral

A análise espectral de potência do intervalo de pulso (IP) foi realizada para analisar a atividade autônoma controlando o coração. Para isso, séries temporais de IP batimento-a-batimento foram extraídas do sinal de pressão arterial pulsátil. A variabilidade geral destas séries foi calculada no domínio da frequência usando o software *Cardioseries* v2.4 (disponível em <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/>). A potência dos componentes oscilatórios obtidos do IP foi quantificada em duas bandas de frequência: baixa frequência (LF, 0,20–0,75 Hz) e alta frequência (HF, 0,75–3,0 Hz). Para minimizar os efeitos do total de mudanças de potência na variabilidade de cada banda de frequência, os resultados de LF e HF de IP foram expressos em unidades normalizadas (n.u) (MALIK et al., 1996). Os valores normalizados foram obtidos calculando a potência relativa das bandas LF e HF em proporção ao espectro total da potência menos a potência da banda de frequência muito baixa (<0,20 Hz) (MALIK et al., 1996).

As oscilações do IP na faixa LF representam os efeitos modulatórios da atividade simpática controlando o coração; enquanto as oscilações de IP na faixa de HF estão associadas com a modulação parassimpática do coração (MALIK et al., 1996; RAMAEKERS et al., 2002). A razão entre as potências das bandas LF e HF (LF/HF) de IP foram calculadas para determinação do balanço simpatovagal cardíaco (ALMEIDA et al., 2015; COSTA-FERREIRA et al., 2016).

3.11. Avaliação da atividade barorreflexa

3.11.1. Método farmacológico

A atividade do barorreflexo foi avaliada através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoceptores α_1) (50 μ g/mL a 0,34 mL/min/kg) e de nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) (70 μ g/mL a 0,8mL/min/kg), utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI et al., 2010b). A fenilefrina e o NPS causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente. A análise foi feita relacionando a variação da PAM (10, 20, 30 e 40mmHg) com a resposta reflexa correspondente da FC. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PAM e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS foram traçadas curvas sigmóides como descritas na literatura (CRESTANI et al., 2010b; REIS-SILVA et al., 2021). A avaliação da curva sigmoide foi feita com base em cinco parâmetros: 1- platô mínimo de frequência cardíaca (P1, bpm); 2-platô máximo de frequência cardíaca (P2, bpm); 3- variação da frequência cardíaca (ΔP , bpm, diferença entre P1 e P2); 4-pressão arterial média (PA50, mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e 5- Ganho (G, bpm/mmHg, inclinação da porção linear da curva) (CRESTANI et al., 2010b; REIS-SILVA et al., 2021). Um gráfico representativo da curva sigmoide e seus parâmetros é apresentado na Figura 1.

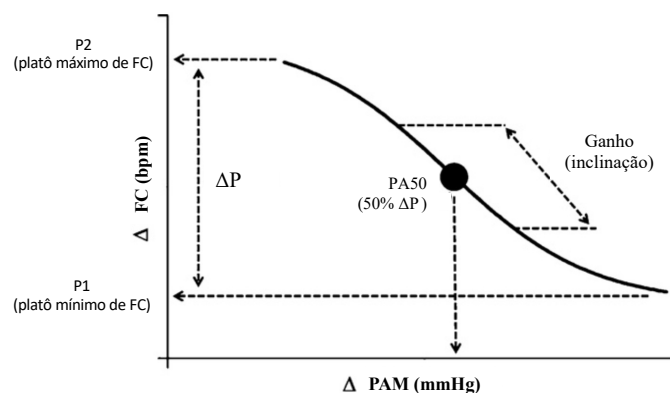


Figura 1: Representação esquemática ilustrando os parâmetros analisados nas curvas sigmóides. FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média. Imagem adaptada de CRESTANI et al, 2010b.

3.11.2. Método de análise de sequência

Além da abordagem farmacológica, a função barorreflexa também foi avaliada utilizando a técnica de análise de sequência. Essa técnica avalia a função barorreflexa através de flutuações espontâneas da pressão arterial, sem qualquer manipulação farmacológica. Para isso, os valores batimento-a-batimento da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) foram analisados usando o software *Cardioseries v2.4* (COSTA-FERREIRA; GOMES-DE-SOUZA; CRESTANI, 2021; REIS-SILVA et al., 2021) para identificação de sequências em que o aumento da pressão arterial sistólica (PAS) estava associado ao alongamento do IP (sequência *UP*) ou a diminuição da PAS estava associada ao encurtamento do IP (sequência *DOWN*). A sequência barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre a alteração da PAS e do IP foi maior que 0,8. A sensibilidade do barorreflexo espontâneo foi avaliada com base na inclinação (ms/mmHg) da regressão linear entre a PAS e o IP. Também foi avaliado o índice de eficácia do barorreflexo (BEI), que indica a porcentagem de alterações da PAS que efetivamente evoca alterações reflexas do IP (RIENZO et al., 2001).

3.12. Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas no encéfalo

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.), e 100 nL do corante azul de Evan (1%) foi microinjetado para determinação do sítio de injeção no encéfalo. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40 μ m de espessura para análise dos sítios de injeção. O posicionamento das agulhas de microinjeção foi determinado em um microscópio de luz de acordo com o atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (1997).

3.13. Medidas dos níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL

Os animais foram anestesiados com isoflurano e posteriormente decapitados em guilhotina, e tiveram seus encéfalos rapidamente removidos, congelados em isopentano

sobre gelo seco (-20°C) e armazenados em freezer -80°C até a dissecação da HL. Amostras de cerca de 1 mm de espessura foram obtidas a partir de secção coronal da região do HL obtida em um criostato (-20° C) (CM1900, Leica, Alemanha) utilizando-se uma agulha de ponta chata de 14G. As amostras foram obtidas a partir das coordenadas de -1,8mm a - 2,8 mm em relação ao bregma (Paxinos & Watson, 1997). Após a dissecação, as amostras foram congeladas e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise por Western Blotting.

O *Western Blotting* foi realizado de acordo com técnica padronizada em nosso laboratório (MARIN et al., 2009). Brevemente, as amostras do HL foram homogeneizadas por meio de ondas de ultrassom em solução de SDS 1%, e tiveram o conteúdo de proteínas determinado para posterior ajuste da quantidade utilizada na análise (o conteúdo de proteína foi ajustado em 40µg). Em seguida, as amostras foram desnaturadas e submetidas à eletroforese em gel de SDS poliacrilamida 9%. Ao final da separação, as proteínas no gel foram transferidas para uma membrana PVDF-FL. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por meio de solução TBS-T com 5% de leite em pó desnatado para evitar ligações inespecíficas com os anticorpos. Após a fase de bloqueio, as membranas foram incubadas por 18 horas (“overnight”) a 4°C com os anticorpos primários contra os receptores CRF₁ (1:500, Antibody, Rabbit Anti-Corticotropin Releasing Factor Receptor 1®; Millipore) ou CRF₂ (1:1000, Polyclonal Antibody, Rabbit Anti Corticotropin Releasing Factor Receptor 2®; Millipore). Após três lavagens em tampão TBS-T por cinco minutos, as membranas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a fluoróforo (1:1000, Goat-Rabbit IgG-Cy5; 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 o escâner Syngene G:Box Chemi XRQ imager (Syngene, Frederick, MD, USA) e quantificados no software Syngene GeneTools (Syngene, Frederick, MD, EUA). A quantidade de receptores CRF₁ e CRF₂ foi expressa em % em relação ao grupo controle. O controle da quantidade de amostra

nas membranas foi realizado pela coloração das membranas de PVDF com azul de *Coomassie*, seguida da quantificação de proteína total em toda a faixa (OLIVEIRA et al., 2021).

3.14. Análise estatística

Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). No *protocolo 4.1 (ver descrição abaixo)* foi utilizado a análise de variância (ANOVA) monofatorial para a análise dos valores cardiovasculares basais; ao passo que a ANOVA bifatorial, com tratamento como medida principal e tempo como medida repetida, foi usada para comparar as curvas temporais de variações dos parâmetros analisados. No *protocolo 4.2 (ver descrição abaixo)* o efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando a ANOVA bifatorial, com tratamento e estresse (agudo x repetido) como fatores independentes; ao passo que a ANOVA trifatorial, com tratamento e estresse (agudo x repetido) como medidas principais e tempo como medida repetida, foi usada para comparar as curvas temporais de variações da pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda durante o estresse de restrição. No *protocolo 4.3 (ver descrição abaixo)* foi utilizado a ANOVA bifatorial para a análise dos parâmetros de análise comportamental, com tratamento e estresse (agudo x repetido) como fatores independentes. No *protocolo 4.4 (ver descrição abaixo)* o efeito dos tratamentos farmacológicos sobre os valores basais de PAM e FC, os parâmetros de variabilidade cardíaca, os parâmetros derivados das curvas sigmóides e os parâmetros do barorreflexo espontâneo foram comparados utilizando a ANOVA bifatorial, com tratamento e estresse (controle x ECV) como fatores independentes. No *protocolo 4.5 (ver descrição abaixo)* foi utilizado a ANOVA bifatorial para a análise dos dados de peso corporal, com estresse (controle x ERR x ECV) como medida principal e tempo como medida repetida; para os dados de quantificação dos níveis proteicos dos receptores CRF₁ ou CRF₂ foram analisados utilizando a ANOVA monofatorial. Quando a análise ANOVA indicou efeito nos fatores, o

pós-teste de *Bonferroni* foi usado para identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. Os resultados dos testes estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1. Efeito do tratamento do HL com diferentes doses do antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) nas respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos

Experimentos preliminares indicaram que algumas doses dos antagonistas de receptores “CRFérgicos” causavam alterações nos valores basais de FC (valor pré-estresse) quando administrados no HL. Desse modo, este protocolo teve o objetivo de identificar a dose de CP376395 (antagonista do receptor CRF₁) que provocaria efeitos nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição independentes de alterações nos parâmetros cardiovasculares basais. Para isso, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas guias bilaterais direcionada ao HL, e foram mantidos em recuperação por no mínimo 3 dias. O experimento foi realizado 24 h após o implante de um cateter na artéria femoral para registro cardiovascular. Após o implante dos cateteres, os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação até o início do experimento, para habituação às condições da sala. Durante o experimento, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no HL de 100L de veículo (NaCl 0,9%) ou CP376395 nas doses de 1nmol, 0,1nmol ou 0,01nmol. Dez minutos após o tratamento do HL, os animais foram expostos a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição. O registro da pressão arterial e FC foi iniciado pelo menos 30 minutos antes do início da sessão de estresse de restrição, e foi realizado durante todo o período de estresse e por 60 minutos após o término da sessão de estresse (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10 e 0 min antes da restrição; nos tempos 10, 20, 40 e 60 minutos durante a restrição; e 5, 10, 20, 40 e 60 minutos após o término da sessão de estresse (BUSNARDO et al., 2013). Os valores basais de pressão arterial e FC pré-estresse foram determinados no período de 10 min antes do início da sessão de estresse de restrição (isto é, período de 5-15 minutos após o tratamento do HL).

Uma representação esquemática de todo o protocolo experimental está representada na Figura 2.

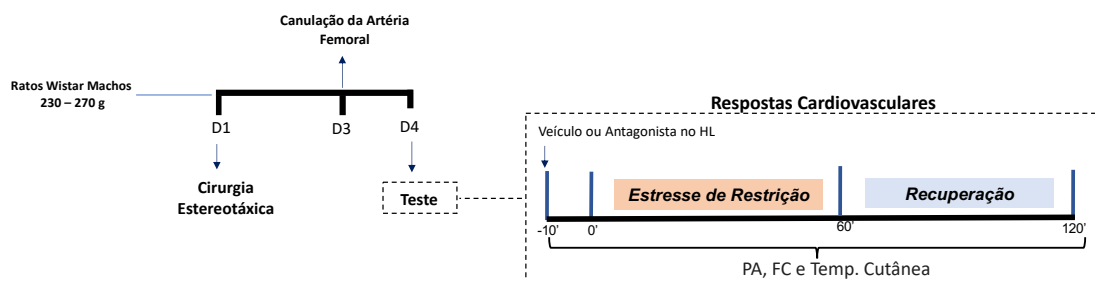


Figura 2: Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ no HL no controle cardiovascular pelo estresse agudo de restrição.

4.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” atuando através dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL no controle das respostas cardiovasculares desencadeadas por uma sessão aguda de estresse de restrição. Além disso, foi investigado se a exposição repetida prévia ao estresse de restrição altera o controle das respostas cardiovasculares a esse estressor pelos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL.

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas guias bilaterais direcionadas ao HL, e foram mantidos em recuperação por três dias. Em seguida, foi iniciado as sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição por 10 dias consecutivos nos grupos sujeitos à exposição repetida ao estresse de restrição [*estresse de restrição repetido (ERR)*]. Após o término da 9^o sessão de estresse, foi realizada a cirurgia para o implante de cateter na artéria femoral, que foi utilizado para registro da pressão arterial e FC. Após o término da cirurgia de canulação da artéria femoral, os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação até o momento da realização do experimento. Dez minutos antes do início da 10^o sessão de estresse, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no HL de 100 nL de CP376395 (0,01nmol ou

5nmol) (antagonista seletivo do receptor CRF_1), antisauvagine-30 (ASV-30; 0,01nmol ou 5nmol) (antagonista seletivo dos receptores CRF_2) ou veículo (NaCl 0,9%) (OLIVEIRA et al., 2015). O registro dos parâmetros cardiovasculares e da temperatura cutânea da cauda foram realizados como descritos no *protocolo 4.1*.

Os animais sujeitos à sessão aguda de estresse foram mantidos em repouso no biotério pelo mesmo período que os animais submetidos ao protocolo de ERR; e foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e registro cardiovascular juntamente com os animais dos grupos ERR. No dia do experimento, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no HL de 100 nL de CP376395 (0,01nmol ou 5nmol), ASV-30 (0,01nmol ou 5 nmol) ou veículo (NaCl 0,9%) 10 minutos antes da sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição. Durante o estresse de restrição agudo foi realizado o registro da pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda como descrito acima. Uma representação esquemática de todo o protocolo experimental está representada na Figura 3.

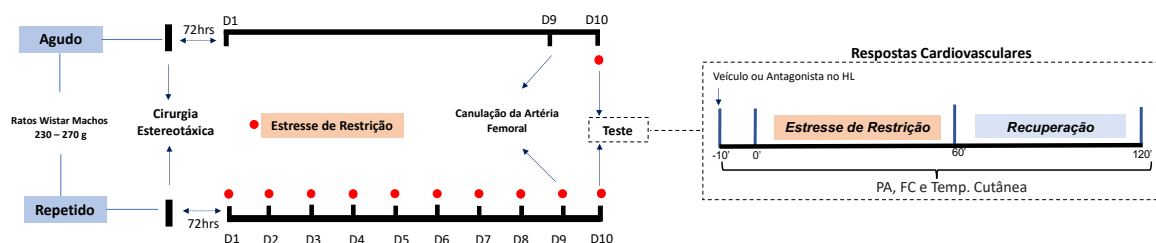


Figura 3: Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF_1 e CRF_2 no HL no controle cardiovascular por uma sessão aguda ou 10ª de estresse de restrição.

4.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL no comportamento do tipo ansioso após uma sessão aguda ou 10 sessões de estresse de restrição

Esse protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL no controle das respostas comportamentais relacionadas à ansiedade induzidas pelo estresse de restrição agudo. Além disso, foi investigado se a exposição repetida prévia ao estresse de restrição altera o controle dessa resposta comportamental pela

neurotransmissão “CRFérgica” no HL. Para tanto, grupos independentes de animais foram utilizados no estudo do efeito do estresse agudo e repetido a fim de evitar possíveis alterações comportamentais decorrentes da exposição repetida ao LCE. Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas guias bilaterais direcionadas ao HL, e foram mantidos em recuperação por três dias. Em seguida, foi iniciado as sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição por 10 dias dos grupos sujeitos ao ERR. Dez minutos antes da 10ª sessão de estresse, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no HL de 100 nL de CP376395 (0,01nmol), ASV-30 (0,01nmol) ou veículo (NaCl 0,9%). Imediatamente após o término da 10ª sessão de estresse (KORTE; DE BOER, 2003), os animais foram colocados individualmente no LCE por 5 minutos para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

Os animais sujeitos a sessão aguda de estresse foram mantidos em repouso no biotério pelo mesmo período que os animais submetidos ao protocolo de ERR; e foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e testes comportamentais juntamente com os animais dos grupos ERR. No dia do experimento, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais no HL de 100 nL de CP376395 (0,01nmol), ASV-30 (0,01nmol) ou veículo (NaCl 0,9%) 10 minutos antes da sessão aguda de estresse de restrição. Imediatamente após o término da sessão aguda de estresse (KORTE; DE BOER, 2003), os animais foram colocados individualmente no LCE por 5 minutos para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

A resposta ansiogênica causada pelo estresse de restrição agudo foi avaliado comparando o comportamento dos animais estressados com aquelas de animais naive (não-estressados) no LCE (BUSNARDO et al., 2013; GOUVEIA et al., 2016; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; VITORIO et al., 2023). Além disso, um grupo exposto a 9 sessões de estresse de restrição, mas não sujeito ao estresse de restrição no dia de avaliação comportamental no LCE, foi incluído como controle para os efeitos do ERR.

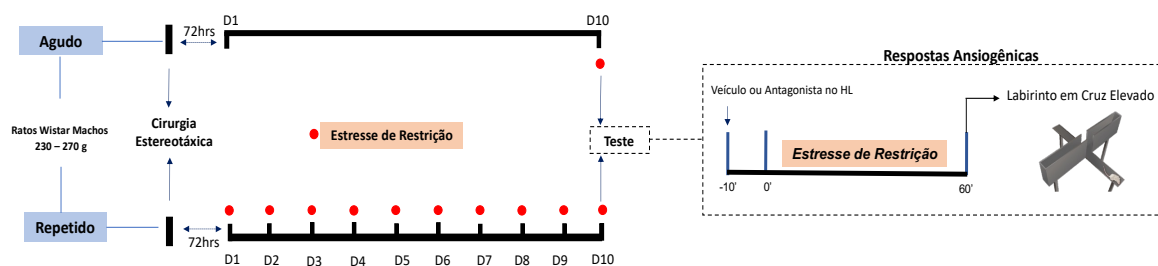


Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ e CRF₂ no HL no controle do comportamento relacionado a ansiedade evocado por uma sessão aguda ou 10^a de estresse de restrição.

4.4. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV. Para tanto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante de cânulas guias bilaterais direcionadas ao HL, e foram mantidos em recuperação por três dias. Depois desse período, os animais foram submetidos ao protocolo de 10 dias de ECV. No 10^o dia do protocolo de ECV, após a última sessão de estresse, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para o implante de cateteres na artéria e veia femoral. Animais controle permaneceram em repouso no biotério pelo mesmo período que os animais submetidos ao protocolo de ECV, e foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e testes cardiovasculares juntamente com os animais submetidos ao protocolo de ECV.

Após o procedimento cirúrgico de implante dos cateteres nos vasos femorais, todos os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação até o momento do experimento. Na manhã seguinte, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de PAM e FC. Em seguida, grupos independentes de animais controle ou submetidos ECV receberam microinjeção bilateral no HL de 100 nL de CP376395 (0,01 nmol), ASV-30 (0,01 nmol) ou veículo (NaCl 0,9%). Quinze minutos após o tratamento farmacológico do HL, foram realizadas infusões randomizadas de drogas

vasoativas (isto é, fenilefrina e NPS) para determinação da atividade barorreflexa (método farmacológico). O período de 10 minutos anteriores à infusão das drogas vasoativas foi utilizado para avaliação da variabilidade cardíaca e atividade barorreflexo espontânea (método de análise de sequência).

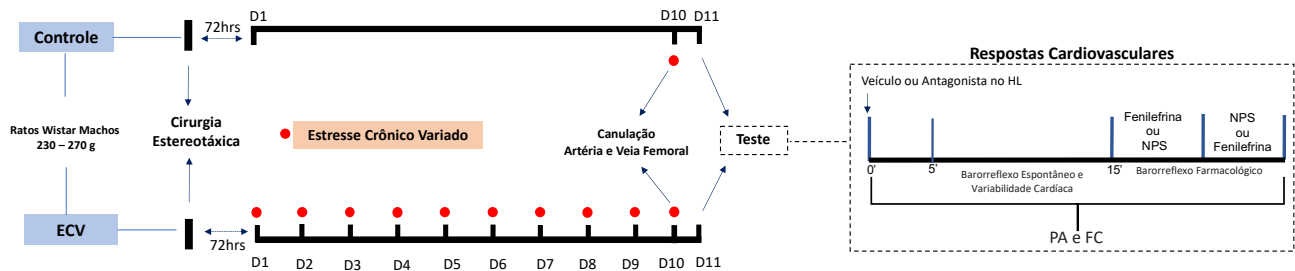


Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental completo para avaliação do papel dos receptores de CRF₁ e CRF₂ no HL nas alterações dos parâmetros cardiovasculares e barorreflexos evocado pelo ECV.

4.5. Estudo do efeito do ERR e ECV sobre os níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂

Este protocolo teve o objetivo de investigar se as alterações no controle das respostas cardiovasculares e de comportamentais relacionadas à ansiedade pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL após a exposição repetida ao estresse de restrição, bem como o envolvimento desse mecanismo neuroquímico do HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV, estão associadas às alterações na expressão dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL. Para tanto, grupos independentes de animais foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição por 10 dias consecutivos, ou ao protocolo de 10 dias de ECV. Vinte quatro horas após a última sessão de estresse, os animais sujeitos a exposição repetida ao estresse de restrição ou ao protocolo de ECV, bem como animais controle que foram mantidos no biotério sem serem perturbados pelo mesmo período que os animais estressados, foram eutanasiados, e os encéfalos foram removidos e estocados em freezer -80° C para processamento futuro. O HL de todos os animais foi coletado por

microdissecção para quantificação dos níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ (ver seção 3.13).

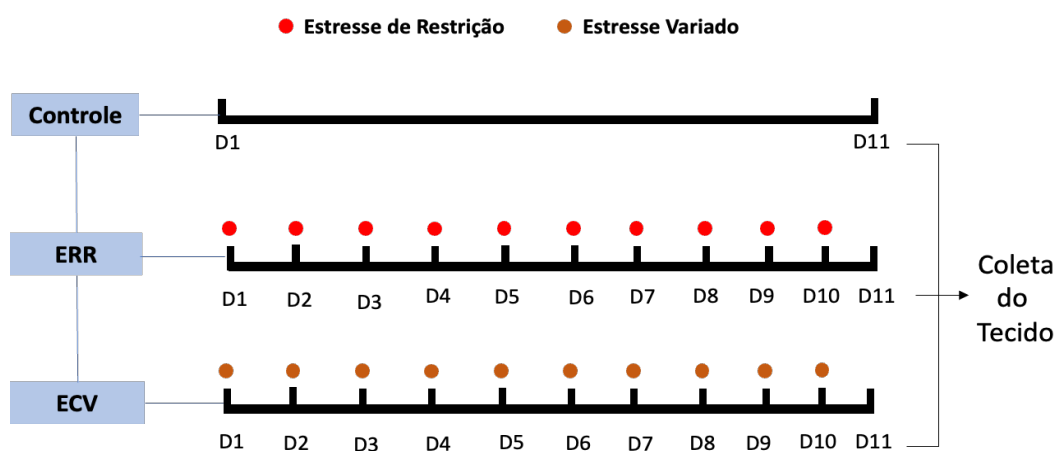


Figura 6: Linha do tempo ilustrando o protocolo experimental para avaliação dos níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL após a exposição a ERR ou ECV.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento do HL com diferentes doses do antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) nas respostas cardiovasculares induzida pelo estresse de restrição agudo em ratos

Nesse protocolo nós investigamos o efeito da microinjeção bilateral das doses de 1, 0,1 ou 0,01nmol de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) no HL nas respostas cardiovasculares a uma sessão aguda de estresse de restrição. Nós identificamos que a microinjeção bilateral de CP376395 nas doses de 1 e 0,1 nmol no HL aumentou os valores basais de FC, porém sem alterar a PAM e a temperatura cutânea da cauda. A dose de 0,01 nmol não alterou nenhum dos parâmetros cardiovasculares basais (Tabela 2).

A análise das curvas temporais indicou que o estresse de restrição causou aumento da PAM ($F_{(65, 1820)} = 14,89, P < 0,0001$) e FC ($F_{(65, 1820)} = 15,93, P < 0,0001$), e diminuiu os valores de temperatura cutânea da cauda ($F_{(11, 308)} = 43,22, P < 0,0001$) (Figura 7). A análise também indicou efeito do tratamento com CP376395 no parâmetro de FC ($F_{(3, 28)} = 2,953, P < 0,05$), porém sem alterar a resposta pressora ($F_{(3, 28)} = 0,4038, P > 0,05$) e de queda da temperatura cutânea da cauda ($F_{(3, 28)} = 0,674, P > 0,05$). Adicionalmente, foi evidenciado uma interação entre tempo x tratamento no parâmetro de FC ($F_{(195, 1820)} = 1,545, P < 0,05$). A análise pós-teste das curvas temporais de FC revelou que as doses de 1 ($P < 0,05$), 0,1 ($P < 0,05$) e 0,01 nmol ($P < 0,05$) de CP376395 reduziram a taquicardia causada pelo estresse de restrição (Figura 7).

Na figura 8 são apresentados registros experimentais representativos que mostram o efeito da microinjeção do veículo ou do CP376395 no HL sobre a pressão arterial e a FC antes, durante e após a sessão de estresse de restrição.

A Figura 9 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental.

Tabela 2 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do HL com CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁; 0,01, 0,1 e 1 nmol)

<i>GRUPO</i>	<i>n</i>	<i>PAM</i> (<i>mmHg</i>)	<i>FC</i> (<i>bpm</i>)	<i>Temperatura cutânea</i> <i>da cauda (°C)</i>
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	8	112,5±2,113	345,9±9,2	30,95±0,854
CP376395 0,01 nmol	7	115,5±2,755	373,2±9,53	32,15±0,6852
CP376395 0,1 nmol	8	110,8 ±3,675	411,8±14,78 *	30,46±0,6886
CP376395 1 nmol	9	113,7±2,461	414,8±17 *	30,14±0,6386
		F (3, 28) = 0,4741, P>0,05	F (3, 28) = 5,994, P<0,05	F (3, 28) = 1,412, P>0,05

*P<0,05 vs respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

Antagonista do Receptor CRF₁

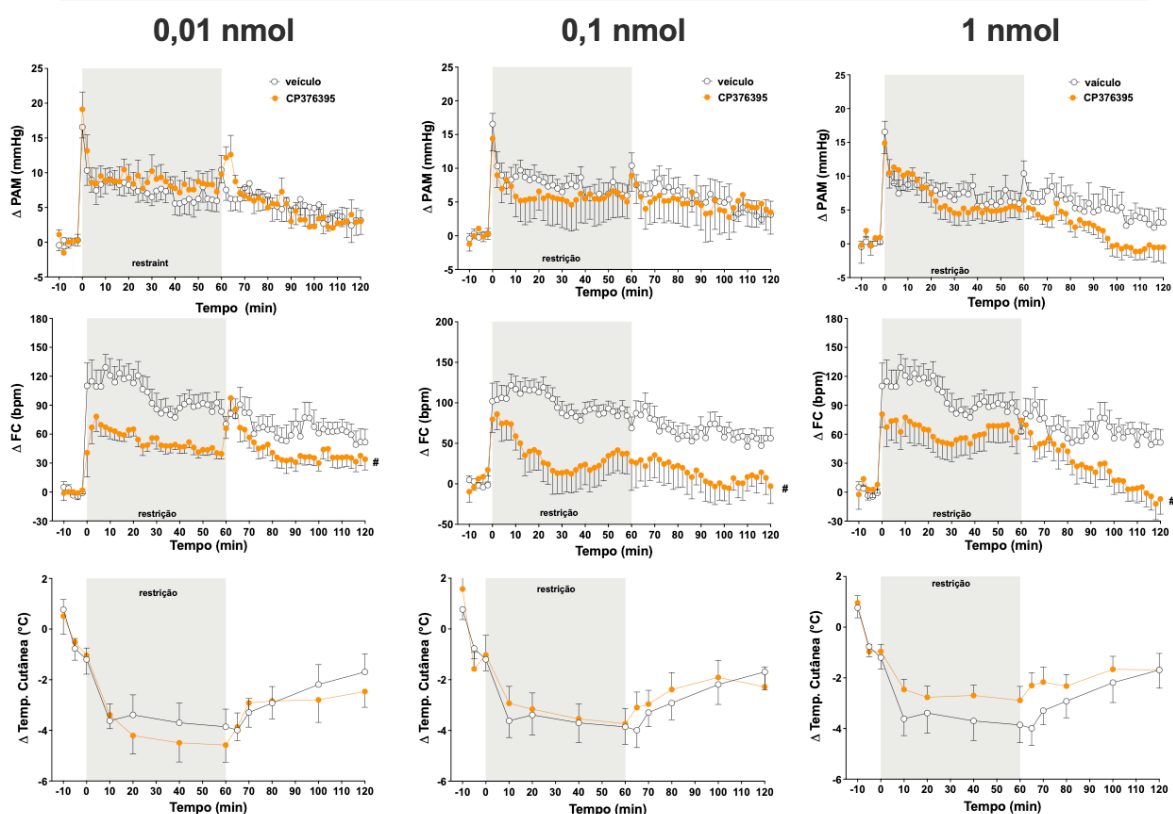


Figura 7 – Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura) induzidas por uma sessão aguda de estresse de restrição em animais tratados com CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) no HL nas doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol. Círculos representam a média \pm EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação com o grupo controle (veículo), ANOVA acompanhado pelo pós-teste.

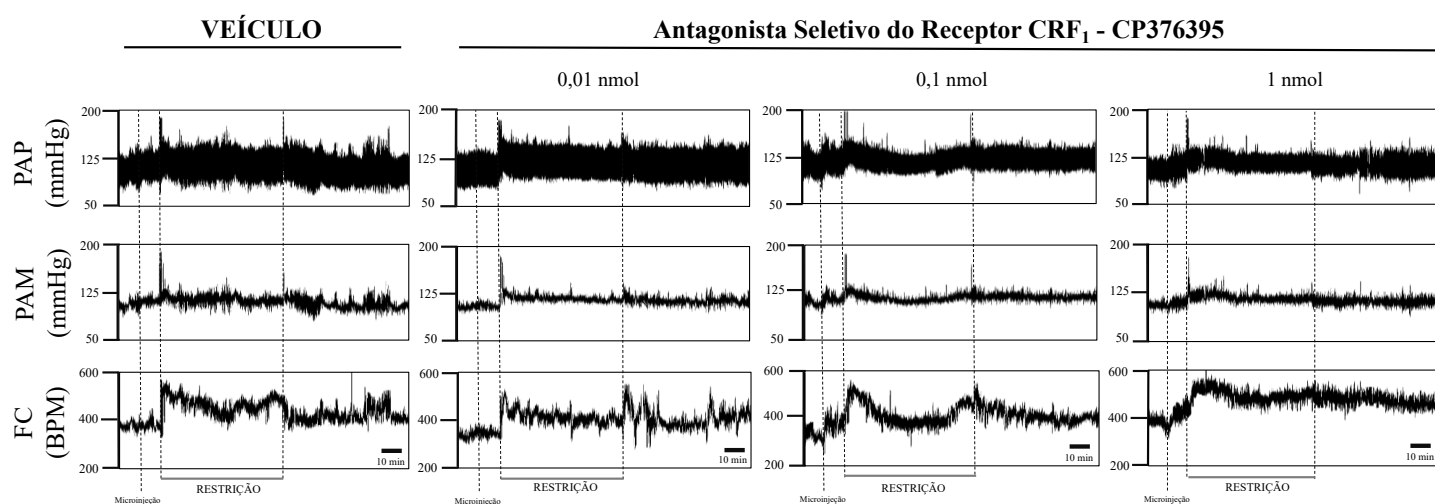


Figura 8 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos representativos antes, durante e após a sessão de estresse de restrição, ilustrando o efeito do tratamento local do LH com veículo (esquerda) ou o antagonista do receptor CRF₁ (CP376395, direita) nas doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol. A primeira linha pontilhada (microinjeção) indica o momento do tratamento com LH.

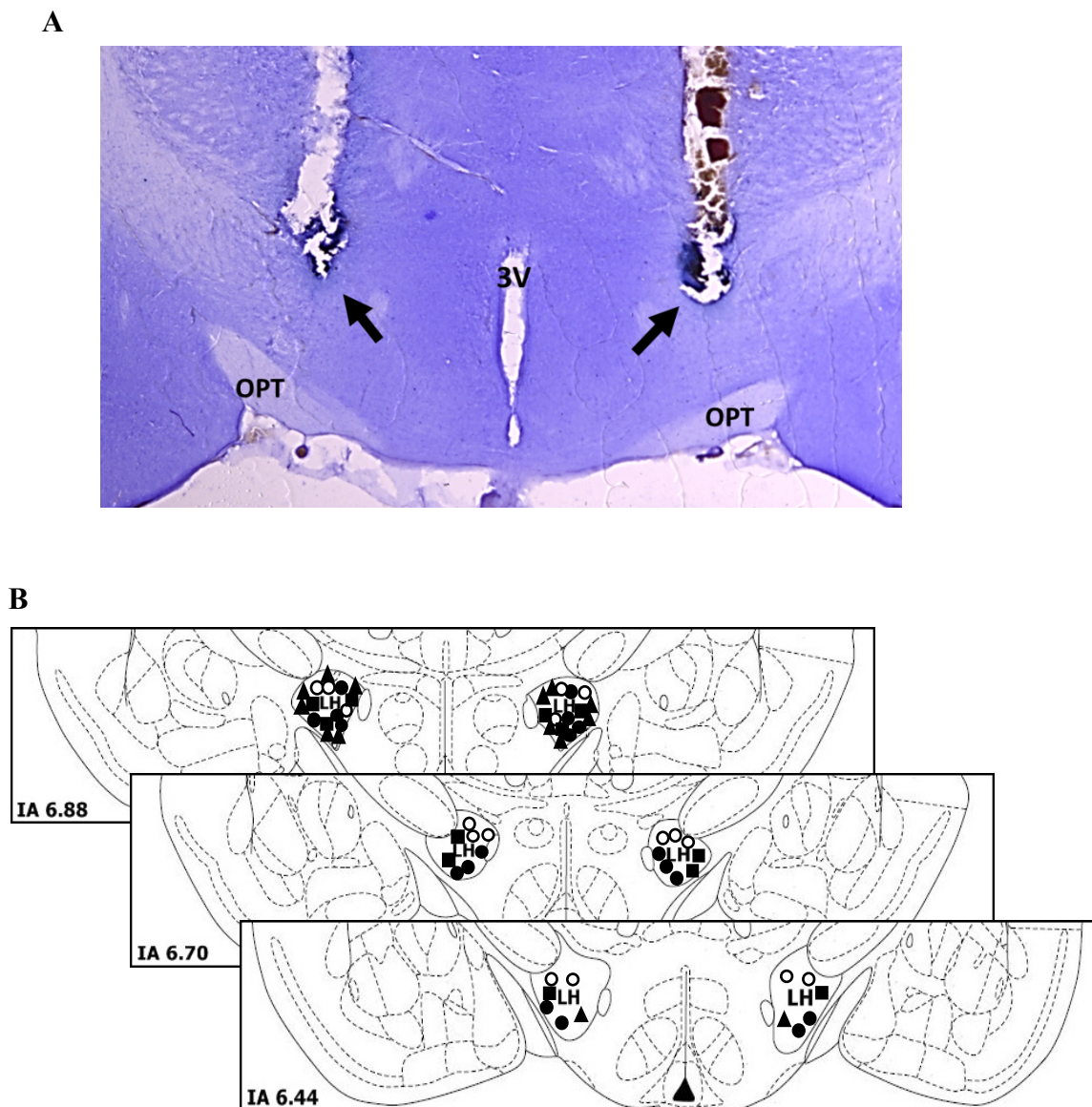


Figura 9 – **A.** Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro de um rato representativo mostrando sítios de microinjeção bilaterais no hipotálamo lateral (HL). **B.** Representação diagramática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral (HL) de salina (círculos brancos) e CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1) nas doses de 1 nmol (círculos pretos), 0,1 nmol (quadrados pretos) e 0,01nmol (triângulos pretos).

5.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

5.2.1. Estudo do envolvimento do receptor CRF₁ no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

Análise dos parâmetros cardiovasculares e de temperatura cutânea basais em animais tratados com 100nL de veículo ou CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRFérgico CRF₁) (0,01nmol ou 5nmol) e submetidos a uma sessão aguda ou repetida de estresse de restrição indicou efeito do estresse em todos os parâmetros analisados, ao passo que efeito do tratamento farmacológico foi indicado somente para a FC (Tabela 3). A análise *pós-teste* revelou que o tratamento do HL com CP376395 na dose de 5nmol aumentou os valores de FC nos animais submetidos ao ERR (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do HL com CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 0,01 ou 5nmol) ou veículo em animais sujeitos a uma sessão aguda (agudo) ou a exposição repetida (repetido) ao estresse de restrição.

<i>GRUPO</i>	<i>n</i>	<i>PAM (mmHg)</i>	<i>FC (bpm)</i>	<i>Temperatura cutânea da cauda (°C)</i>
Estresse de restrição agudo				
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	12	109±2	352±8	30,6±0,4
CP376395 - 0,01nmol	6	115±3	366±8	32,4±0,7
CP376395 - 5nmol	6	113±5	399±21	29,5±0,5
Estresse de restrição repetido				
VEÍCULO	7	117±4 [#]	375±13 [#]	29,9±0,8 [#]
CP376395 - 0,01nmol	7	120±4 [#]	393±15 [#]	29,8±0,4 [#]
CP376395 - 5nmol	7	118±2 [#]	449±21 ^{# *}	29,7±0,3 [#]
<i>Tratamento</i>		F _(2,39) = 1, P>0.05	F _(2,39) = 9, P<0.0006	F _(2,39) = 3,1, P>0.05
<i>Estresse</i>		F _(1,39) = 4, P<0.05	F _(1,39) = 7, P<0.01	F _(1,39) = 4,8, P<0.03
<i>Interação</i>		F _(2,39) = 0,05, P>0.05	F _(2,39) = 0,4, P>0.05	F _(2,39) = 2,8, P>0.05

P<0,05 indicando efeito do fator principal estresse; *P<0,05 vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni.

A análise das curvas temporais de PAM indicou efeito do tempo ($F_{(65,2535)} = 22,80$, $P < 0,0001$); mas sem efeito do tratamento ($F_{(2,39)} = 0,64$, $P > 0,05$) e do estresse ($F_{(1,39)} = 2,75$, $P > 0,05$) (Figura 10). A análise também não indicou interações entre tratamento x estresse ($F_{(2,39)} = 0,23$, $P > 0,05$), tempo x tratamento ($F_{(130,2535)} = 1,05$, $P > 0,05$), tempo x estresse ($F_{(65,2535)} = 1,06$, $P > 0,05$) e tempo x tratamento x estresse ($F_{(130,2535)} = 0,78$, $P > 0,05$) (Figura 10).

A análise das curvas temporais de FC indicou efeito do tempo ($F_{(65,2535)} = 32,90$, $P < 0,0001$), do tratamento ($F_{(2,39)} = 5,60$, $P < 0,007$) e do estresse ($F_{(1,39)} = 7,82$, $P < 0,007$); bem como interações entre tempo x tratamento ($F_{(130,2535)} = 2,70$, $P < 0,0001$) e tempo x estresse ($F_{(65,2535)} = 2,57$, $P < 0,0001$) (Figura 10). Entretanto, a análise não indicou interação entre tratamento x estresse ($F_{(2,39)} = 0,01$, $P > 0,05$) e tempo x tratamento x estresse ($F_{(130,2535)} = 0,60$, $P > 0,05$) (Figura 10). A análise *pós-teste* revelou que o tratamento do HL com CP376395 nas doses de 0,01nmol e 5nmol reduziu a resposta taquicárdica observada durante a sessão aguda ($P < 0,05$), porém somente a dose de 5nmol diminuiu a taquicardia durante a 10ª sessão de estresse de restrição ($P < 0,0001$) (Figura 10). Adicionalmente, a análise indicou diferença entre as respostas geradas na sessão aguda e na 10ª sessão de estresse nos animais tratados com CP376395 na dose de 5nmol ($P < 0,05$) (Figura 10).

A análise das curvas de temporais de temperatura cutânea da cauda indicou efeito do tempo ($F_{(11,429)} = 52,11$, $P < 0,0001$), do estresse ($F_{(1,39)} = 8,21$, $P < 0,006$), bem como interações entre tratamento x estresse ($F_{(2,39)} = 5,36$, $P < 0,008$), tempo x estresse ($F_{(11,429)} = 1,91$, $P < 0,03$), tempo x tratamento ($F_{(22,429)} = 1,88$, $P < 0,01$) e tempo x tratamento x estresse ($F_{(22,429)} = 2,44$, $P < 0,0003$) (Figura 10). Entretanto, a análise não indicou efeito do tratamento ($F_{(2,39)} = 0,15$, $P > 0,05$) (Figura 10). A análise *pós-teste* revelou que o tratamento do HL com CP376395 na dose de 5nmol aumentou a resposta de queda de temperatura cutânea da cauda durante a 10ª sessão de estresse de restrição ($P < 0,05$). A análise também indicou diferença entre as

respostas geradas na sessão aguda e na 10^o sessão de estresse nos animais tratados com veículo ($P < 0,05$) ou CP376395 na dose de 0,01nmol ($P < 0,05$) (Figura 10).

Na figura 10 são apresentados registos experimentais representativos que mostram o efeito da microinjeção do veículo ou do CP376395 no HL sobre a pressão arterial e a FC antes, durante e após a 1^o ou 10^o sessão de estresse de restrição.

A Figura 11 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental. A Figura 12 também mostra fotomicrografia do corte coronal de um animal representativo indicando os sítios de microinjeção bilateral no HL.

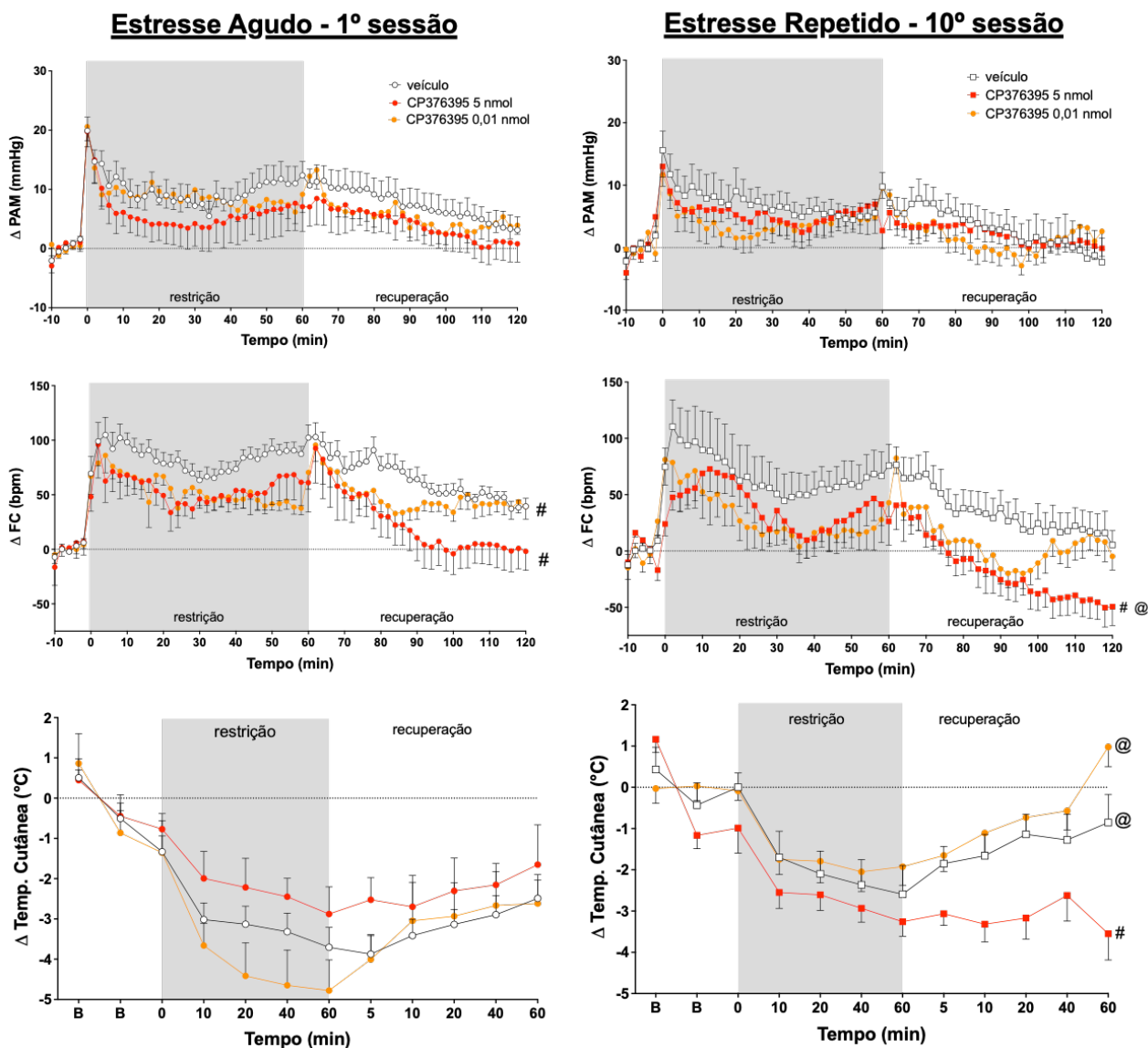
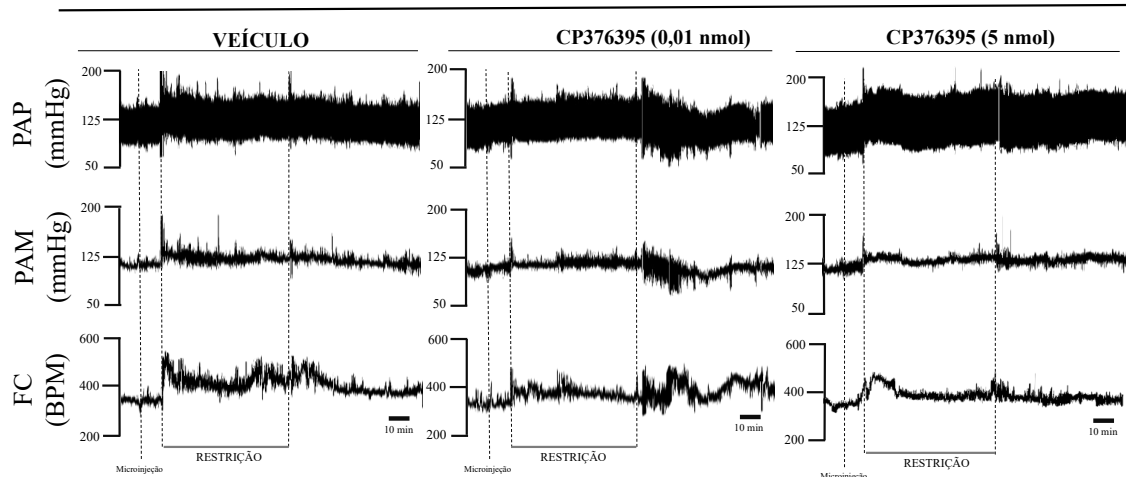


Figura 10 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temp. cutânea) induzidas durante uma sessão aguda (1º sessão) e pela 10º sessão de estresse de restrição em animais tratados com CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) nas doses de 0,01nmol ou 5nmol ou veículo no HL. Círculos representam a média \pm EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição e recuperação em comparação com o respectivo grupo controle (veículo) e @ P<0,05 ao longo de todo o período de restrição e recuperação em comparação com o respectivo grupo estresse agudo, ANOVA acompanhado pelo pós-teste de *Bonferroni*.

Estresse Agudo- 1º sessão



Estresse Repetido - 10º sessão

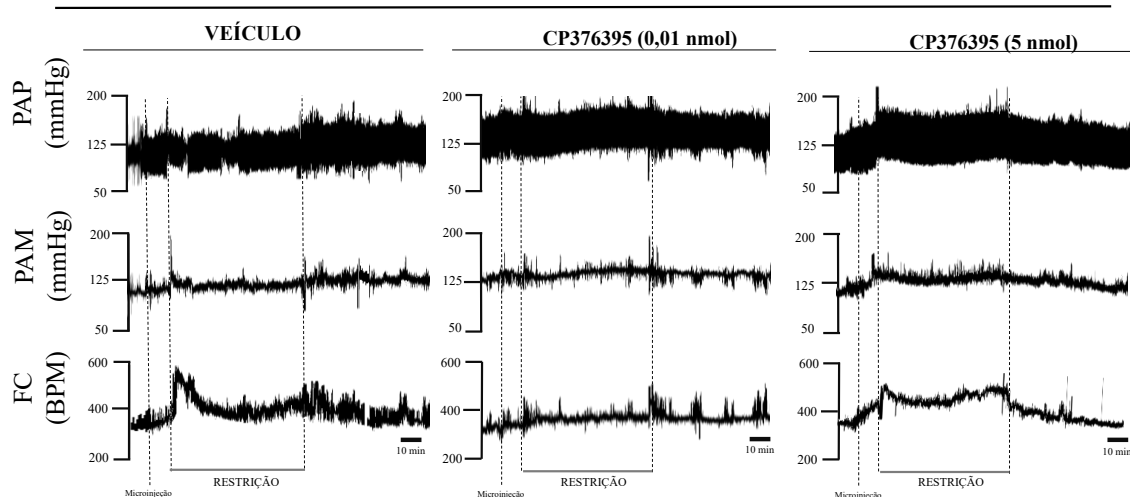
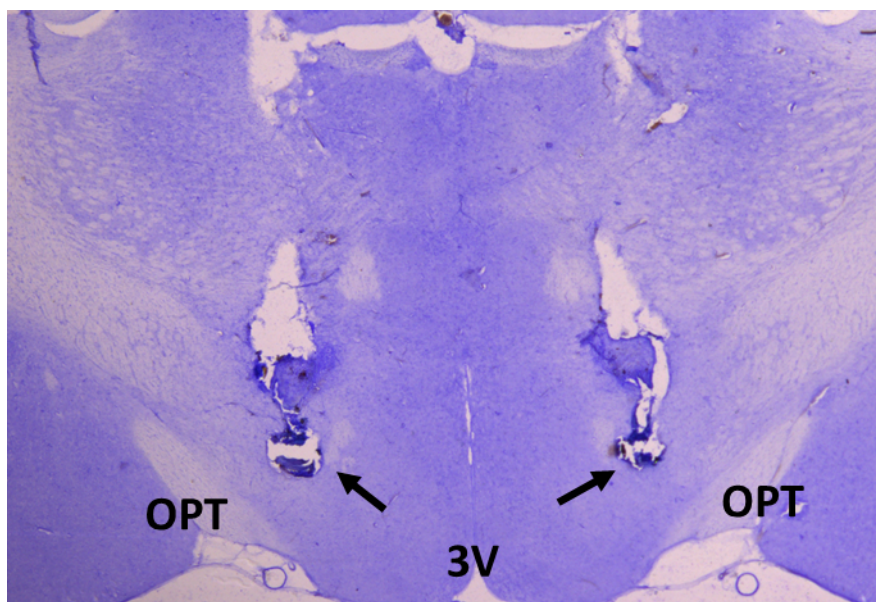


Figura 11 - Pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (MAP) e frequência cardíaca (FC) antes, durante e após a sessão aguda e 10º sessão de estresse de restrição de ratos representativos submetidos a tratamento local do HL com veículo ou CP376395 (antagonista seletivo receptor CRF₁). A primeira linha pontilhada (microinjeção) indica o momento do tratamento com HL.

A



B

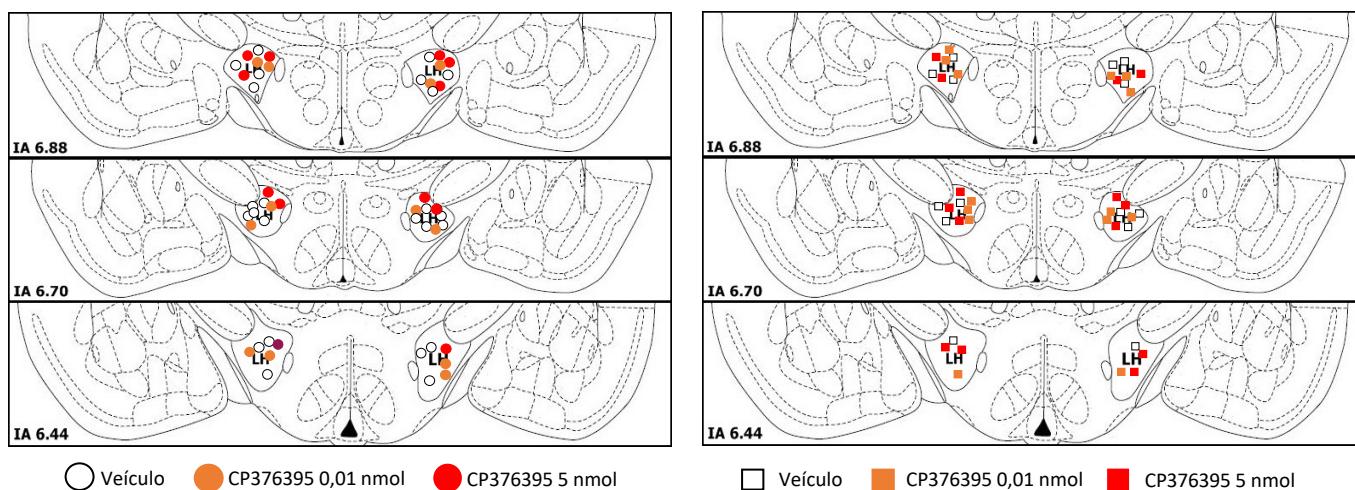
Estresse Agudo – 1^o sessãoEstresse Repetido – 10^o sessão

Figura 12 – A. Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro de um rato representativo mostrando sítios de microinjeção bilaterais no hipotálamo lateral (HL). B. Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral (HL) de veículo e de CP376395 em animais submetidos a uma sessão (esquerda) ou a 10 sessões (direita) de estresse de restrição.

5.2.2 Estudo do envolvimento do receptor CRF₂ no HL nas respostas cardiovasculares durante uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

A análise dos parâmetros basais de PAM, FC e temperatura cutânea em animais tratados com 100nL de veículo ou ASV-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) (0,01nmol ou 5nmol) e submetidos a uma sessão aguda ou repetida de estresse de restrição indicou efeito do tratamento na FC e na temperatura cutânea da cauda (Tabela 4). Entretanto, a análise *pós-teste* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do HL com antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂, 0,01 ou 5nmol) ou veículo em animais sujeitos a uma sessão aguda (agudo) ou a exposição repetida (repetido) ao estresse de restrição.

GRUPO	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Estresse de restrição agudo				
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	7	109 ± 2	365 ± 16	30,5 ± 0,8
ASV-30 - 0,01nmol	8	109 ± 3	360 ± 8	31,5 ± 0,4
ASV-30 - 5nmol	7	114 ± 2	412 ± 22	29,3 ± 0,3
Estresse de restrição repetido				
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	9	114±3	374±8	30,7±1
ASV-30 - 0,01nmol	8	117±2	401±11	31,3±0,4
ASV-30 - 5nmol	7	113±4	424±21	29,8± 0,2
<i>Tratamento</i>		F _(2,40) = 0,3, P>0.05	F _(2,40) = 5,5, P<0.05	F _(2,40) = 4,4, P<0.05
<i>Estresse</i>		F _(1,40) = 2,5, P>0.05	F _(1,40) = 3,05, P>0.05	F _(1,40) = 0,14, P>0.05
<i>Interação</i>		F _(2,40) = 1,2, P>0.05	F _(2,40) = 0,8, P>0.05	F _(2,40) = 0,14, P>0.05

ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

A análise das curvas temporais de variação da PAM (Δ PAM) indicou efeito do tempo (F_(65,2600) = 22,30 P<0,0001); mas sem influência do tratamento (F_(2,40) = 2,08, P>0,05) e do estresse (F_(1,40) = 0,13, P >0,05) (Figura 13). A análise também não indicou interações entre tratamento x estresse (F_(2,40) = 1,64, P>0,05), tempo x tratamento (F_(130,2600) = 1,06,

$P > 0,05$), tempo x estresse ($F_{(65,2600)} = 0,70$, $P > 0,05$) e tempo x tratamento x estresse ($F_{(130,2600)} = 1,14$, $P > 0,05$) (Figura 13).

A análise das curvas temporais de variação da FC (Δ FC) indicou efeito do tempo ($F_{(65,2600)} = 24,03$, $P < 0,0001$), do tratamento ($F_{(2,40)} = 4,05$, $P < 0,05$); mas sem efeito do estresse ($F_{(1,40)} = 0,72$, $P > 0,05$) (Figura 13). A análise também indicou interação entre tempo x tratamento ($F_{(130,2600)} = 1,92$, $P < 0,0001$) (Figura 13). Entretanto, a análise não indicou interação entre tratamento x estresse ($F_{(2,40)} = 1,03$, $P > 0,05$), tempo x estresse ($F_{(65,2600)} = 0,44$, $P > 0,05$) e tempo x tratamento x estresse ($F_{(130,2600)} = 0,86$, $P > 0,05$) (Figura 13). A análise *pós-teste* revelou que o tratamento do HL com ASV-30 nas doses de 0,01nmol e 5nmol reduziu a resposta taquicárdica observada durante a sessão aguda de restrição ($P < 0,05$) (Figura 13). A dose de 0,01nmol da ASV-30 também diminuiu a taquicardia durante a 10^o sessão de estresse de restrição ($P < 0,05$) (Figura 13).

A análise das curvas de temporais de variação da temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cutânea) indicou efeito do tempo ($F_{(11,440)} = 56,54$, $P < 0,0001$) e interação entre tempo x tratamento x estresse ($F_{(22,440)} = 1,70$, $P < 0,05$) (Figura 13). Entretanto, a análise não indicou efeito do tratamento ($F_{(2,40)} = 0,32$, $P > 0,05$) e do estresse ($F_{(1,40)} = 0,01$, $P > 0,05$), nem interações entre tratamento x estresse ($F_{(2,40)} = 2,60$, $P > 0,05$), tempo x tratamento ($F_{(22,440)} = 1,45$, $P > 0,05$) e tempo x estresse ($F_{(11,440)} = 0,48$, $P > 0,05$) (Figura 13). A análise *pós-teste* indicou diferença entre as respostas geradas na sessão aguda e na 10^o sessão de estresse nos animais tratados com ASV-30 na dose de 5nmol no HL ($P < 0,05$) (Figura 13).

Na figura 14 são apresentados registos experimentais representativos que mostram o efeito da microinjeção do veículo ou do ASV-30 no HL sobre a pressão arterial e a FC antes, durante e após a 1^o ou 10^o sessão de estresse de restrição.

A Figura 15 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental.

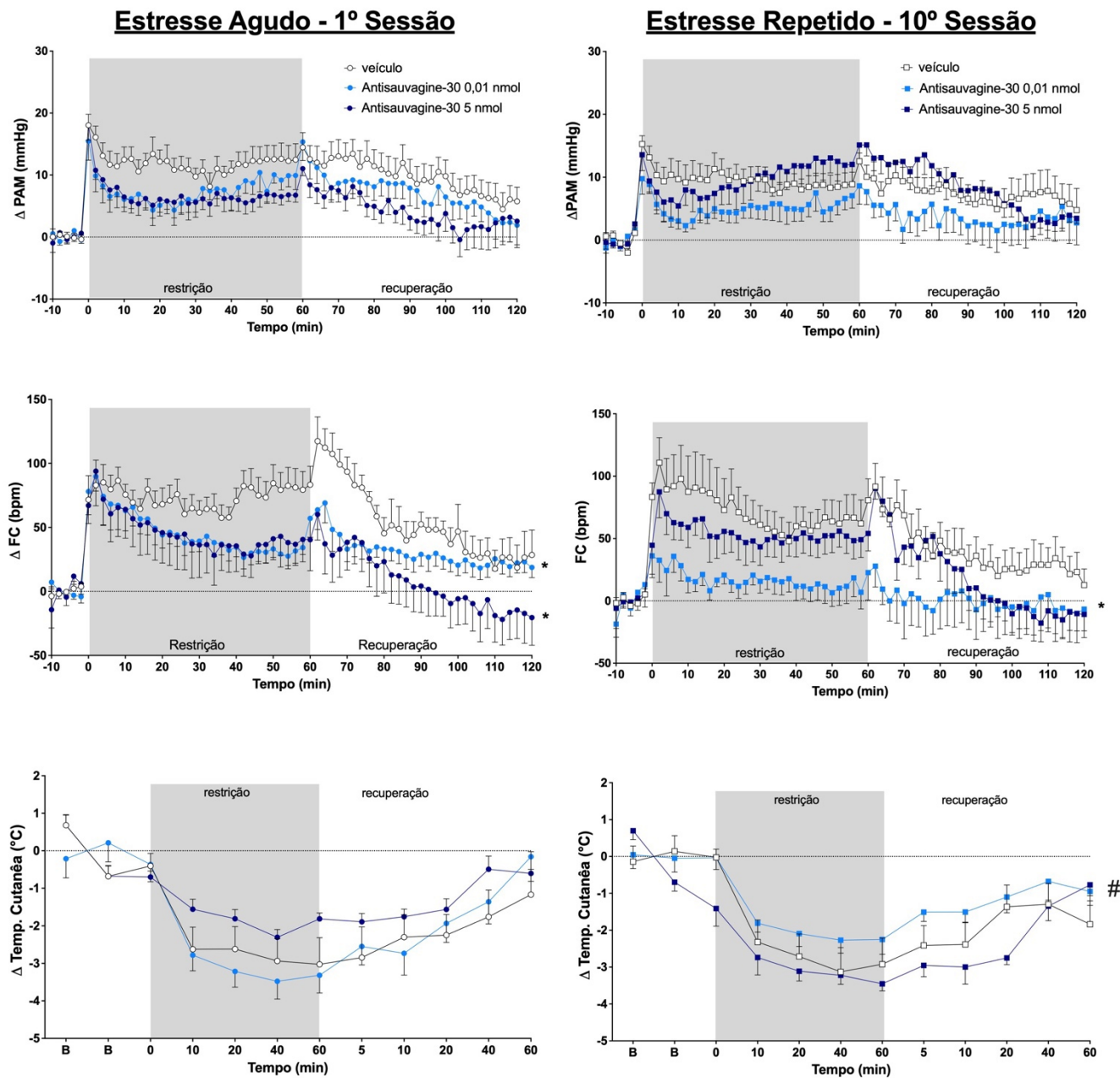


Figura 13 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temp. cutânea) induzidas durante uma sessão aguda (1º sessão) e pela 10ª sessão de estresse de restrição em animais tratados com antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF_2) nas doses de 0,01nmol ou 5nmol ou veículo no HL. Círculos representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ ao longo de todo o período de restrição e recuperação em comparação com o respectivo grupo controle (veículo); # $P < 0,05$ ao longo de todo o período de restrição e recuperação em comparação com o respectivo grupo estresse agudo. ANOVA acompanhado pelo pós-teste de *Bonferroni*.

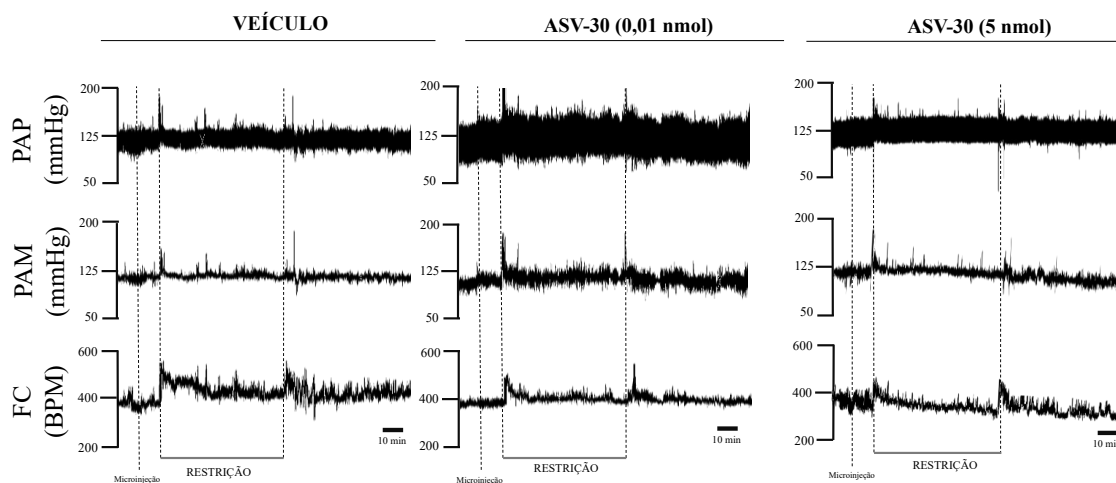
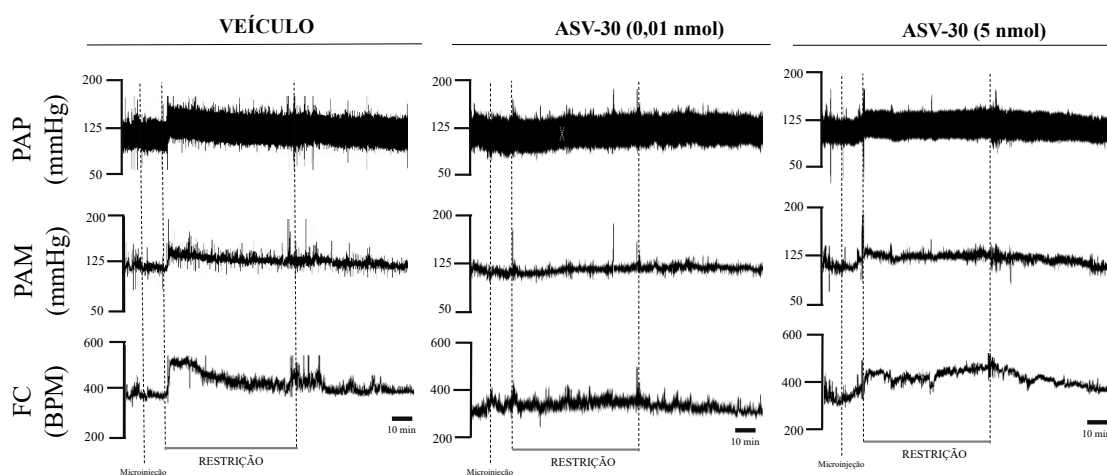
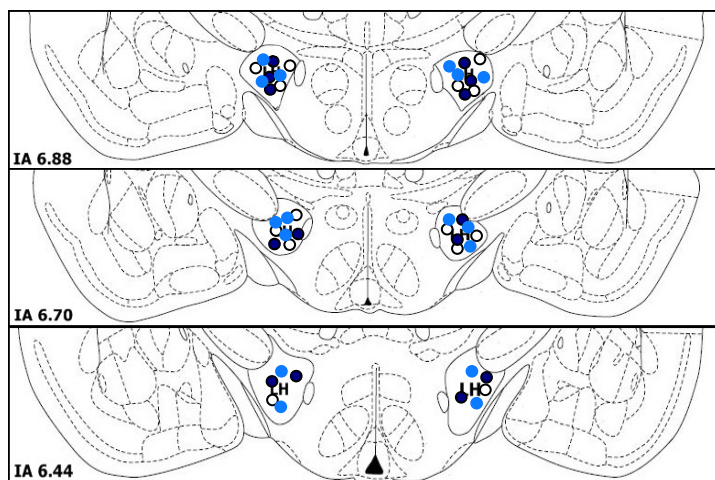
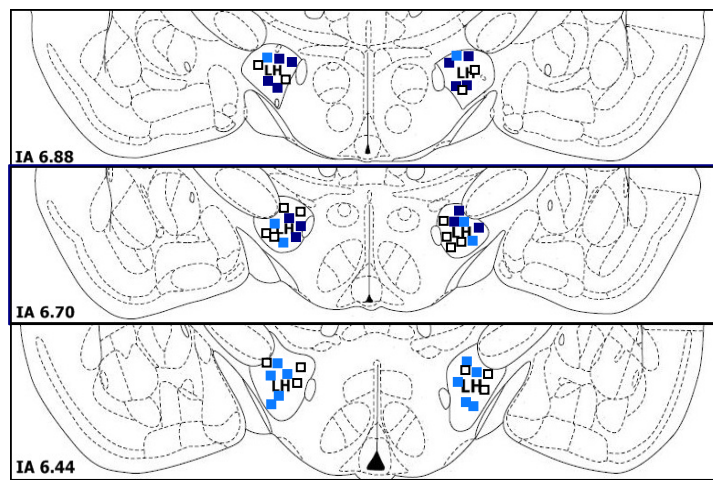
Estresse Agudo – 1º sessão**Estresse Repetido – 10º sessão**

Figura 14 - Pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (MAP) e frequência cardíaca (FC) antes, durante e após a sessão aguda e 10º sessão de estresse de restrição de ratos representativos submetidos a tratamento local do HL com veículo ou ASV-30 (antagonista seletivo receptor CRF₂). A primeira linha pontilhada (microinjeção) indica o momento do tratamento com HL.

Estresse Agudo – 1º sessão



Estresse Repetido – 10º sessão



○ Veículo ● ASV-30 0,01 nmol ● ASV-30 5 nmol

□ Veículo ■ ASV-30 0,01 nmol ■ ASV-30 5 nmol

Figura 15 –Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral (HL) de veículo e de antisauvagine-30 (ASV-30) em animais submetidos a uma sessão (esquerda) ou a 10 sessões (direita) de estresse de restrição.

5.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL na resposta do tipo ansiogênica após uma sessão aguda ou a 10^o sessão de estresse de restrição

5.3.1 Efeito do tratamento do HL com antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395) na resposta do tipo ansiogênica após uma sessão aguda e a 10^o sessão de estresse de restrição em ratos

A análise do número de entradas nos braços fechados do LCE indicou efeito do estresse ($F_{(1, 75)} = 7,974$, $P < 0,05$) (Figura 15), porém sem influência do tratamento ($F_{(2, 75)} = 1,198$, $P > 0,05$) e interação entre tratamento x estresse ($F_{(2, 75)} = 2,801$, $P > 0,05$) (Figura 16). A análise *pós-teste* não revelou nenhuma diferença entre os grupos experimentais (Figura 16).

A análise da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE indicou interação entre tratamento x estresse ($F_{(2, 75)} = 6,138$, $P < 0,05$), porém sem efeito do tratamento ($F_{(2, 75)} = 2,886$, $P < 0,05$) e do estresse ($F_{(1, 75)} = 0,5921$, $P > 0,05$) (Figura 16). A análise *pós-teste* revelou que a sessão aguda de estresse de restrição diminuiu a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE nos animais tratados com veículo em comparação ao grupo que não foi submetido ao estresse de restrição (*naive*) ($P < 0,05$) (Figura 16). Além disso, o tratamento com CP376395 inibiu a diminuição das entradas nos braços abertos causada pelo estresse de restrição agudo ($P < 0,05$) (Figura 16). A análise não indicou efeito da exposição repetido ao estresse de restrição na porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ($P > 0,05$) (Figura 16).

A análise da porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE indicou efeito do tratamento ($F_{(2, 75)} = 3,645$, $P < 0,05$) e interação entre tratamento x estresse ($F_{(2, 75)} = 3,281$, $P < 0,05$), porém sem influência do estresse ($F_{(1, 75)} = 1,469$, $P > 0,05$) (Figura 16). A análise *pós-teste* revelou que uma sessão aguda de estresse de restrição diminuiu a porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE nos animais tratados com veículo em comparação ao grupo *naive* ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento com CP376395 inibiu a diminuição do tempo de

permanência nos braços abertos causada pelo estresse de restrição agudo ($P < 0,05$) (Figura 16). A análise não indicou efeito da exposição repetido ao estresse de restrição na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ($P > 0,05$) (Figura 16).

A Figura 17 apresenta imagens representativas que mostram a exploração do LCE após a sessão aguda ou a 10^a sessão de estresse de restrição em animais tratados com veículo ou CP376395 no HL.

A Figura 18 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental.

Antagonista Seletivo do Receptor CRF₁

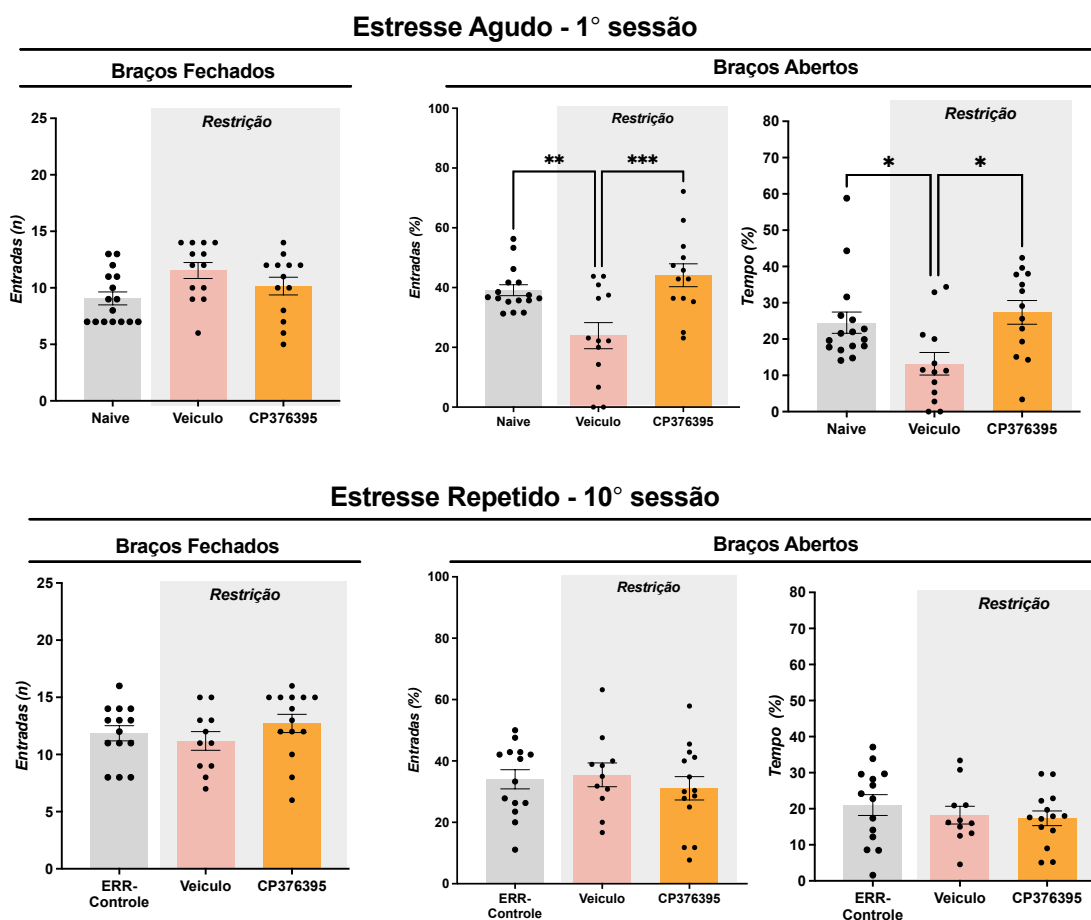


Figura 16 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) por cinco minutos de animais não-estressados (*naive*; $n=16$) e imediatamente após uma sessão aguda (1^o sessão) ou a 10^o sessão de estresse de restrição que receberam microinjeção bilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁; 0,01nmol; 1^o sessão: $n=13$; 10^o sessão: $n=14$) ou veículo (1^o sessão: $n=13$; 10^o sessão: $n=11$) no HL. O grupo “ERR- controle” ($n=14$) foi exposto a nove sessões de estresse de restrição, mas não foi estressado no dia de avaliação comportamental no LCE. O tratamento do HL foi realizado 10 minutos antes do início da sessão de restrição. As colunas representam as médias \pm EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo *naive*. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

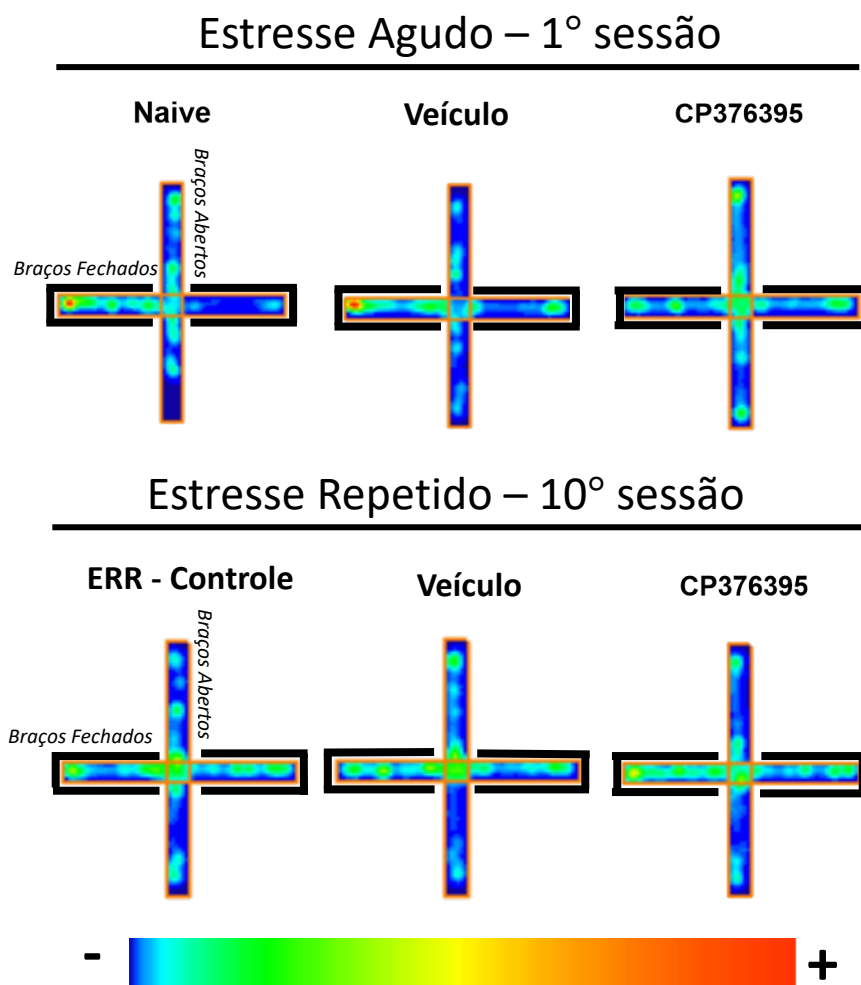


Figura 17 - Imagens representativas mostrando a exploração do LCE após a sessão aguda ou a 10^a sessão de estresse de restrição em animais tratados com veículo ou CP376395 (antagonista seletivo receptor CRF₁) no HL.

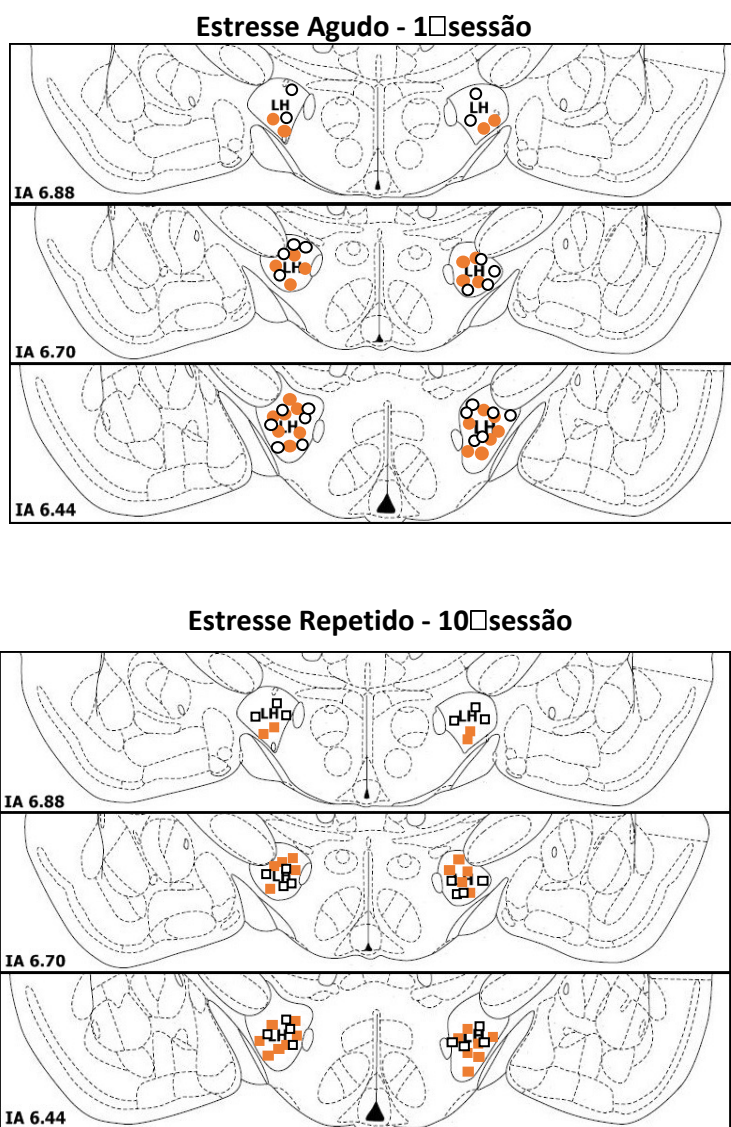


Figura 18 – Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral (HL) de veículo (agudo: círculos brancos; 10º sessão: quadrados brancos) e de CP376395 (agudo: círculos laranjas; 10º sessão: quadrados laranjas) em animais submetidos a uma sessão (acima) ou a 10 sessões (abaixo) de estresse de restrição.

5.3.2. Efeito do tratamento do HL com antagonista seletivo do receptor CRF₂ (antisauvagine-30) na resposta do tipo ansiogênica após uma sessão aguda e a 10ª sessão de estresse de restrição em ratos

A análise do número de entradas nos braços fechados do LCE não indicou efeito do tratamento ($F_{(2, 60)} = 1,609$, $P > 0,05$), do estresse ($F_{(1, 60)} = 1,783$, $P > 0,05$) ou interação entre tratamento x estresse ($F_{(2, 60)} = 1,256$, $P > 0,05$) (Figura 19).

A análise da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE indicou efeito do tratamento ($F_{(2, 60)} = 8,124$, $P < 0,05$) e interação entre tratamento x estresse ($F_{(2, 60)} = 7,774$, $P < 0,05$), porém sem influência do estresse ($F_{(1, 60)} = 0,859$, $P > 0,05$) (Figura 19). A análise *pós-teste* revelou que uma sessão aguda de estresse de restrição diminuiu a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE nos animais tratados com veículo no HL em comparação ao grupo *naive* ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento do HL com ASV-30 inibiu a diminuição na entrada nos braços abertos causada pelo estresse de restrição agudo ($P < 0,05$) (Figura 19). Entretanto, a análise não indicou efeito da exposição repetido ao estresse de restrição na porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE ($P > 0,05$) (Figura 19).

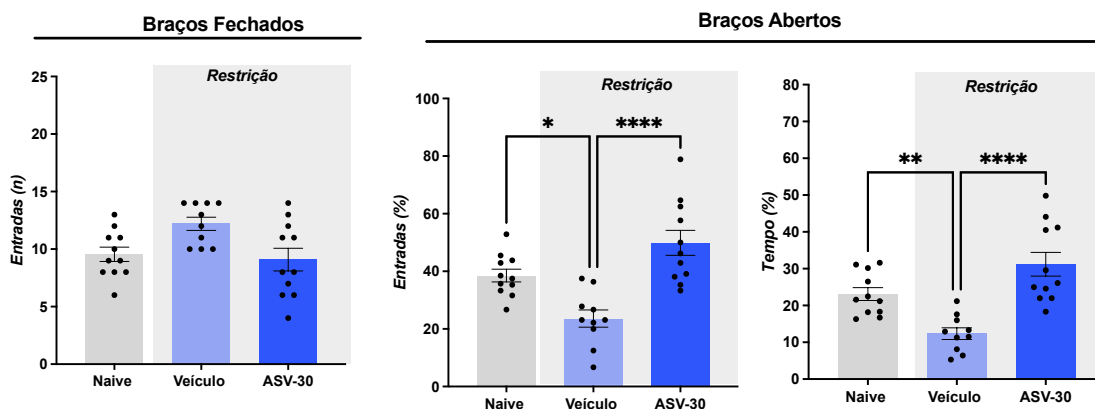
A análise da porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE indicou efeito do tratamento ($F_{(2, 60)} = 6,142$, $P < 0,05$) e interação entre os fatores ($F_{(2, 60)} = 6,383$, $P < 0,05$), porém sem influência do estresse ($F_{(1, 60)} = 0,1806$, $P > 0,05$) (Figura 19). A análise *pós-teste* revelou que uma sessão aguda de estresse de restrição diminuiu a porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE nos animais tratados com veículo no HL em comparação ao grupo *naive* ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento com ASV-30 inibiu a diminuição no tempo de permanência nos braços abertos causada pelo estresse de restrição agudo ($P < 0,05$) (Figura 19). No entanto, a análise não indicou efeito da exposição repetida ao estresse de restrição na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ($P > 0,05$) (Figura 19).

A Figura 20 apresenta imagens representativas que mostram a exploração do LCE após a sessão aguda ou a 10^a sessão de estresse de restrição em animais tratados com veículo ou ASV-30 no HL.

A Figura 21 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental.

Antagonista Seletivo do Receptor CRF₂

Estresse Agudo - 1^o sessão



Estresse Repetido - 10^o sessão

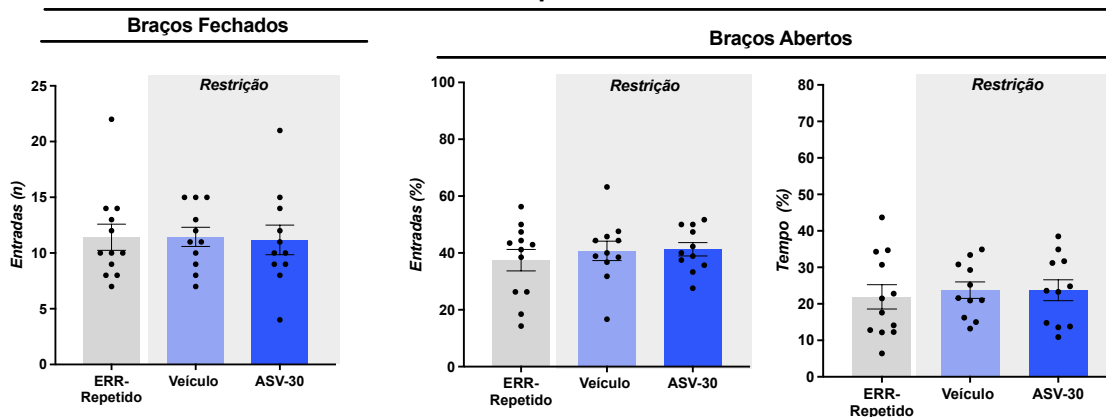


Figura 19 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) por cinco minutos de animais não-estressados (naive; n=11) e imediatamente após uma sessão aguda (1^o sessão) ou a 10^o sessão de estresse de restrição que receberam microinjeção bilateral de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂; 0,01nmol; 1^o sessão: n=11; 10^o sessão: n=11) ou veículo (1^o sessão: n=10; 10^o sessão: n=11) no HL. O grupo “ERR – controle” (n=12) foi exposto a nove sessões de estresse de restrição, mas não foi estressado no dia de avaliação comportamental no LCE. O tratamento do HL foi realizado 10 minutos antes do início da sessão de restrição. As colunas representam as médias ± EPM. *P<0,05 em relação ao grupo *naive*. *P<0,05, ** P<0,01 e ****P<0,0001. ANOVA seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*.

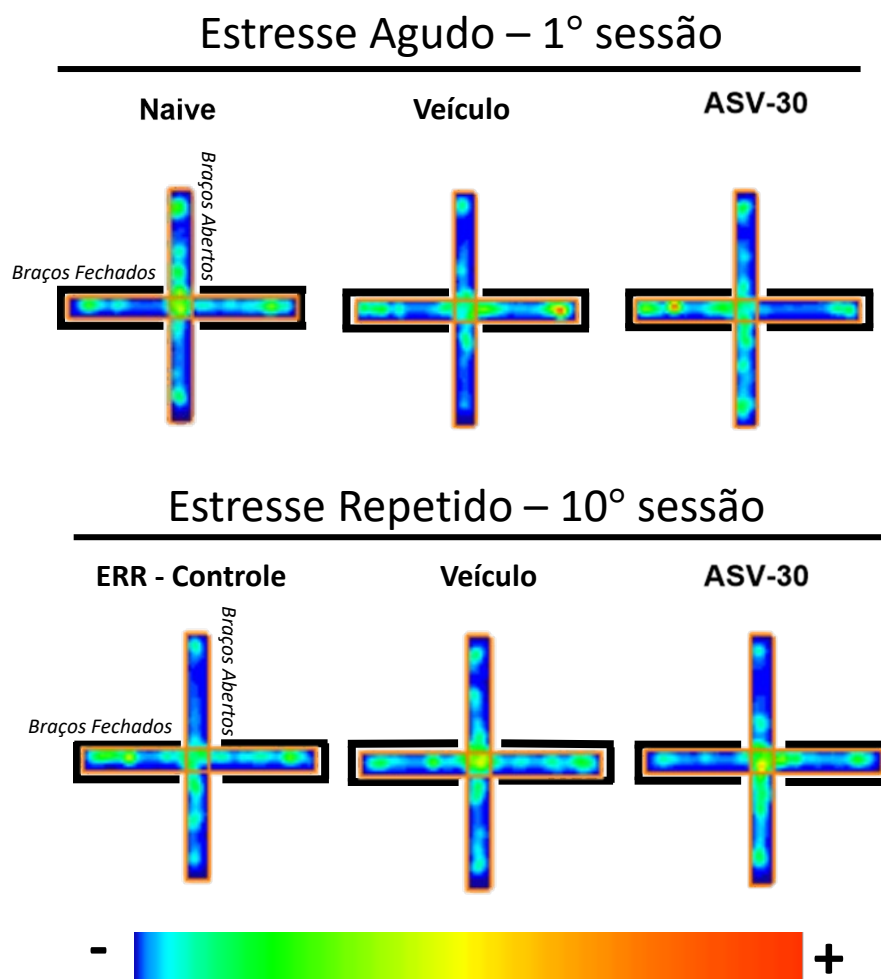
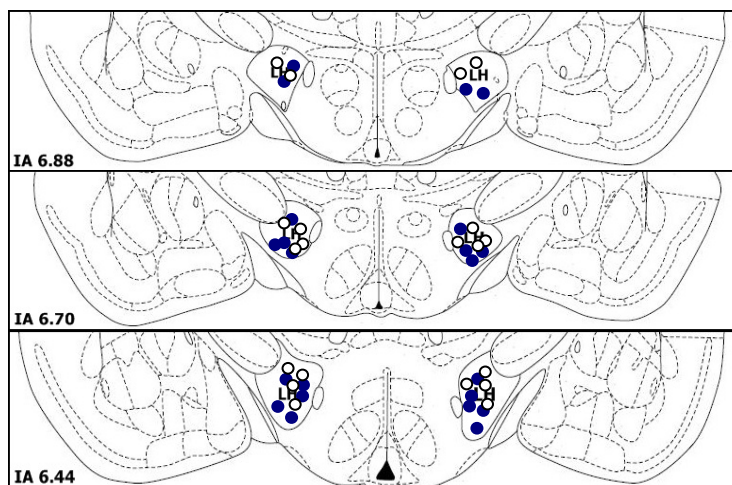


Figura 20 - Imagens representativas mostrando a exploração do LCE após a sessão aguda ou a 10ª sessão de estresse de restrição em animais tratados com veículo ou ASV-30 (antagonista seletivo receptor CRF₂) no HL.

Estresse Agudo - 1^o sessão



Estresse Repetido - 10^o sessão

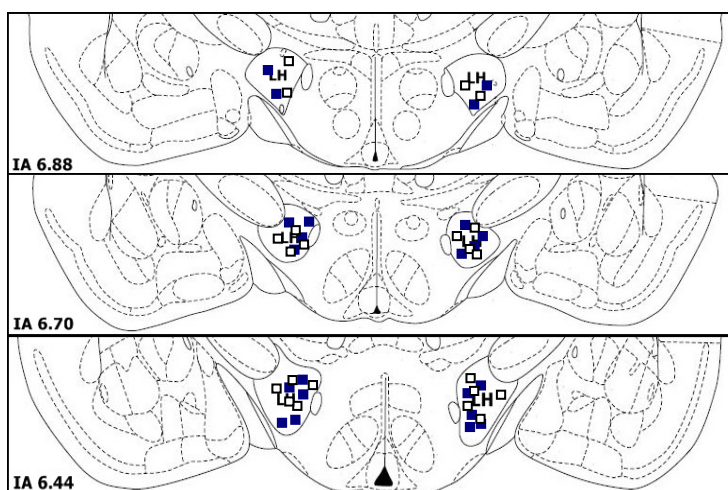


Figura 21 – Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no hipotálamo lateral (HL) de veículo (agudo: círculos brancos; 10^o sessão: quadrados brancos) e de antisauvagine-30 (agudo: círculos azuis; 10^o sessão: quadrados azuis em animais submetidos a uma sessão (esquerda) ou a 10 sessões (direita) de estresse de restrição.

5.4. Estudo do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV

5.4.1. Estudo do envolvimento do receptor CRF₁ no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV

5.4.1.1. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF₁ nos parâmetros cardiovasculares basais em animais controle e submetidos ao ECV

A análise dos valores basais de PAM indicou efeito do estresse, mas sem influência do tratamento do HL com CP376395 ou interação entre o estresse x tratamento (Tabela 5). Por sua vez, a análise dos parâmetros basais de FC não indicou efeito do estresse, tratamento ou interação entre o estresse x tratamento. O pós-teste de *Bonferroni* não indicou diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros cardiovasculares.

Tabela 5 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) após o tratamento farmacológico do HL com CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 0,01 nmol) ou veículo em animais controle ou sujeito ao ECV.

GRUPO	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CONTROLE			
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	8	108±2	365±13
CP376395	8	110±2	406±19
ECV			
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	7	114±3 [#]	377±5
CP376395	7	116±4 [#]	396±13
<i>Tratamento</i>		F _(1,26) = 0,29; P>0,05	F _(1,26) = 4,07; P>0,05
<i>Estresse</i>		F _(1,26) = 4,7; P<0,05	F _(1,26) = 0,002, P>0,05
<i>Interação</i>		F _(1,26) = 0,004; P>0,05	F _(1,26) = 0,56, P>0,05

P<0,05 indicando efeito do fator principal estresse. ANOVA bifatorial.

5.4.1.2. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF_1 na atividade autônoma cardíaca em animais controle e submetidos ao ECV

A análise espectral do intervalo de pulso (IP) não indicou efeito do estresse (LF: $F_{(1, 26)} = 2,463$, $P > 0,05$; HF: $F_{(1, 26)} = 2,463$, $P > 0,05$; LF/HF: $F_{(1, 26)} = 1,322$; $P > 0,05$), do tratamento farmacológico (LF: $F_{(1, 26)} = 0,7223$, $P > 0,05$; HF: $F_{(1, 26)} = 0,7223$, $P > 0,05$; LF/HF: $F_{(1, 26)} = 0,4351$, $P > 0,05$) ou interação entre estresse x tratamento (LF: $F_{(1, 26)} = 1,649$, $P > 0,05$; HF: $F_{(1, 26)} = 1,649$, $P > 0,05$; LF/HF: $F_{(1, 26)} = 2,147$, $P > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 22).

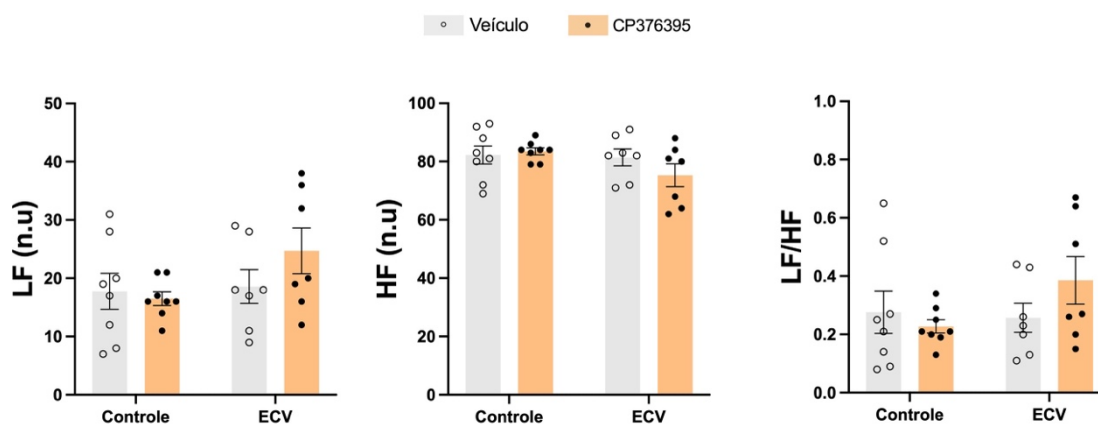


Figura 22 – Análise espectral do IP em animais controle e ECV tratados com veículo, ou o antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01 nmol) no HL. (Esquerda) Análise espectral das oscilações de IP na faixa LF. (Centro) Análise espectral das oscilações de IP nas faixas HF. (Direita) Relação LF/HF. As barras representam a média \pm SEM.

5.4.1.3. *Efeitos do tratamento farmacológico do HL com o antagonista dos receptores CRF₁ na atividade barorreflexa de animais controle e submetidos ao ECV*

Abordagem Farmacológica – A análise dos parâmetros da função barorreflexa derivados das curvas sigmóides revelou efeito do estresse no P2 ($F_{(1, 27)} = 11,19$; $P < 0,001$), ΔP ($F_{(1, 26)} = 9,728$; $P < 0,01$) e no ganho ($F_{(1, 26)} = 8,867$; $P < 0,01$), mas sem efeito no P1 ($F_{(1, 26)} = 0,4507$; $P > 0,05$) e PA_{50} ($F_{(1, 26)} = 0,7686$; $P > 0,05$) (Figura 23). Foi identificado efeito do tratamento no P1 ($F_{(1, 26)} = 6,069$; $P < 0,05$) e no ganho ($F_{(1, 26)} = 10,13$; $P < 0,01$), porém sem efeito no P2 ($F_{(1, 27)} = 0,3911$; $P > 0,05$), ΔP ($F_{(1, 26)} = 0,6206$; $P > 0,05$) e PA_{50} ($F_{(1, 26)} = 2,218$; $P > 0,05$) (Figura 23). A análise indicou uma interação entre estresse x tratamento no P1 ($F_{(1, 26)} = 14,01$; $P < 0,001$), P2 ($F_{(1, 27)} = 4,746$; $P < 0,05$), ΔP ($F_{(1, 26)} = 14,41$; $P < 0,001$) e no ganho ($F_{(1, 26)} = 6,181$; $P < 0,05$), mas não na PA_{50} ($F_{(1, 26)} = 0,2985$; $P > 0,05$) (Figura 23). O pós-teste indicou que o ECV diminuiu o P1 ($P < 0,05$), P2 ($P < 0,05$), ΔP ($P < 0,001$) e ganho ($P < 0,01$) nos animais tratados com veículo no HL (Figura 23). Foi observado que o tratamento do HL com CP376395 aumentou o P1 ($P < 0,01$), ΔP ($P < 0,01$) e o ganho ($P < 0,01$) em animais cronicamente estressados em comparação com o respectivo grupo tratado com veículo (Figura 23). O antagonismo do receptor CRF₁ no HL não afetou nenhum dos parâmetros da análise barorreflexa nos animais não-estressados ($P > 0,05$) (Figura 23).

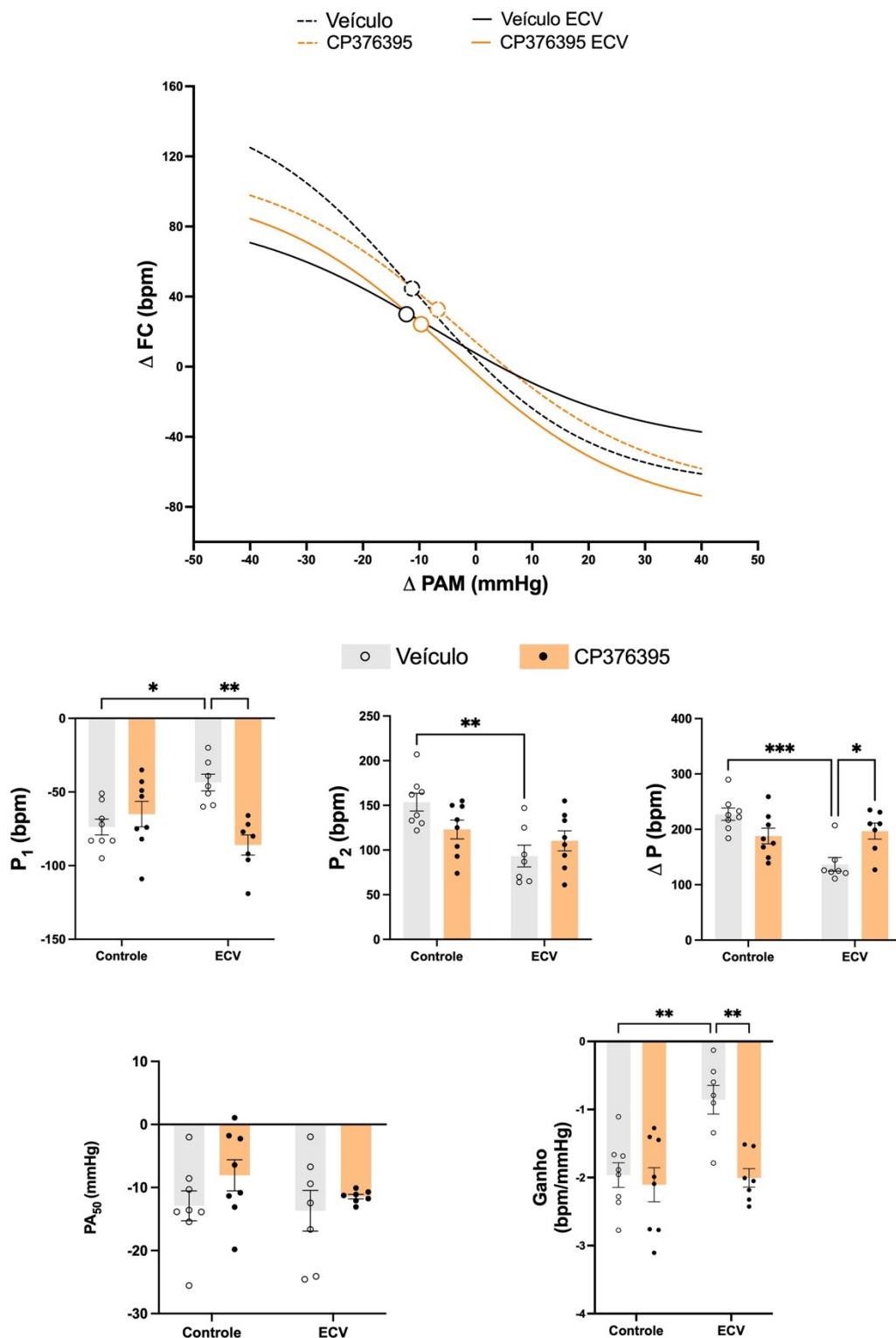


Figura 23 – Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01nmol) ou veículo em animais não-estressados ou submetidos ao ECV. (Superior) Análise de regressão não linear (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 PA_{50} . (Inferior) Parâmetros derivados da análise de regressão não linear para avaliação da função barorreflexa. As barras representam a média \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

Método de análise de sequência - A análise dos dados de sequências *UP* indicou efeito do estresse ($F_{(1, 26)} = 6,800$; $P < 0,05$), porém sem efeito do tratamento farmacológico ($F_{(1, 26)} = 0,05161$; $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 26)} = 0,7976$; $P > 0,05$) (Figura 24). O pós-teste de *Bonferorni* mostrou que o tratamento do HL com CP376395 diminuiu as sequências *UP* em animais estressados cronicamente em comparação com animais não estressados tratados com CP376395 ($P < 0,05$) (Figura 24).

A análise das sequências *DOWN* não indicou efeito do estresse ($F_{(1, 26)} = 3,108$; $P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1, 26)} = 0,2369$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 26)} = 0,01228$; $P > 0,05$) (Figura 24). A análise dos dados da média de todas as sequencias (sequências *ALL*) indicou efeito do estresse ($F_{(1, 26)} = 6,703$; $P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento farmacológico ($F_{(1, 26)} = 0,3299$; $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 26)} = 0,1980$; $P > 0,05$). O pós-teste de *Bonferorni* não indicou diferenças específicas entre os grupos experimentais (Figura 24).

A análise do índice de efetividade do barorreflexo (IEB) não indicou efeito do estresse ($F_{(1, 26)} = 0,7074$; $P > 0,05$), do tratamento farmacológico ($F_{(1, 26)} = 0,03623$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 26)} = 0,4066$; $P > 0,05$) (Figura 24).

A Figura 25 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental.

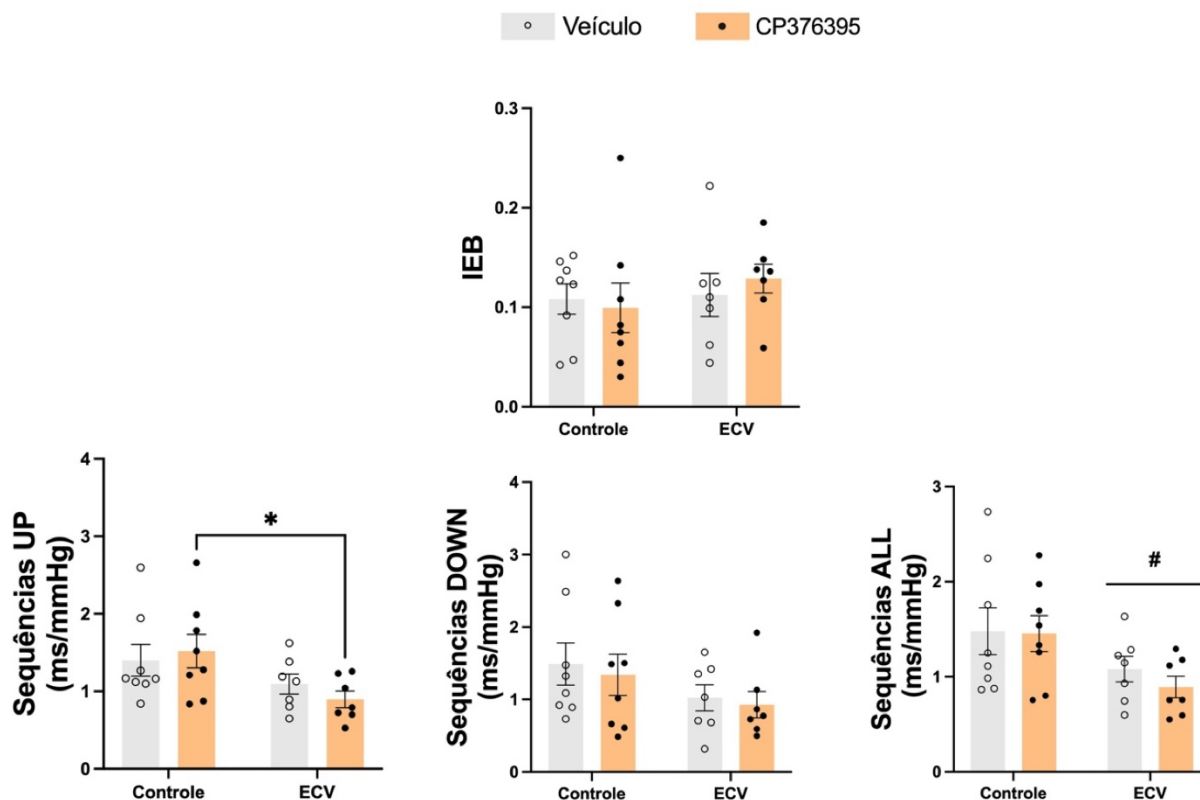


Figura 24 – Atividade barorreflexa avaliada pelo método de sequência em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF_1 CP376395 (0,01nmol) ou veículo. (Superior) Índice de efetividade do barorreflexo (IEB). As barras representam a média \pm EPM. (Inferior) 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 decréscimos (sequência *DOWN*, gráfico do meio) da PAS, assim como a média de todas as sequências (sequências *ALL*, gráfico à direita). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$. # $P < 0,05$ efeito principal do fator estresse, ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*.

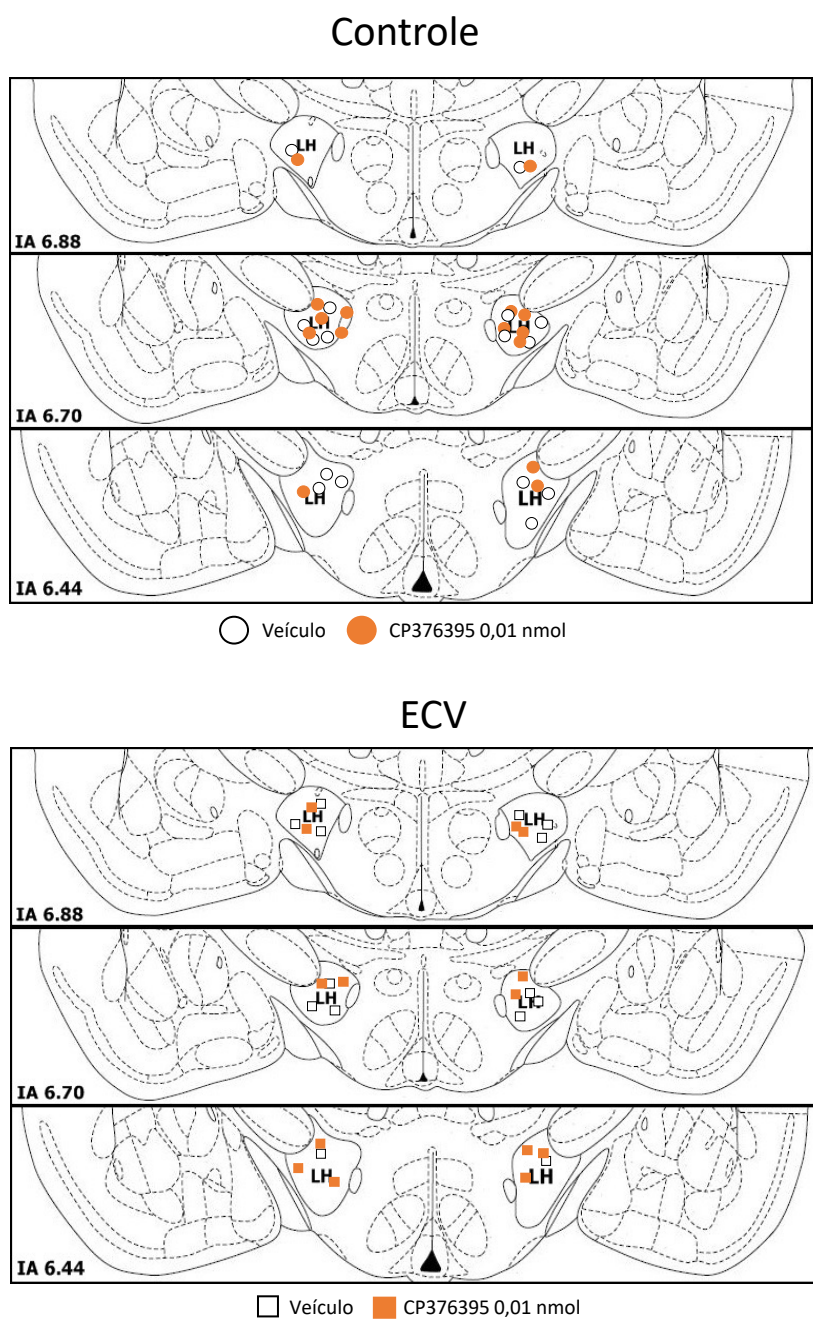


Figura 25 – Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de veículo ou de ASV-30 em animais controle (acima) ou submetidos ao ECV (abaixo).

5.4.2. Estudo do envolvimento do receptor CRF₂ no HL nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV

5.4.2.1. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF₂ nos parâmetros cardiovasculares basais em animais controle e submetidos ao ECV

A análise dos valores basais de PAM indicou efeito do estresse e do tratamento do HL com ASV-30, porém sem interação entre estresse x tratamento (Tabela 6). A análise dos parâmetros basais de FC não indicou efeito do estresse, do tratamento ou interação entre o estresse x tratamento. O pós-teste de *Bonferroni* não indicou diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros cardiovasculares analisados.

Tabela 6 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) após o tratamento farmacológico do HL com antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂, 0,01 nmol) ou veículo em animais controle ou sujeito a exposição ao ECV

GRUPO	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CONTROLE			
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	7	108±3	377±13
ANTISAUVAGINE-30	7	114±7@	398±13
ECV			
VEÍCULO (NaCl 0,9%)	7	115±4#	378±9
ANTISAUVAGINE-30	7	122±7#@	396±10
<i>Tratamento</i>		F _(1,24) = 4,95; P<0,05	F _(1,24) = 2,7; P>0,05
<i>Estresse</i>		F _(1,24) = 6; P<0,05	F _(1,24) = 0,00008; P>0,05
<i>Interação</i>		F _(1,24) = 0,02; P>0,05	F _(1,24) = 0,008; P>0,05

P<0,05 indicando efeito do fator principal estresse; @ P<0,05 indicando efeito do fator principal tratamento. ANOVA bifatorial.

5.4.2.2. Efeito do tratamento farmacológico no HL com o antagonista do receptor CRF_2 na atividade autônoma cardíaca em animais controle e submetidos ao ECV

A análise espectral do intervalo de pulso (IP) não mostrou efeito do estresse (LF: $F_{(1, 24)} = 1,320$, $P > 0,05$; HF: $F_{(1, 24)} = 1,320$, $P > 0,05$; LF/HF: $F_{(1, 24)} = 0,5240$, $P > 0,05$), do tratamento farmacológico (LF: $F_{(1, 24)} = 2,588$, $P > 0,05$; HF: $F_{(1, 24)} = 2,588$, $P > 0,05$; LF/HF: $F_{(1, 24)} = 1,839$, $P > 0,05$) ou interação entre estresse x tratamento (LF: $F_{(1, 24)} = 0,03380$, $P > 0,05$; HF: $F_{(1, 24)} = 0,03380$, $P > 0,05$; LF/HF: $F_{(1, 24)} = 0,1423$, $P > 0,05$) em nenhum dos parâmetros (Figura 26).

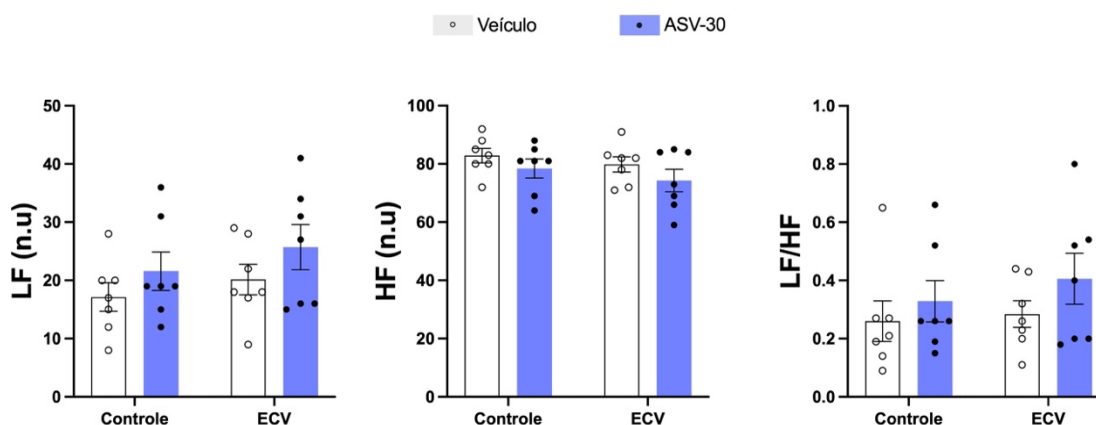


Figura 26 – Análise espectral do IP em animais controle e ECV tratados com veículo, ou o antagonista seletivo do receptor CRF_2 ASV-30 (0,01 nmol) no HL. (Esquerda) Análise espectral das oscilações de IP na faixa LF. (Centro) Análise espectral das oscilações de IP nas faixas HF. (Direita) Relação LF/HF. As barras representam a média \pm SEM.

5.4.2.3. *Efeitos do tratamento farmacológico do HL com o antagonista dos receptores CRF2 na função barorreflexa de animais controle e submetidos ao ECV*

Abordagem Farmacológica – A análise dos parâmetros da função barorreflexa derivados das curvas sigmóides revelou efeito do estresse no P1 ($F_{(1, 24)} = 6,258$; $P < 0,05$), P2 ($F_{(1, 24)} = 11,64$; $P < 0,01$), ΔP ($F_{(1, 24)} = 17,19$; $P < 0,001$) e ganho ($F_{(1, 24)} = 14,70$; $P < 0,001$), mas não na PA_{50} ($F_{(1, 24)} = 0,3886$; $P > 0,05$) (Figura 27). Foi observado efeito do tratamento no ganho ($F_{(1, 24)} = 8,739$; $P = 0,01$), porém sem efeito no P1 ($F_{(1, 24)} = 0,4632$; $P > 0,05$), P2 ($F_{(1, 24)} = 0,8051$; $P > 0,05$), ΔP ($F_{(1, 24)} = 1,207$; $P > 0,05$) e PA_{50} ($F_{(1, 24)} = 2,762$; $P > 0,05$) (Figura 27). A análise não indicou interação entre estresse x tratamento no P1 ($F_{(1, 24)} = 0,7796$; $P > 0,05$), P2 ($F_{(1, 24)} = 0,2013$; $P > 0,05$), ΔP ($F_{(1, 24)} = 0,6972$; $P > 0,05$), PA_{50} ($F_{(1, 24)} = 0,1513$; $P = 0,05$) ou no ganho ($F_{(1, 24)} = 0,04687$; $P > 0,05$) (Figura 27). O pós-teste de *Bonferroni* indicou que o ECV diminuiu o P1 ($P < 0,05$), P2 ($P < 0,05$), ΔP ($P < 0,01$) e ganho ($P < 0,01$) em animais tratados com veículo. Foi observado que o tratamento com HL com ASV-30 aumentou o ganho em animais cronicamente estressados em comparação com o grupo tratado com veículo. Além disso, os animais estressados tratados com ASV-30 apresentaram diminuição do ganho em relação ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). No entanto, o antagonismo do receptor CRF_2 no HL não afetou nenhum parâmetro barorreflexo em animais não estressados ($P > 0,05$) (Figura 27)

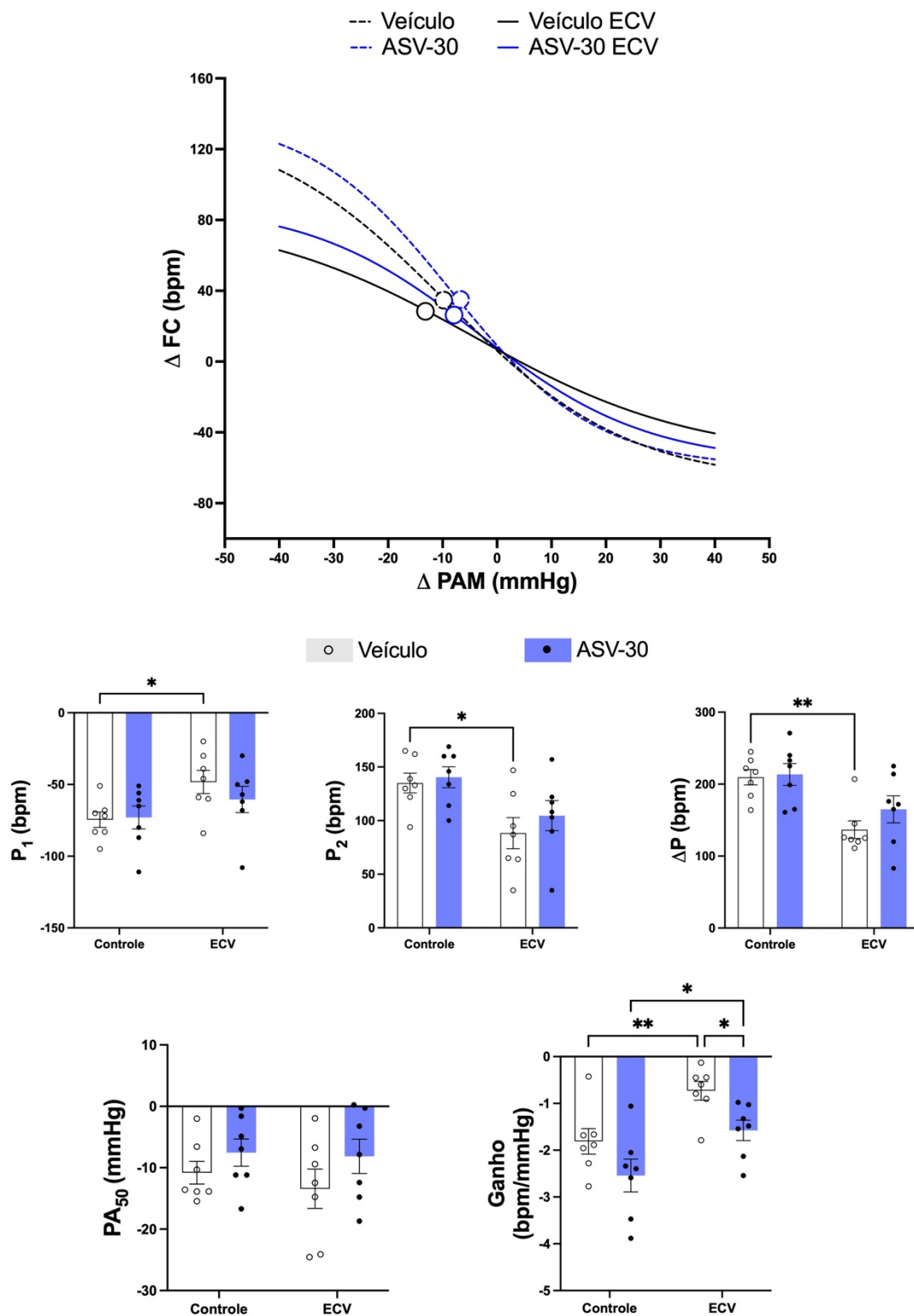


Figura 27 – Atividade barorreflexa avaliada pela abordagem farmacológica clássica em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF_2 ASV-30 (0,01nmol) ou veículo em animais não-estressados ou submetidos ao ECV. (Superior) Análise de regressão não linear (curva 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 PA_{50} . (Inferior) Parâmetros derivados da análise de regressão não linear para avaliação da função barorreflexa. As barras representam a média \pm SEM. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

Método de análise de sequência - A análise dos dados de sequências *UP* não indicou efeito do estresse ($F_{(1, 24)} = 1,186$; $P > 0,05$), do tratamento farmacológico ($F_{(1, 24)} = 3,191$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 24)} = 2,097$; $P > 0,05$) (Figura 28). A análise das sequências *DOWN* também não indicou efeito do estresse ($F_{(1, 24)} = 1344$; $P > 0,05$), do tratamento ($F_{(1, 24)} = 4,129$; $P > 0,05$) ou interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 24)} = 0,4011$; $P > 0,05$) (Figura 28). A análise dos dados da média de todas as sequências (sequências *ALL*) indicou efeito do tratamento ($F_{(1, 24)} = 4,961$; $P < 0,05$), mas sem efeito do estresse ($F_{(1, 24)} = 0,005298$; $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 24)} = 1,657$; $P > 0,05$). O pós-teste de *Bonferroni* indicou que o tratamento do HL com ASV-30 aumentou as sequências *ALL* em animais não estressados em comparação ao seu respectivo grupo veículo ($P < 0,05$) (Figura 28).

A análise do índice de efetividade do barorreflexo (IEB) indicou efeito do estresse ($F_{(1, 24)} = 7,213$; $P < 0,05$), mas sem efeito do tratamento farmacológico ($F_{(1, 24)} = 0,0032$; $P > 0,05$) e interação entre estresse x tratamento ($F_{(1, 24)} = 1,758$; $P > 0,05$) (Figura 27). O pós-teste de *Bonferroni* indicou que o tratamento do HL com ASV-30 aumentou o IEB em animais estressados em comparação ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 28).

A Figura 29 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de todos os animais utilizados nesse protocolo experimental.

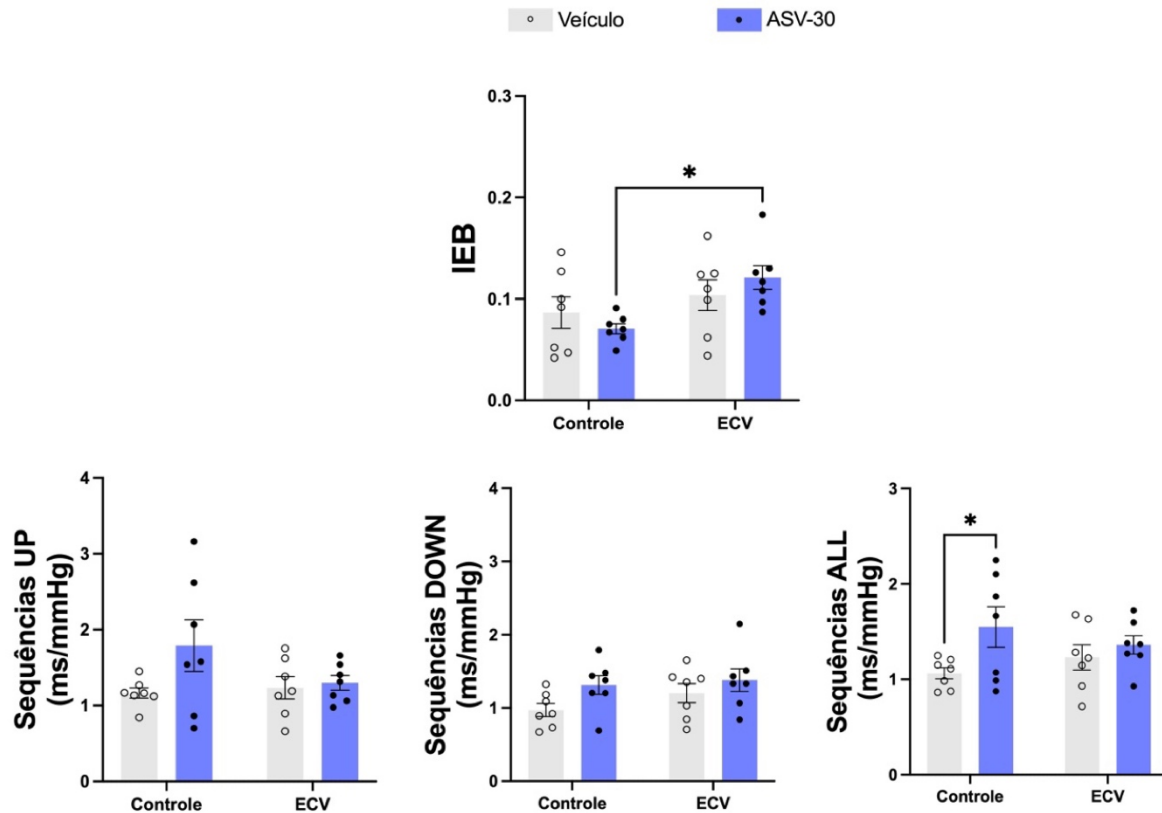
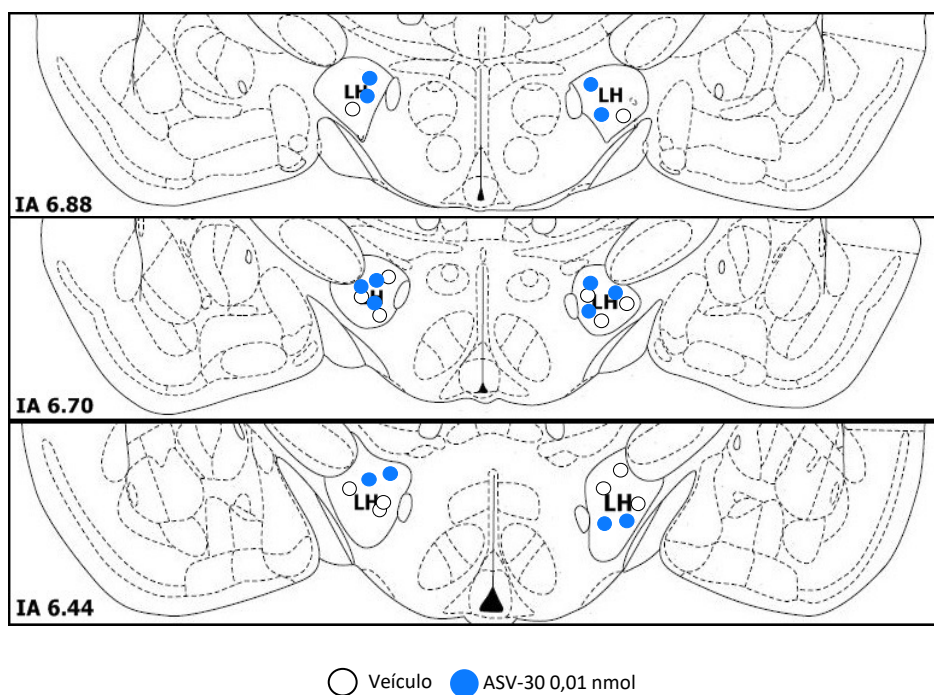


Figura 28 – Atividade barorreflexa avaliada pelo método de sequência em animais que receberam microinjeção bilateral no HL do antagonista seletivo do receptor CRF_2 ASV-30 (0,01nmol) ou veículo. (Superior) Índice de efetividade do barorreflexo (IEB). As barras representam a média \pm EPM. (Inferior) 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 decréscimos (sequência *DOWN*, gráfico do meio) da PAS, assim como a média de todas as sequências (sequências *ALL*, gráfico à direita). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$, ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*.

Controle



ECV

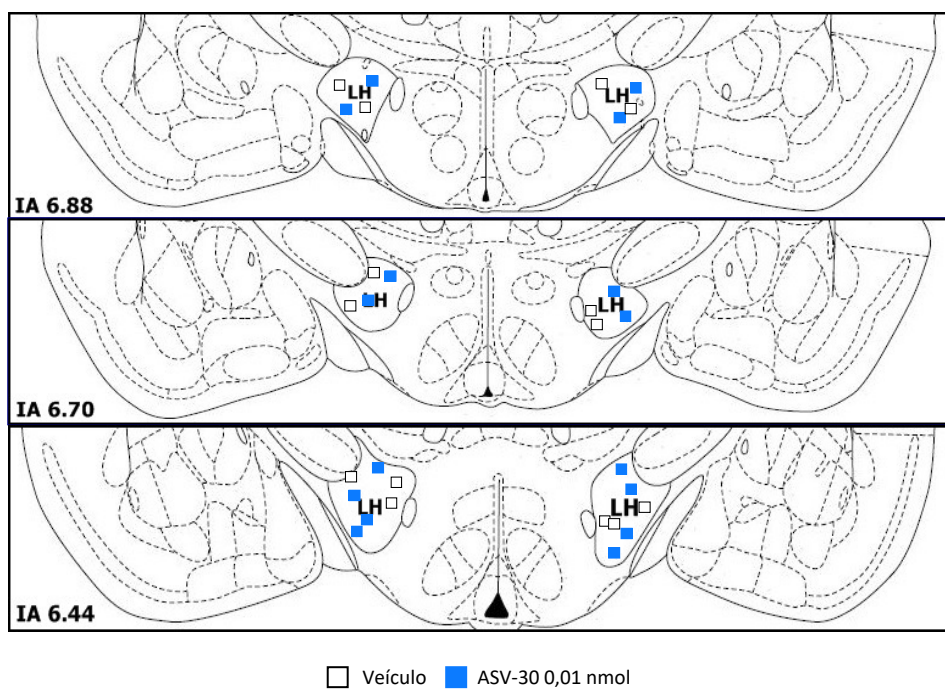


Figura 29 – Representação diagramática baseada no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no HL de veículo ou de ASV-30 em animais controle (acima) ou submetidos ao ECV (abaixo).

5.5. Estudo do efeito da exposição repetida ao estresse de restrição (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV) sobre os níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL

A figura 30A mostra uma imagem representativa da região do HL onde foi realizada a microdissecção para a obtenção de amostras para quantificação dos níveis proteicos dos receptores CRF₁ e CRF₂.

A análise dos valores de peso corporal indicou efeito do tempo ($F_{(2, 64)} = 518,6$, $P < 0,0001$), do estresse ($F_{(2, 32)} = 15,88$, $P < 0,0001$) e interação entre tempo x estresse ($F_{(4, 64)} = 50,26$, $P < 0,0001$). O pós-teste de *Bonferroni* revelou que os animais submetidos ao ERR ou ao ECV tiveram redução no ganho de peso em comparação ao grupo controle nos dias 5 e 10 do protocolo ($P < 0,0001$) (Figura 30B).

A análise dos dados referente ao nível proteico dos receptores CRF₁ no HL não indicou efeito do ERR ou ECV ($F_{(2, 29)} = 1,724$; $P > 0,05$) (Figura 30C). Entretanto, os dados indicaram um efeito do estresse ($F_{(2, 25)} = 5,059$; $P < 0,05$) nos níveis proteicos do receptor CRF₂ no HL. O pós-teste de *Bonferroni* revelou que os animais submetidos ao ECV apresentaram uma maior expressão do receptor CRF₂ no HL em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 30D).

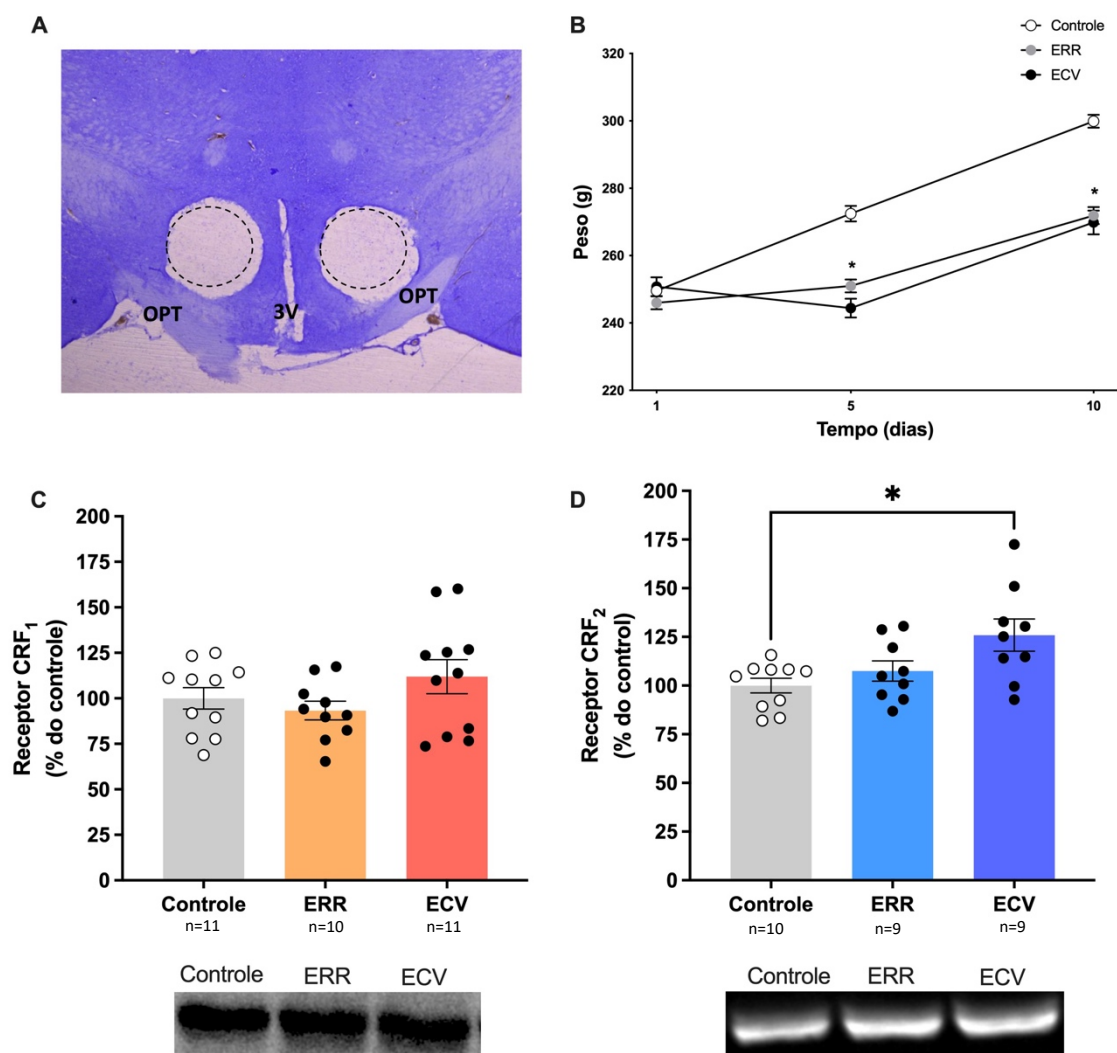


Figura 30 - **A.** Fotomicrografia de uma seção coronal do cérebro representando o local de retirada de tecido do HL utilizado nas análises. **B.** Curva temporal do peso corporal de ratos controle (branco; N=11) e submetidos ao ERR (cinza claro; n=10) ou ECV (preto; n=12). Os círculos representam a média ± SEM. * $P < 0,05$ vs grupo controle, ANOVA seguida de pós-teste de *Bonferroni*. **C** e **D.** Níveis proteicos do receptor CRF₁ (C) e CRF₂ (D) no HL em animais controle, expostos ao ERR ou ECV. As barras representam a média ± SEM. * $P < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste de *Bonferroni*.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam o envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” no HL, atuando através de receptores CRF₁ e CRF₂ locais, no controle das respostas cardiovasculares induzidas por estímulos aversivos. A tabela 7 resume todos os achados obtidos no presente estudo.

Tabela 7 – Resumo dos achados obtidos no presente estudo.

Antagonismos dos receptores:	CRF₁		CRF₂	
	Agudo	ERR	Agudo	ERR
Respostas cardiovasculares ao estresse de restrição				
Efeito pressor	=	=	=	=
Taquicardia	↓	↓	↓	↓
Redução da temperatura cutânea	=	↑(5nmol)	=	=
Efeito comportamental do tipo-ansio gênico				
Redução da exploração dos braços abertos do LCE	Reversão efeito	=	Reversão efeito	=
Antagonismos dos receptores:	CRF₁		CRF₂	
	Controle	ECV	Controle	ECV
Barorreflexo				
Disfunção (método farmacológico)	=	Reversão efeito	=	Reversão efeito
Antagonismos dos receptores:	CRF₁		CRF₂	
	ERR	ECV	ERR	ECV
Níveis proteicos dos receptores (em relação ao grupo controle)	=	=	=	↑

Segue abaixo discussão detalhada dos achados referentes ao papel da neurotransmissão “CRFérgica” do HL no controle das respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse de restrição repetido e no controle da função cardiovascular em animais submetidos ao ECV.

6.1. Neurotransmissão “CRFérgica” no HL e as repostas cardiovasculares ao estresse de restrição

O papel do HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição foi descrito previamente por Deolindo e colaboradores (2013), que relataram que a inibição sináptica bilateral aguda não-seletiva no HL induzida pelo tratamento local com CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) aumentou a taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição agudo, porém sem afetar a resposta pressora. O efeito do CoCl_2 foi mimetizado pelo tratamento do HL com um antagonista seletivo do receptor NMDA (DEOLINDO et al., 2013c), o que sugeriu um papel da neurotransmissão glutamatérgica local no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo HL. Em conjunto, esses resultados forneceram evidências de um papel inibitório do HL no controle das respostas cardíacas ao estresse de restrição agudo, no qual foi mediado, ao menos em parte, pela neurotransmissão glutamatérgica local. Gomes-de-Souza e colaboradores (2019) reportaram que o tratamento do HL com um antagonista seletivo do receptor GABA_A causou diminuição da resposta de taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição agudo. Esses resultados reforçaram as evidências de um papel inibitório do HL no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, uma vez que o antagonismo da neurotransmissão GABAérgica aumenta a ativação neuronal local (JONES; MYERS; HERMAN, 2011). Tendo em vista todas essas evidências, o papel do HL nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse parece ser o resultado do balanço na ativação de terminações glutamatérgicas e GABAérgicas no HL, com predomínio na ativação dos mecanismos excitatórios (como evidenciado pelo efeito similar do CoCl_2 e do antagonista de receptores NMDA).

Os dados do presente estudo trazem evidências de mais um mecanismo neuroquímico no HL envolvido no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. De fato, nós observamos que o antagonismo dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL diminuiu a resposta taquicárdica durante uma sessão aguda de estresse de restrição, o que indica uma influência facilitatória da neurotransmissão CRFérgica do HL nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo. O efeito similar dos dois tratamentos farmacológicos não parece ser devido a ausência de seletividade dos antagonistas, uma vez que um estudo recente do nosso grupo revelou que os mesmos tratamentos farmacológicos foram eficazes em diferenciar os efeitos mediados pelos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL (REIS-SILVA et al., 2021). Desse modo, em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que os receptores CRF₁ e CRF₂ no HL parecem atuar conjuntamente na geração das respostas cardíacas causadas por estímulos aversivos.

Os achados do presente estudo estão de acordo com evidências do envolvimento da neurotransmissão CRFérgica na geração das respostas ao estresse (DEUSSING; CHEN, 2018; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016). Entretanto, estudos prévios identificaram controle similar das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelas neurotransmissões glutamatérgica e CRFérgica em outras estruturas do SNC (e.g., NLET) (ADAMI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2015). Nesse sentido, o efeito oposto dos antagonistas dos receptores CRF (isto é, diminuição da resposta) em relação àquele reportado previamente em animais tratados com um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA no HL (isto é, aumento da resposta) (Deolindo et al, 2013) sobre a resposta taquicárdica ao estresse de restrição foi inesperado e contrariou nossa hipótese inicial, uma vez que os receptores CRF₁ e CRF₂ atuam principalmente via proteína Gs causando efeitos neuronais excitatórios (DEUSSING; CHEN, 2018). Desse modo, devido à sua característica neuromoduladora (DEUSSING; CHEN, 2018), bem como ao efeito semelhante reportado previamente após o tratamento do HL com um antagonista do receptor GABA_A (GOMES-DE-SOUZA et al., 2019), é possível que o controle das respostas cardiovasculares ao

estresse pelos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL seja mediado por uma modulação facilitatória da neurotransmissão GABAérgica local.

Além das células produtoras de aminoácidos excitatórios e inibitórios foram também encontrados dois tipos celulares distintos que produzem orexina e o hormônio concentrador de melanina (do inglês, MCH) no HL, que são neuropeptídios encontrados predominantemente nesse núcleo hipotalâmico (BERTHOUD; MÜNZBERG, 2011; STUBER; WISE, 2016). Neurônios produtores de orexina se projetam para outras áreas hipotalâmicas e regiões autonômicas do tronco cerebral, além de fazer conexão direta com neurônios simpáticos na medula espinhal (CARRIVE, 2017). Além disso, a ativação do receptor CRF₁ foi demonstrado despolarizar neurônios locais produtores de hipocretina / orexina no HL (WINSKY-SOMMERER, 2004). A hipocretina / orexina vem sendo consistentemente demonstrada desempenhar uma influência facilitatória nas respostas cardiovasculares à estímulos aversivos (BEIG; DAMPNEY; CARRIVE, 2015; CARRIVE, 2017; FURLONG et al., 2009; KAYABA et al., 2003). Desse modo, uma outra possibilidade seria que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão “CRFérgica” no LH poderia ser mediado pela ativação pós-sináptica de neurônios locais contendo hipocretina / orexina. Apesar dessas evidências, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos locais relacionados ao controle das respostas cardiovasculares pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL, uma vez que, por exemplo, o tratamento sistêmico com um antagonista do receptor de orexina não afetou as respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição (FURLONG et al., 2009). Por outro lado, apesar do antagonismo dos receptores de MCH ter sido capaz de atenuar a hipertermia evocada por estresse (SMITH et al., 2006, 2009), um papel da MCH nas respostas cardiovasculares ao estresse nunca foi reportado. No entanto, a administração intracerebroventricular de MCH foi capaz de diminuir a PA e a FC em animais não-estressados (MESSINA; OVERTON, 2007), o que sugere que a neurotransmissão “CFRérgica” no HL poderia modular as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição através da inibição dos neurônios HCM locais.

Adicionalmente, é importante ressaltar que foi identificado marcadores de aminoácidos excitatórios e inibitórios em neurônios orexinérgicos e HCMérgicos (STUBER; WISE, 2016), de modo que não podemos descartar a possibilidade de que o controle das respostas cardiovasculares pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL também seja mediada pela liberação desses aminoácidos em estruturas autônomas no tronco cerebral e em neurônios simpáticos na medula espinhal. De qualquer modo, estudos futuros são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos locais relacionados ao controle das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL.

Uma redução progressiva (isto é, habituação) das respostas de ativação do eixo HPA e do sistema simpato-adrenal é bem descrita na literatura em roedores durante a exposição repetida ao mesmo estressor (isto é, estressor homotípico) (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016a). No entanto, a habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição a estressores homotípicos foi menos explorada e é ainda controversa (CRESTANI, 2016b). Nesse sentido, os achados obtidos em nosso estudo estão de acordo com relatos prévios de ausência de habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição repetida ao estresse de restrição (CONTI et al., 2001; DAUBERT et al., 2012; MCDUGALL et al., 2000; STAMP; HERBERT, 1999). Entretanto, o ERR é capaz de promover plasticidade em diversas regiões encefálicas, incluindo o HL (CHAGRA et al., 2011). Desse modo, uma possível alteração da neurotransmissão “CRFérgica” no HL durante a exposição repetida ao estresse de restrição poderia alterar o controle das respostas cardiovasculares a esse estressor por receptores “CRFérgicos” no HL. Entretanto, a sensibilização do controle pelo receptor CRF₁ no HL das respostas de FC e temperatura cutânea da cauda identificada nos animais ERR em relação ao grupo estressado agudamente parece não ser mediada por mudanças na expressão deste receptor, uma vez que observamos que o ERR não afetou os níveis dos receptores CRF₁ ou CRF₂ no LH. Portanto, o efeito da exposição repetida ao estresse de restrição pode estar relacionado a alterações na afinidade do CRF e peptídeos relacionados ao receptor CRF₁ e/ou alterações na sinalização

intracelular. Isso pode ocorrer, por exemplo, via oligomerização, expressão de *splicing* alternativo do receptor CRF₁ e/ou alterações na sinalização intracelular (GRAMMATOPOULOS, 2012; MICHAŁ A ŻMIJEWSKI; SLOMINSKI, 2010; SLATER; YARUR; GYSLING, 2016). Embora haja evidências de que o ERR não afete a expressão de CRF na amígdala (SUTHERLAND et al., 2010b; WISŁOWSKA-STANEK et al., 2016), o efeito em outras estruturas que fornecem aferências CRFérgicas para o LH (por exemplo, NLET) nunca foi relatado (SNYDER; SILBERMAN, 2021). Assim, não podemos excluir a possibilidade de que as alterações no controle do receptor CRF₁ das respostas ao estresse em animais cronicamente estressados sejam mediadas por alterações no conteúdo e liberação de CRF. Portanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos locais relacionados à possível sensibilização do receptor CRF₁ no LH controlando as respostas cardiovasculares ao estresse.

O HL é descrito como parte do circuito encefálico que regula as respostas cardiovasculares ao estresse, conectando estruturas límbicas como o hipocampo, o NLET, o CeA e o PNV a estruturas efetoras no hipotálamo e no tronco cerebral, bem como à neurônios simpáticos na coluna intermediolateral (DEUSSING; CHEN, 2018; MARCINKIEWCZ et al., 2016; MYERS, 2017). Nesse sentido, foram identificadas aferências de neurônios “CRFérgicos” no HL oriundos do CeA (POMRENZE et al., 2015), do NLET (DEUSSING; CHEN, 2018; GIARDINO et al., 2018b) e do PVN (LI et al., 2020). Em conjunto, essas evidências sugerem que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pela neurotransmissão “CRFérgica” do HL reportado no presente estudo seja parte dos circuitos neurais relacionados à modulação das respostas ao estresse por essas estruturas. Nesse sentido, considerando as evidências de que o HL tem um papel inibitório sobre a resposta taquicárdica ao estresse de restrição (DEOLINDO et al., 2013a), uma hipótese seria que a ativação de neurônios “CRFérgicas” no NLET e no CeA inibiria a ativação neuronal no HL, o que facilitaria as respostas cardiovasculares. Essa ideia é suportada por evidências de que a administração de fármacos excitatórios no NLET (por exemplo, NMDA), no qual

poderia ativar neurônios “CRFérgicos” que se projetam para o HL, facilita as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018). O CeA é também relatado como um importante núcleo no controle da função cardiovascular durante estímulos aversivos (ROOZENDAAL; KOOLHAAS; BOHUS, 1991; SAHA, 2005; SANDERS et al., 1994), e estudos mostraram ativação de neurônios produtores de CRF nesse núcleo amigdalóide em animais expostos ao estresse de “jato de ar” (PORTER; HAYWARD, 2011). Esses dados indicam que projeções “CRFérgicas” para o HL oriundas do CeA também poderiam modular as respostas cardiovasculares ao estresse. Apesar dessas evidências, mais estudos são necessários para elucidar o circuito relacionado ao controle das respostas cardiovasculares do estresse pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL.

O controle da função cardiovascular durante ameaças aversivas é mediado pelo sistema nervoso autônomo (CARRIVE, 2006; CRESTANI, 2016a; DOS REIS et al., 2014). Nesse sentido, foi evidenciado que a inibição da atividade simpática cardíaca diminuiu o aumento da FC induzido pelo estresse de restrição, ao passo que o bloqueio do tônus parassimpático para o coração aumenta a taquicardia induzida por esse estímulo aversivo (DOS REIS et al., 2014). Em conjunto, esses resultados sugerem uma co-ativação do sistema nervoso simpático e parassimpático cardíacos durante o estresse de restrição. Nesse sentido, há evidências anatômicas de projeções do HL para regiões do tronco encefálico contendo neurônios parassimpáticos, como o núcleo motor dorsal e o núcleo ambíguo (LUITEN; TER HORST; STEFFENS, 1987; TER HORST; LUITEN; KUIPERS, 1984), e estudos prévios indicaram que o controle inibitório da resposta de FC ao estresse de restrição pelo receptor glutamatérgico NMDA no HL foi mediado por uma facilitação do tônus parassimpático para o coração (DEOLINDO et al., 2013b). Portanto, a influência facilitatória dos receptores CRF no HL na taquicardia evocada pela restrição pode ser mediada pela inibição de mecanismos facilitatórios para neurônios parassimpáticos no tronco encefálico. No entanto, considerando que o HL se conecta direta, e indiretamente via regiões na porção ventrolateral do bulbo, à neurônios simpáticos na coluna intermediolateral (ALLEN; CECHETTO, 1992; SAPER et

al., 1976a), não podemos excluir a possibilidade de que o controle pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL seja mediado pela ativação de mecanismo excitatório para os neurônios simpáticos.

6.2. Neurotransmissão CRFérgica no HL e a resposta comportamental do tipo ansiogênica ao estresse de restrição

O LCE é um modelo animal bem consolidado na literatura utilizado para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; WALF; FRYE, 2007). De fato, a administração de fármacos utilizados na clínica para o tratamento de transtornos de ansiedade (isto é, ansiolíticos) provoca um aumento na exploração dos braços abertos do LCE em roedores (PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986). Adicionalmente, já foi evidenciado que estímulos aversivos produzem um efeito ansiogênico (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; WALF; FRYE, 2007). Nesse sentido, diversos estudos mostraram que um sessão aguda de estresse de restrição é capaz de promover a diminuição da exploração dos braços abertos do LCE, o que sugere um efeito do tipo ansiogênico (CAMPOS et al., 2010; GOMES-DE-SOUZA et al., 2021; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; REIS et al., 2011). Esses achados suportam os dados reportados no presente estudo, em que foi observado uma redução da exploração dos braços abertos do LCE em animais tratados com veículo no HL e expostos a uma sessão aguda de estresse de restrição.

O papel do HL no controle de comportamentos relacionados à ansiedade vem sendo explorado (HAKVOORT SCHWERDTFEGER; MENARD, 2008b; HSU et al., 2007; JIMENEZ et al., 2018; SALOMÉ et al., 2004) e nossos achados indicam que a ativação de receptores CRF₁ e CRF₂ no HL estão envolvidos na etiologia da resposta ansiogênica induzida por estímulos aversivos agudos. Esses achados estão de acordo com evidências do envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” na geração das respostas comportamentais relacionadas à ansiedade induzidas pelo estresse (DEUSSING; CHEN, 2018; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016). Assim como discutido acima com relação ao controle das

respostas cardiovasculares, o envolvimento dos receptores CRFérgicos do HL na resposta ansiogênia a esse estressor também parece ser mediado por uma interação com neurotransmissão inibitória local. De fato, foi observado que a inibição química de neurônios do HL com muscimol (agonista do receptor GABA_A) reduziu o tempo exploração dos braços abertos do LCE em animais não-estressados (HAKVOORT SCHWERDTFEGER; MENARD, 2008a), o que sugere um efeito ansiogênico decorrente da inibição neuronal no HL. Esses resultados indicam que a geração da resposta ansiogênica ao estresse pelos receptores CRF no HL parece ser mediada pela inibição de neurônios locais, possivelmente via facilitação da neurotransmissão GABAérgica local. Entretanto, estudos adicionais são necessários para exploração dos mecanismos relacionados com o controle da resposta ansiogênica ao estresse pela neurotransmissão “CRFérgica” no HL.

Com relação à exposição crônica a estímulos aversivos, os dados da literatura sobre o perfil de comportamentos relacionados à ansiedade evocado pelo estresse de restrição repetido são controversos. Dados mostraram que um protocolo de ERR de 14 dias com sessões diárias de duas horas promoveu diminuição da exploração dos braços abertos do LCE (avaliado dois dias após a última sessão de estresse) em camundongos, o que evidenciou um efeito do tipo ansiogênico (KIM; LEEM, 2014). No entanto, foi relatado que sessões diárias de duas horas de estresse de restrição por sete dias aumentou a exploração dos braços abertos do LCE (avaliado dois dias após a última sessão de estresse), o que indica um efeito ansiolítico (SADLER; BAILEY, 2016). Porém, cabe salientar que esse mesmo estudo não identificou alterações comportamentais no LCE nos animais expostos a três ou 14 dias de estresse de restrição (SADLER; BAILEY, 2016). Estudos em ratos evidenciaram que a exposição a sessões diárias de duas horas de estresse de restrição por sete ou de uma hora por 10 ou 50 dias não causaram alterações comportamentais no LCE (NOSCHANG et al., 2009; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; VIEIRA et al., 2018). Entretanto, efeito ansiogênico foi identificado em ratos sujeitos a sessões diárias de seis horas de restrição por sete ou 21 dias (BOWMAN et al., 2009; HUYNH et al., 2011), o que indica que longas

sessões diárias de restrição são necessárias para o desencadeamento de alterações comportamentais no LCE em ratos. Em conjunto, essas evidências sugerem que o perfil de resposta comportamental no LCE causada pela exposição repetida ao estresse de restrição depende do número e da duração das sessões de estresse e da espécie. Desse modo, os dados reportados no presente estudo reproduziram evidências prévias do nosso grupo obtidas em ratos em que a exposição repetida a sessões de uma hora de estresse de restrição por 10 dias não causa alterações comportamentais no LCE (VIEIRA et al., 2018). Como discutido acima, é bem documentado na literatura a habituação das respostas neuroendócrinas durante a exposição repetida ao mesmo estressor, incluindo o estresse de restrição (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016a). Nesse sentido, o desaparecimento do efeito ansiogênico no LCE observado após a sessão aguda quando os animais foram submetidos a exposição repetida ao estresse de restrição pode ser consequência da habituação ao estressor homotípico.

Apesar dos efeitos de estressores crônicos sobre a neurotransmissão CRFérgica no HL ser pouco compreendida, alterações nesse mecanismo neuroquímico foram reportadas em outras estruturas do SNC (ANISMAN et al., 2007; LAN et al., 2015; MAKINO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2020; WISŁOWSKA-STANEK et al., 2016). Nesse sentido, cabe destacar que o desaparecimento do efeito ansiogênico do estresse de restrição agudo quando os animais foram expostos repetidamente ao estressor foi acompanhado também pela perda do efeito dos tratamentos farmacológicos do HL com os antagonistas dos receptores CRF. De fato, nós observamos que o tratamento do HL com CP376395 ou ASV-30 não alterou o comportamento no LCE após a 10ª sessão de estresse de restrição. Como afirmado acima, o desaparecimento da mudança comportamental no LCE observada em animais após a 10ª sessão de estresse de restrição indica uma habituação do efeito do tipo ansiogênico evocado pela restrição. Nesse sentido, a ausência de efeito dos tratamentos farmacológicos do HL em animais cronicamente estressados indica que os receptores “CRFérgicos” no HL não estão envolvidos na habituação das respostas comportamentais ao estresse de contenção. No

entanto, a sensibilização da sinalização do receptor CRF₁ discutida acima pode ser um contra-regulador para o processo de habituação da resposta comportamental relacionada a ansiedade. Nesse sentido, seria de se esperar que o tratamento com HL com CP376395 aumentasse a exploração de braços abertos do LCE em animais cronicamente estressados. Portanto, o impacto diferente do antagonismo do receptor CRF₁ no HL nas respostas cardiovasculares e comportamentais em ratos cronicamente estressados fornece evidências iniciais de que o controle dessas respostas pelo LH pode ser mediado pela interação do HL com redes cerebrais centrais independentes. Nesse sentido, além do envolvimento no controle das respostas cardiovasculares ao estresse (*ver sessão 6.1*), neurônios MCH no HL também vem sendo descrito como um importante mecanismo neuroquímico envolvido no controle de comportamentos relacionados à ansiedade (BOROWSKY et al., 2002) e na resposta ansiogênica induzida pelo estresse (CHAKI et al., 2005). Porém, foi demonstrado que o efeito ansiogênico do estresse de restrição repetido em camundongos foi acompanhado de aumento na expressão de MCH no HL, e o antagonismo de seus receptores inibiu o efeito ansiogênico do estresse de restrição repetido (KIM; HAN, 2016). Desse modo, um eventual envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do HL na habituação da resposta ansiogênica durante a exposição repetida ao estresse de restrição parece ser independente de neurônios MCHérgicos locais.

6.3. Neurotransmissão “CRFérgica” no HL e as alterações cardiovasculares desencadeadas pelo ECV

O papel do HL no controle do barorreflexo através da abordagem farmacológica (insusão de drogas vasoativas) em animais não-anestesiados foi descrito previamente por Crestani e colaboradores (2009), em que os autores reportaram que a inativação reversiva desse núcleo hipotalâmico com o bloqueador sináptico não-seletivo CoCl₂ diminuiu a bradicardia reflexa causada pelo aumento da pressão arterial, mas sem afetar a resposta taquicárdica causada pela redução da pressão arterial. Além disso, esse efeito foi mimetizado

pelo tratamento do HL com um antagonista dos receptores não-NMDA, indicando que esse mecanismo excitatório está envolvido no controle das respostas barorreflexas durante o aumento da pressão arterial (CRESTANI et al., 2009a). Além da neurotransmissão glutamatérgica, dados da literatura mostram o envolvimento de outros mecanismos neuroquímicos envolvidos no controle do barorreflexo. Nesse sentido, apesar de dados da literatura indicarem que a neurotransmissão CRFérgica no HL não está envolvida no controle das respostas barorreflexas em animais não-estressados usando a abordagem farmacológica, foi observado uma influência fáclitatória dos receptores CRF₁ e inibitória dos receptores CRF₂ do HL no controle das respostas barorreflexas quando analisada pelo método da sequência (REIS-SILVA et al., 2021).

As evidências obtidas no estudo de Reis-Silva et al, 2021 vão de encontro com os dados obtidos no presente trabalho. De fato, nós observamos que o tratamento do HL com CP376395 ou ASV-30 na dose de 0,01nmol não provocou alterações em nenhum dos parâmetros da atividade barorreflexa avaliada usando a abordagem farmacológica em animias não-estressados. Por outro lado, quando utilizado o método da sequência nossos dados sugerem que os receptores CRF₂ no HL tem papel inibitório no controle de respostas cardíacas reflexas durante variações espontâneas de pressão arterial. Entretanto, nossos dados não evidenciaram um influência dos receptores CRF₁ no controle do barorreflexo espontâneo em animais não estressados. Essa diferença observada entre os dois trabalhos pode ser explicada pela pequena difereça no local de injeção das drogas, pois o HL é região que apresenta diferentes populações de neurônios ao longo do eixo antero-posterior e os efeitos cardiovasculares da administração de CRF no HL apresenta respostas que variam de acordo com o local do tratamento (DIAMANT et al., 1992). Apesar disso, assim como observado por Reis-Silva e colaboradores (2021), nossos dados suportam os achados de que a neurotransmissão CRFérgica no HL modula seletivamente o barorreflexo espontâneo em animais não-estressados. Nesse sentido, alguns achados sugerem que diferentes circuitos estão envolvidos na geração de respostas reflexas durante variações espontâneas e mudanças

mais pronunciadas na pressão arterial (CRESTANI, 2016a). Por exemplo, foi relatado uma influência do PVN no controle da função do barorreflexo quando investigado utilizando uma abordagem farmacológica (CRESTANI et al., 2010b), mas não no controle sobre o barorreflexo espontâneo (DE ANDRADE et al., 2014).

Além do papel da neurotransmissão “CRFérgica” no HL no controle do barorreflexo em animais não-estressados, nós avaliamos seu papel em animais submetidos ao protocolo de ECV. A exposição crônica a estressores heterotípicos está relacionada com disfunções cardiovasculares (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002, 2008a). De fato, o protocolo de ECV utilizado nesse estudo provocou uma disfunção do barorreflexo quando avaliado pelo método farmacológico, corroborando com os dados da literatura e do nosso grupo (ALMEIDA et al., 2015; COSTA-FERREIRA et al., 2016; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2008b). Mais especificamente, nós observamos que o estresse provocou uma diminuição do P1, P2, ΔP e do ganho da função barorreflexa avaliada por meio da abordagem farmacológica, o que indica um prejuízo das respostas reflexas durante aumento e redução da pressão arterial. A atividade barorreflexa avaliada por meio da técnica de sequência não indicou efeito do ECV em nenhum dos parâmetros avaliados. Nossos achados são suportados por evidências prévias de que estressores crônicos parecem afetar de maneira diferente respostas reflexas durante variações fisiológicas ou pronunciadas da pressão arterial (CRESTANI, 2016a). Por exemplo, foi reportado que o ERR causou alterações na atividade barorreflexa avaliada pelo método farmacológico (CONTI et al., 2001; DUARTE et al., 2015; PORTER et al., 2004)), mas sem afetar as respostas durante variações fisiológicas da pressão arterial (DAUBERT et al., 2012; DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015). Como discutido acima, alguns achados indicam que circuitos independentes parecem estar envolvidos nas respostas reflexas geradas por variações fisiológicas ou pronunciadas da pressão arterial, o que pode explicar a diferença no impacto de estressores crônicos nessas respostas.

Diferentemente dos dados obtidos com a microinjeção de CP376395 no HL de animais não-estressados, em que o antagonismo do receptor CRF₁ no HL não afetou as respostas barorreflexas avaliadas pelo método farmacológico, nós identificamos que o tratamento do HL com CP376395 inibiu todas as alterações da atividade barorreflexa causadas pelo ECV. Apesar dos efeitos do CP376395 terem sido mais pronunciados ao reverter todas as alterações causadas pelo ECV, o tratamento do HL com ASV-30 também foi capaz de reverter a redução no parâmetro ganho da curva barorreflexa causada pelo ECV, o que sugere um envolvimento de receptores CRF₂ do HL. As diferenças de efeito observada entre os receptores CRF₁ e CRF₂ em animais cronicamente estressados indicam que eles podem estar distribuídos de maneira heterogênea entre as populações de neurônios do HL que regulam a atividade barorreflexa, de modo que os receptores CRF₁ parecem estar presente de maneira maior nos circuitos afetados pelo ECV. Nesse sentido, nossos achados da análise de expressão dos receptores CRFérgicos indicam que o envolvimento dos receptores CRF₂ do HL parece estar relacionado com um aumento na expressão desses receptores. Os achados de alteração na expressão do receptor CRF₂ são suportados por dados prévios de que o ECV é capaz de provocar alterações da expressão de receptores CRFérgicos em regiões relacionadas ao controle cardiovascular ao estresse (OLIVEIRA et al., 2021; VENTURA-SILVA et al., 2012), o que inclui aumento de mRNA para o receptor CRF₂ em nos núcleos septal e ventromedial do hipotálamo (MALTA et al., 2021). Por outro lado, assim como discutido acima com relação ao efeito do ERR no controle das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição pelo receptor CRF₁, a evidência de ausência de alteração na expressão do receptor CRF₁ nos animais expostos ao ECV indica que o envolvimento desse receptor nas alteração da atividade barorreflexa ao ECV parecem estar relacionadas com um efeito desse estressor crônico na afinidade do CRF e peptídeos relacionados ao receptor CRF₁ e/ou alterações na sinalização intracelular, que podem ocorrer via oligomerização, expressão de *splicing* alternativo do receptor CRF₁ e/ou alterações na

sinalização intracelular (GRAMMATOPOULOS, 2012; MICHAŁ A ŻMIJEWSKI; SLOMINSKI, 2010; SLATER; YARUR; GYSLING, 2016)

Além do comprometimento da função barorreflexa, o ECV está relacionado com alterações nos parâmetros cardiovasculares basais, como por exemplo aumento da PAM. De fato, estudos prévios, incluindo resultados do nosso grupo (DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015; OLIVEIRA et al., 2021), mostraram que animais submetidos ao ECV apresentaram um aumento da PAM (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002, 2008a). Em concordância com essas evidências, nós observamos no presente estudo que o protocolo de ECV provocou um aumento da PAM basal, sem aumento da FC basal. Estudos mostram que o desenvolvimento e a progressão da hipertensão está relacionada com o comprometimento da atividade do barorreflexo (CHAPLEAU et al., 2012; GRASSI et al., 2006). Desse modo, o aumento na pressão arterial induzido pelo ECV poderia estar relacionado com o prejuízo da atividade barorreflexa. No entanto, a evidência do presente estudo de que o tratamento do HL com os antagonistas de receptores CRFérgicos foi efetivo em reverter as alterações na atividade barorreflexa, porém sem influenciar o aumento da pressão arterial causado pelo ECV sugere que essas respostas parecem ocorrer por mecanismos independentes. Nesse sentido, nossos dados sugerem que a neurotransmissão CRFérgica presente no HL não está envolvida no efeito do ECV sobre a pressão arterial basal.

O aumento da atividade simpática pode também estar relacionado com a disfunção do barorreflexo (GRASSI et al., 2004). Nesse sentido, nesse estudo nós também realizamos a análise de variabilidade do IP, no qual fornece informações acerca da atividade autônoma agindo no coração (MALIK et al., 1996). É descrito que o ECV provoca um desbalanço da atividade autônoma cardíaca, de modo a aumentar a contribuição simpática (GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002). Entretanto, os dados obtidos nesse trabalho não evidenciaram efeito do ECV em nenhum dos parâmetros de variabilidade cardíaca analisados pela análise de variabilidade do IP. Entretanto, apesar das alterações da atividade autônoma não tenham sido detectadas pela análise de variabilidade, não podemos descartar

que o ECV esteja influenciando a atividade autônoma dos animais nesse estudo uma vez que não foi realizada a avaliação desse parâmetro pelo método farmacológico, através da infusão de metilatropina e propanol. Nesse sentido, a análise de variabilidade é sensível a interferências no sinal de IP, de modo que o tratamento farmacológico prévio do HL pode ter influenciado a análise. Desse modo, estudos futuros serão necessários para investigar um envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do HL nas alterações da atividade autônoma causadas pelo ECV.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apresentados nesse estudo evidenciam um envolvimento da neurotransmissão “CRFérgica” do HL no controle das respostas cardiovasculares e de respostas comportamentais do tipo ansiogênica desencadeadas por ameaças aversivas, bem como em disfunções da atividade barorreflexa causadas por estressores crônicos. Especificamente, os nossos achados fornecem evidências de que os receptores CRF₁ e CRF₂ no HL parecem agir de maneira sinérgica na geração da resposta de taquicardia durante o estresse de restrição; e esse controle não é afetado pela exposição repetida prévia a esse estressor. Além disso, os dados do presente estudo fornecem evidências de que os receptores CRF₁ e CRF₂ no HL estão envolvidos na geração da resposta comportamental do tipo ansiogênica induzida por uma sessão aguda de estresse de restrição. Os dados também indicam uma participação dos receptores CRF₁ e CRF₂ no HL na disfunção da atividade barorreflexa induzidas pelo ECV, de modo que o envolvimento do receptor CRF₂ parece estar relacionado com um aumento na expressão local desse receptor no HL.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMI, M. B. et al. Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Journal of Psychopharmacology**, 2017.
- ALLEN, G. V.; CECHETTO, D. F. Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area: I. Descending projections. **The Journal of comparative neurology**, v. 315, n. 3, p. 313–32, jan. 1992.
- 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**, v. 330, n. 3, p. 421–438, 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**, v. 18, n. 4, p. 462–474, 4 jul. 2015.
- ANISMAN, H. et al. Corticotropin releasing hormone receptor alterations elicited by acute and chronic unpredictable stressor challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. **Behavioural Brain Research**, 2007.
- BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF AND CRF RECEPTORS : Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 525–557, 2004.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. **Preclinical experimental stress studies: Protocols, assessment and comparison**. **European Journal of Pharmacology**, 2015.
- BARONE, F. C. et al. Afferent connections to the lateral hypothalamus: A horseradish peroxidase study in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 7, n. 1, p. 75–88, 1981.
- BARRETTO-DE-SOUZA, L. et al. Dual role of nitrenergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in controlling cardiovascular responses to emotional stress in rats. **British Journal of Pharmacology**, 2018.
- BEHAN, D. P. et al. Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: A novel regulator of CRF and related peptides. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 1995.
- BEIG, M. I.; DAMPNEY, B. W.; CARRIVE, P. Both Ox1r and Ox2r orexin receptors contribute to the cardiovascular and locomotor components of the novelty stress response in the rat. **Neuropharmacology**, 2015.
- BENINI, R. et al. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, 2019.
- BENINI, R. et al. Habituation of the cardiovascular response to restraint stress is inhibited by exposure to other stressor stimuli and exercise training. **Journal of Experimental Biology**, 2020.
- BERTHOUD, H. R.; MÜNZBERG, H. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: From electrical self-stimulation to opto-genetics. **Physiology and Behavior**, 2011.
- 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.
- BOROWSKY, B. et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nature Medicine**, v. 8, n. 8, p. 825–830, 2002.

BOWMAN, R. E. et al. Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 21–29, 2009.

BRISKI, K.; GILLEN, E. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. **Brain Research Bulletin**, 2001.

BROOKS, S. D. et al. Protection from chronic stress-and depressive symptom-induced vascular endothelial dysfunction in female rats is abolished by preexisting metabolic disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 314, p. 1085–1097, 2018.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1611–22, nov. 2013.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFISKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1089–1098, 2009.

CAMPOS, A. C. et al. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 238–246, 2010.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, 2013.

CANTERAS, N. S. **Chapter 3.2 Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. Handbook of Behavioral Neuroscience**, 2008.

CARNEVALI, L. et al. Rodent models of depression-cardiovascular comorbidity: Bridging the known to the new. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 144–153, 2017.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. **Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews. Anais...*2005.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 33, n. 12, p. 1251–4, dez. 2006.

CARRIVE, P. **Orexin, Stress and Central Cardiovascular Control. A Link with Hypertension?** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2017.

CARRIVE, P.; GORISSEN, M. Premotor sympathetic neurons of conditioned fear in the rat. **European Journal of Neuroscience**, 2008.

CHAGRA, S. L. et al. Acute and repeated restraint differentially activate orexigenic pathways in the rat hypothalamus. **Regulatory Peptides**, v. 167, n. 1, p. 70–78, 2011.

CHAKI, S. et al. Anxiolytic- and antidepressant-like profile of ATC0065 and ATC0175: Nonpeptidic and orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 2, p. 831–839, 2005.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; DE SOUZA, E. B. 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**, v. 15, n. 10, p. 6340–50, 1995.

CONTI, L. H. et al. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: Role of corticotropin-releasing factor. **Neuropeptides**, v. 35, n. 2, p. 71–81, 2001.

COSTA-FERREIRA, W.; GOMES-DE-SOUZA, L.; CRESTANI, C. C. Role of angiotensin receptors in the medial amygdaloid nucleus in autonomic, baroreflex and cardiovascular changes evoked by chronic stress in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 763–777, 1 fev. 2021.

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

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**, v. 36, n. 11, p. 1079–1085, 2009a.

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 (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, n. 3, p. 268–78, 2009b.

CRESTANI, C. C. et al. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**, v. 13, n. 1, p. 61–72, 2010a.

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**, v. 67, n. 4, p. 317–26, ago. 2010b.

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. June, 2016a.

CRESTANI, C. C. **Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: A review of the influence of stress type.** **Frontiers in Physiology**, 2016b.

CULLINAN, W. E. et al. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 477–505, 1995.

DAMPNEY, R. A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 5, p. R429–R443, 2015a.

DAMPNEY, R. A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 5, p. R429–R443, 2015b.

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

DAUBERT, D. L. et al. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. **The Journal of physiology**, v. 590, n. Pt 19, p. 4881–95, out. 2012.

DE ANDRADE, O. 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**, v. 558, p. 1–7, 13 jan. 2014.

DE SOUZA, E. B. et al. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 3189–3203, 1985.

DEDIC, N.; CHEN, A.; DEUSSING, J. M. The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. p. 4–31, 2018.

- 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**, v. 38, n. 3, p. 2374–2381, 2013a.
- 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. **The European journal of neuroscience**, v. 38, n. 3, p. 2374–81, ago. 2013b.
- 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. **The European journal of neuroscience**, v. 38, n. 3, p. 2374–81, ago. 2013c.
- DEUSSING, J. M.; CHEN, A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 4, p. 2225–2286, 1 out. 2018.
- DIAMANT, M. et al. Corticotropin-Releasing Factor Induces Differential Behavioral and Cardiovascular Effects After Intracerebroventricular and Lateral Hypothalamic Perifornical Injections in Rats. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 5, p. 750–760, 1992.
- DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Organization of Axonal Projections from the Anterolateral Area of the Bed Nuclei of the Stria Terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 2, p. 277–298, 2004.
- DOS REIS, D. G. et al. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 17, n. 4, p. 362–72, jul. 2014.
- DUARTE, J. O. et al. Stress vulnerability during adolescence: Comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, n. 2, p. 186–199, 20 fev. 2015.
- DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 52–59, 2015.
- F. PHELIX, C.; LIPOSITS, Z.; WILLIS, K. P. Catecholamine-CRF synaptic interaction in a septal bed nucleus: Afferents of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Research Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 109–119, 1994.
- FONTES, M. A. P. et al. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. **Neuroscience**, v. 184, p. 64–74, 2011.
- FURLONG, T. M. et al. Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. **European Journal of Neuroscience**, 2009.
- FURLONG, T. M. et al. The effect of air puff stress on c-Fos expression in rat hypothalamus and brainstem: Central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 9, p. 1429–1438, 2014.
- GAO, H. R.; GAO, H. Y. **Cardiovascular functions of central corticotropin-releasing factor related peptides system. Neuropeptides**, 2019.
- GIARDINO, L.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; CECCATELLI, S. CRH-R1 mRNA expression in two strains of inbred mice and its regulation after repeated restraint stress. **Molecular Brain Research**, v. 40, n. 2, p. 310–314, 1996.
- GIARDINO, W. J. et al. Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. **Nature Neuroscience**, 2018a.

GIARDINO, W. J. et al. Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 1084–1095, 2018b.

GLASSMAN, A. H. Depression and cardiovascular comorbidity. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 9–17, 2007.

GOLBIDI, S.; FRISBEE, J. C.; LAHER, I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 12, p. H1476–H1498, 2015.

GOMES-DE-SOUZA, L. et al. GABA A but not GABA B receptors in the lateral hypothalamus modulate the tachycardic response to emotional stress in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 5, p. 672–680, 2019.

GOMES-DE-SOUZA, L. et al. CB1 and CB2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis differently modulate anxiety-like behaviors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 110, n. October 2020, 2021.

GOUVEIA, M. K. et al. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 379–388, 2016.

GRAMMATOPOULOS, D. K. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 85, maio 2012.

GRASSI, G. et al. **Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias** *Journal of Hypertension*. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2004. Disponível em: <<http://journals.lww.com/jhypertension>>.

GRASSI, G. et al. Baroreflex Function in Hypertension: Consequences for Antihypertensive Therapy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 48, n. 6, p. 407–415, maio 2006.

GRIEBEL, G. et al. 4-(2-chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor1 receptor antagonist. II. Charact. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2002.

GRIPPO, A. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: The value of neurobiological and behavioral research with animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2009.

GRIPPO, A. J. et al. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 4, p. 309–316, 15 fev. 2006.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 5, p. R1333–R1341, 2002.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosomatic Medicine**, v. 70, n. 4, p. 435–443, 2008a.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosomatic Medicine**, v. 70, n. 4, p. 435–443, maio 2008b.

GRISSOM, N.; BHATNAGAR, S. Habituation to repeated stress: Get used to it. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2009.

HAKVOORT SCHWERDTFEGER, R. M.; MENARD, J. L. The lateral hypothalamus and anterior hypothalamic nucleus differentially contribute to rats' defensive responses in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 4–5, p. 697–705, 2008a.

HAKVOORT SCHWERDTFEGER, R. M.; MENARD, J. L. The lateral hypothalamus and anterior hypothalamic nucleus differentially contribute to rats' defensive responses in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 4–5, p. 697–705, 2008b.

HARE, D. L. et al. **Depression and cardiovascular disease: A clinical review. European Heart Journal**, 2014.

HARRIS, R. B. S. et al. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. **Hormones and Behavior**, v. 49, n. 5, p. 615–625, 2006.

HARRIS, R. B. S. Repeated restraint stress lowers the threshold for response to third ventricle CRF administration. **Hormones and Behavior**, v. 89, p. 64–68, 2017.

HAUGER, R. L. et al. International Union of Pharmacology . XXXVI . Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotropin-Releasing Factor and Their Ligands. v. 55, n. 1, p. 21–26, 2003.

HEINRICHS, S. C. et al. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. **Brain Research**, v. 581, n. 2, p. 190–197, 1992.

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**, v. 17, n. 10, p. 636–651, 2016.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2013.

HORJALES-ARAUJO, E.; HELLYSAZ, A.; BROBERGER, C. Lateral hypothalamic thyrotropin-releasing hormone neurons: Distribution and relationship to histochemically defined cell populations in the rat. **Neuroscience**, v. 277, p. 87–102, 2014.

HSU, H. R. et al. Acute effects of nicotine on restraint stress-induced anxiety-like behavior, c-Fos expression, and corticosterone release in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 566, n. 1–3, p. 124–131, 2007.

HUYNH, T. N. et al. Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 212–222, 2011.

ITO, N. et al. A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of kososan, a kampo medicine, via the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2009.

IWATA, J.; LEDOUX, J. E.; REIS, D. J. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. **Brain Research**, v. 368, n. 1, p. 161–166, 1986.

JAGGI, A. S. et al. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. **Neurological Sciences**, v. 32, n. 6, p. 993–1005, 2011.

JIMENEZ, J. C. et al. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. **Neuron**, v. 97, n. 3, p. 670–683.e6, 2018.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. **The neuro-symphony of stress. Nature Reviews Neuroscience**, 2009.

- JONES, K. R.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 2, p. 266–71, ago. 2011.
- KAYABA, Y. et al. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 2003.
- KIM, M. H.; LEEM, Y. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 97–104, 2014.
- KIM, S. J. et al. Effects of repeated tianeptine treatment on CRF mRNA expression in non-stressed and chronic mild stress-exposed rats. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 7, p. 824–833, 2006.
- KIM, T. K.; HAN, P. L. Physical exercise counteracts stress-induced upregulation of melanin-concentrating hormone in the brain and stress-induced persisting anxiety-like behaviors. **Experimental Neurobiology**, v. 25, n. 4, p. 163–173, 2016.
- KOOB, G. F.; HEINRICHS, S. C. **A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors.** **Brain Research**, 1999.
- KORTE, S. M.; DE BOER, S. F. **A robust animal model of state anxiety: Fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze.** **European Journal of Pharmacology**, 2003.
- LAN, N. et al. Exposure to Chronic Mild Stress Differentially Alters Corticotropin-Releasing Hormone and Arginine Vasopressin mRNA Expression in the Stress-Responsive Neurocircuitry of Male and Female Rats Prenatally Exposed to Alcohol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 39, n. 12, p. 2414–2421, 2015.
- LEDOUX, J. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 2517–2529, 1988.
- LENGLOS, C. et al. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. **Genes, Brain and Behavior**, 2013.
- LI, S.-B. et al. **Hypothalamic circuitry underlying stress-induced insomnia and peripheral immunosuppression.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.
- LIEBSCH, G. et al. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. **Regulatory Peptides**, 1995.
- LIN, D. et al. Exposure to chronic mild stress alters thresholds for lateral hypothalamic stimulation reward and subsequent responsiveness to amphetamine. **Neuroscience**, 2002.
- LUITEN, P. G. M.; TER HORST, G. J.; STEFFENS, A. B. The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. **Progress in Neurobiology**, v. 28, n. 1, p. 1–54, jan. 1987.
- MAKINO, S. et al. Decreased type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during repeated immobilization stress. **Neuroendocrinology**, 1999.
- MALIK, M. et al. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–1065, 1 mar. 1996.

- MALTA, M. B. et al. Norepinephrine and Glucocorticoids Modulate Chronic Unpredictable Stress-Induced Increase in the Type 2 CRF and Glucocorticoid Receptors in Brain Structures Related to the HPA Axis Activation. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 10, p. 4871–4885, 1 out. 2021.
- MARCINKIEWCZ, C. A. et al. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 97–101, 24 set. 2016.
- MARIN, M. T. et al. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **The European journal of neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 1931–40, nov. 2009.
- MCCARTY, R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. **Stress**, 2016a.
- MCCARTY, R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. **Stress**, v. 19, n. 5, p. 449–475, 2 set. 2016b.
- MCDUGALL, S. J. et al. Restraint Stress:Differential Cardiovascular Responses in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, 2000.
- MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873–904, 2007.
- MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic Stress**, v. 1, p. 247054701769232, 2017.
- MENZAGHI, F. et al. Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 1994.
- MESSINA, M. M.; OVERTON, J. M. Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. **Regulatory Peptides**, 2007.
- MICHAŁ A ŻMIJEWSKI; SLOMINSKI, A. T. **Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling HPA AxIs**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.actabp.pl>.
- MORIMOTO, A. et al. The central role of corticotrophin-releasing factor (CRF-41) in psychological stress in rats. **The Journal of Physiology**, 1993.
- MOTTA, S. C.; CANTERAS, N. S. Restraint stress and social defeat: What they have in common. **Physiology and Behavior**, v. 146, p. 105–110, 2015.
- MYERS, B. et al. Central stress-integrative circuits: Forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Structure and Function**, 2014.
- MYERS, B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. **Physiology and Behavior**, v. 172, p. 49–59, 2017.
- NAKAMORI, T.; MORIMOTO, A.; MURAKAMI, N. Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 β . **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 1993.
- NAKAMORI, T.; MORIMOTO, A.; MURAKAMI, N. Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 beta. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 265, n. 4, p. R834–R839, 2017.
- NIJSEN, M. J. M. A. et al. Endogenous corticotropin-releasing hormone inhibits conditioned-fear-induced vagal activation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 389, n. 1, p. 89–98, 2000.

- NIJSEN, M. J. M. A. et al. CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2001.
- NOSCHANG, C. G. et al. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 63–69, 2009.
- OLIVEIRA, L. A. et al. CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Pharmacological Research**, v. 95–96, p. 1–10, 2015.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Both CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of stria terminalis are involved in baroreflex impairment evoked by chronic stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 01, n. March, p. 110009, 2020.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Both CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of stria terminalis are involved in baroreflex impairment evoked by chronic stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 105, n. June 2020, 2021.
- OSTRANDER, M. M. et al. Chronic stress produces enduring decreases in novel stress-evoked c-fos mRNA expression in discrete brain regions of the rat. **Stress**, v. 12, n. 6, p. 469–477, 2009.
- OWENS-FRENCH, J. et al. Lateral hypothalamic galanin neurons are activated by stress and blunt anxiety-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 423, p. 113773, 2022.
- PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 79–83, 2000.
- 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**, v. 21, n. 4, p. 341–356, 2001.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525–529, 1986.
- PETT, K. V. A. N. et al. Distribution of mRNAs Encoding CRF Receptors in Brain and Pituitary of Rat and Mouse. v. 212, n. May, p. 191–212, 2000.
- POMRENZE, M. B. et al. A transgenic rat for investigating the anatomy and function of corticotrophin releasing factor circuits. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. DEC, p. 1–14, 2015.
- PORTER, J. P. et al. Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. **Life Sciences**, v. 75, n. 13, p. 1595–1607, 2004.
- PORTER, K.; HAYWARD, L. F. Stress-induced changes in c-Fos and corticotropin releasing hormone immunoreactivity in the amygdala of the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Brain Research**, v. 216, n. 2, p. 543–551, 2011.
- RAMAEKERS, D. et al. **Cardiovascular Autonomic Function in Conscious Rats: A Novel Approach to Facilitate Stationary Conditions**. [s.l: s.n.].
- REIS, D. G. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

- REIS-SILVA, L. L. et al. CRF1 and CRF2 receptors in the lateral hypothalamus differently modulate the baroreflex function in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1751, n. November 2020, p. 147195, 2021.
- REUL, J. M.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 23–33, 2002.
- RIENZO, M. DI et al. **Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life** *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ajpregu.org>>.
- RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. **Connections of the rat lateral septal complex**. **Brain Research Reviews**, 1997.
- ROOZENDAAL, B.; KOOLHAAS, J. M.; BOHUS, B. Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats. **Physiology and Behavior**, 1991.
- ROSINGER, Z. J. et al. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor 1 in the developing mouse forebrain: A novel sex difference revealed in the rostral periventricular hypothalamus. **Neuroscience**, 2017.
- ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation**, v. 99, n. 16, p. 2192–2217, 1999.
- SADLER, A. M.; BAILEY, S. J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. **Physiology and Behavior**, v. 167, p. 313–323, 2016.
- SAHA, S. **Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: Descending pathways to medullary cardiovascular nuclei**. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. **Anais...**2005.
- SALOMÉ, N. et al. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): Differential Fos expression in HAB and LAB rats. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 715–723, 2004.
- SANDERS, B. J. et al. Central amygdaloid lesions attenuate cardiovascular responses to acute stress in rats with borderline hypertension. **Physiology and Behavior**, 1994.
- SANTIBAÑEZ, M.; GYSLING, K.; FORRAY, M. I. Desipramine prevents the sustained increase in corticotropin-releasing hormone-like immunoreactivity induced by repeated immobilization stress in the rat central extended amygdala. **Journal of Neuroscience Research**, 2006.
- SAPER, C. B. et al. Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain Research**, v. 117, n. 2, p. 305–312, 1976a.
- SAPER, C. B. et al. Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain research**, v. 117, n. 2, p. 305–12, nov. 1976b.
- SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 183, n. 4, p. 689–706, 1979.
- SEASHOLTZ, A. F.; VALVERDE, R. A.; DENVER, R. J. Corticotropin-releasing hormone-binding protein: Biochemistry and function from fishes to mammals. **Journal of Endocrinology**, 2002.
- SERGEYEV, V. et al. Neuropeptide expression in rats exposed to chronic mild stresses. **Psychopharmacology**, v. 178, n. 2–3, p. 115–124, 2005.

SEVGI, S.; OZEK, M.; EROGLU, L. L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behavior in rats exposed to restraint stress. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 95–9, 2006.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 39, p. 51–60, 2014a.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. **The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2014b.

SLATER, P. G.; YARUR, H. E.; GYSLING, K. Corticotropin-Releasing Factor Receptors and Their Interacting Proteins: Functional Consequences. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 627–632, nov. 2016.

SMITH, D. G. et al. Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. **Neuropsychopharmacology**, 2006.

SMITH, D. G. et al. The effects of stressful stimuli and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation are reversed by the melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847 in rodents. **Behavioural Brain Research**, 2009.

SMITH, M. A. et al. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 3743–3750, 1995.

SMITH, O. A. et al. Functional analysis of hypothalamic control of the cardiovascular responses accompanying emotional behavior. **Federation Proceedings**, 1980.

SNYDER, A. E.; SILBERMAN, Y. Corticotropin releasing factor and norepinephrine related circuitry changes in the bed nucleus of the stria terminalis in stress and alcohol and substance use disorders. **Neuropharmacology**, v. 201, 15 dez. 2021.

STAMP, J. A.; HERBERT, J. Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. **Neuroscience**, 1999.

STENGEL, A.; TACHÉ, Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 235, n. 10, p. 1168–78, 2010.

STERLING, P. Allostasis: A model of predictive regulation. **Physiology and Behavior**, v. 106, n. 1, p. 5–15, 2012.

STERRENBURG, L. et al. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–14, 2011.

STIEDL, O. Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 and Central Heart Rate Regulation in Mice during Expression of Conditioned Fear. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 905–916, 2005.

STUBER, G. D.; WISE, R. A. **Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. Nature Neuroscience**, 2016.

SUTHERLAND, J. E. et al. The effect of restraint stress on prepulse inhibition and on corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptor gene expression in Wistar-Kyoto and Brown Norway rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2010a.

SUTHERLAND, J. E. et al. The effect of restraint stress on prepulse inhibition and on corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptor gene expression in Wistar-Kyoto and Brown Norway rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 227–238, dez. 2010b.

- SUTHERLAND, J. E.; CONTI, L. H. Restraint stress-induced reduction in prepulse inhibition in Brown Norway rats: Role of the CRF2 receptor. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 4, p. 561–571, 2011.
- SWANSON, L. W. et al. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 156–186, 1983.
- TER HORST, G. J.; LUITEN, P. G. M.; KUIPERS, F. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguus nuclei in the rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 11, n. 1, p. 59–75, 1984.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009a.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. **Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses**. **Nature Reviews Neuroscience**, 2009b.
- VALE, W. et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, n. 4514, p. 1394–1397, 1981.
- VENTURA-SILVA, A. P. et al. Stress shifts the response of the bed nucleus of the stria terminalis to an anxiogenic mode. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 10, p. 3396–3406, nov. 2012.
- VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2505–2512, 2005.
- VIEIRA, J. O. et al. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, n. August 2017, p. 426–437, 2018.
- VITORIO, A. S. et al. Evaluation of the posterior insular cortex involvement in anxiogenic response to emotional stress in male rats: Functional topography along the rostrocaudal axis. **Physiology and Behavior**, v. 258, 1 jan. 2023.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. 2007.
- WAN, Q. et al. Histone modifications of the Crhr1 gene in a rat model of depression following chronic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 1–6, 2014.
- WANG, S. S. et al. Increased expression level of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and in the hypothalamus in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Neuroscience Bulletin**, 2010.
- WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural- neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.
- WINSKY-SOMMERER, R. Interaction between the Corticotropin-Releasing Factor System and Hypocretins (Orexins): A Novel Circuit Mediating Stress Response. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 50, p. 11439–11448, 2004.
- WISŁOWSKA-STANEK, A. et al. Behavioral effects and CRF expression in brain structures of high- and low-anxiety rats after chronic restraint stress. **Behavioural Brain Research**, v. 310, p. 26–35, 2016.

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.

WOOD, S. K. Cardiac autonomic imbalance by social stress in rodents: Understanding putative biomarkers. *Frontiers in Psychology*, v. 5, n. AUG, p. 1–8, 2014.

YANG, L. et al. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae The Effects of Psychological Stress on Depression. *Current Neuropharmacology*, v. 13, p. 494–504, 2015.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I - Artigo publicado com dados obtidos do protocolo 4.1. desse estudo.

Brain Research Bulletin 166 (2021) 102–109



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Brain Research Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainresbull



Corticotropin-releasing factor neurotransmission in the lateral hypothalamus modulates the tachycardiac response during acute emotional stress in rats

Lucas Barretto-de-Souza^{a,b}, Ricardo Benini^{a,b}, Lilian L. Reis-Silva^{a,b}, Carlos C. Crestani^{a,b,*}

^a Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, SP, Brazil

^b Joint UFSCar-UNESP Graduate Program in Physiological Sciences, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cardiovascular
CRF
Heart rate
Hypothalamus
Restraint stress
Sympathetic activity

ABSTRACT

The lateral hypothalamus (LH) is implicated in the physiological and behavioral responses during stressful events. However, the local neurochemical mechanisms related to control of stress responses by this hypothalamic area are not completely understood. Therefore, in this study we evaluated the involvement of CRFergic neurotransmission acting through the CRF₁ receptor within the LH in cardiovascular responses evoked by an acute session of restraint stress in rats. For this, we investigated the effect of bilateral microinjection of different doses (0.01, 0.1 and 1 nmol/100 nL) of the selective CRF₁ receptor antagonist CP376395 into the LH on arterial pressure and heart rate increases and decrease in tail skin temperature evoked by acute restraint stress. We found that all doses of the CRF₁ receptor antagonist microinjected into the LH decreased the restraint-evoked tachycardia, but without affecting the arterial pressure and tail skin temperature responses. Additionally, treatment of the LH with CP376395 at the doses of 0.1 and 1 nmol/100 nL increased the basal values of both heart rate and arterial pressure, whereas the dose of 0.1 nmol/100 nL decreased the skin temperature. Taken together, these findings indicate that CRFergic neurotransmission in the LH, acting through activation of local CRF₁ receptors, plays a facilitatory role in the tachycardia observed during aversive threats, but without affecting the pressor and tail skin temperature responses. Our results also provide evidence that LH CRFergic neurotransmission is involved in tonic maintenance of cardiovascular function.

9.2. Anexo II - Artigo publicado com dados obtidos dos protocolos 4.2, 4.3 e 4.5 desse estudo.

Neuropharmacology 212 (2022) 109061



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm



Role of CRF₁ and CRF₂ receptors in the lateral hypothalamus in cardiovascular and anxiogenic responses evoked by restraint stress in rats: Evaluation of acute and chronic exposure

Lucas Barretto-de-Souza, Ricardo Benini, Lilian Liz Reis-Silva, Carlos C. Crestani*

Laboratory of Pharmacology, São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Anxiety
Blood pressure
Corticotropin-releasing factor
Habituation
Heart rate
Restraint stress
Sympathetic activity


ABSTRACT

We investigated the role of corticotropin-releasing factor (CRF) neurotransmission within the lateral hypothalamus (LH) in cardiovascular and anxiogenic-like responses evoked by acute and repeated restraint stress in rats. For this, animals were subjected to intra-LH microinjection of a selective CRF₁ (CP376395) or CRF₂ (antisauvagine-30) receptor antagonist before either an acute or the 10th session of restraint stress. Restraint-evoked arterial pressure and heart rate increases, tail skin temperature decrease and anxiogenic-like effect in the elevated plus maze (EPM) were evaluated. We also assessed the effect of 10 daily sessions of restraint on expression of CRF₁ and CRF₂ receptors within the LH. We identified that antagonism of either CRF₁ or CRF₂ receptor within the LH decreased the tachycardia during both the acute and 10th session of restraint, but the effect of the CRF₁ receptor antagonist was more pronounced during the 10th session. Acute restraint stress also caused anxiogenic-like effect, and this response was inhibited in animals treated with either CP376395 or antisauvagine-30. Anxiety-like behaviors were not changed following the 10th session of restraint, and pharmacological treatments did not affect the behavior in the EPM in chronically stressed animals. Repeated restraint also did not change the level of the CRF receptors within the LH. Taken together, the findings indicate that CRF₁ and CRF₂ receptors within the LH are involved in tachycardic and anxiogenic-like responses to aversive stimuli. Control of tachycardia by the CRF₁ receptor is sensitized by previous stressful experience, and this effect seems to be independent of changes in expression of the receptor.

9.3. Anexo III - Artigo publicado com dados obtidos no estágio de pesquisa no exterior (BEPE – FAPESP) realizado no Boston College na cidade de Boston/EUA sob a supervisão do Prof. Dr. John P. Christianson

Original Investigation | [Published: 28 June 2023](#)

Melanin-concentrating hormone and orexin shape social affective behavior via action in the insular cortex of rat

[Lucas Barretto-de-Souza](#), [Shemar A. Joseph](#), [Francesca M. Lynch](#), [Alexandra J. Ng](#), [Carlos C. Crestani](#) & [John P. Christianson](#) 

Psychopharmacology (2023) | [Cite this article](#)

Abstract

Rationale

In a social context, individuals are able to detect external information from others and coordinate behavioral responses according to the situation, a phenomenon called social decision-making. Social decision-making is multifaceted, influenced by emotional and motivational factors like stress, sickness, and hunger. However, the neurobiological basis for motivational state competition and interaction is not well known.

Objective

We investigated possible neural mechanisms through which internal states could shape social behavior in a social affective preference (SAP) test. In the SAP test, experimental rats given a choice to interact with naïve or stressed conspecifics exhibit an age-dependent preference to interact with stressed juvenile conspecifics, but avoid stressed adult conspecifics. First, we assessed the effect of food and water deprivation on SAP behavior. Behavior in the SAP test requires the insular cortex, which receives input from the ingestion-related peptides melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin neurons of the lateral hypothalamus (LH). This study aimed to evaluate the role of LH and insular MCH and orexin in SAP test.

Methods

SAP tests were conducted in rats that were sated, food and water deprived or allowed 1 h of access to food and water after 14 h of deprivation (relieved condition). Separate cohorts of sated rats received cannula implants for microinjection of drugs to inhibit the LH or to block or stimulate MCH or orexin receptors in the insula prior to SAP tests or social interaction tests.

Results

Food and water deprivation prior to SAP tests with juvenile rats caused a shift in preference away from the stressed rat toward the naïve juveniles. Pharmacological inhibition of LH with muscimol (100 ng/side) abolished the preference for the juvenile-stressed conspecific, as well as the preference for the adult naïve conspecific. The blockade of MCH receptor or orexin receptors in the insular cortex with SNAP94847 (50 μ M) or TCS1102 (1 μ M), respectively, also abolished the preference for the stressed juvenile conspecific, but only the antagonism of orexin receptors was able to abolish the preference for the adult naïve conspecific.

Microinjection of increasing doses (50 or 500 nM) of MCH or orexin-A in the insular cortex increased the interaction time in the one-on-one social interaction test with juvenile conspecifics; however, only the microinjection of orexin-A increased the interaction time with adult naïve conspecifics.

Conclusions

Taken together, these results suggest that lateral hypothalamus peptides shape the direction of social approach or avoidance via actions MCH and orexin neurotransmission in the insular cortex.